



HAL
open science

**Cellules souches pluripotentes induites (iPSc)
différenciées en motoneurones spinaux : vers des
modèles cellulaires de neuropathies périphériques
d'origine génétique**

Pierre-Antoine Faye

► **To cite this version:**

Pierre-Antoine Faye. Cellules souches pluripotentes induites (iPSc) différenciées en motoneurones spinaux : vers des modèles cellulaires de neuropathies périphériques d'origine génétique. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2015. Français. NNT : 2015LIMO0051 . tel-01376942

HAL Id: tel-01376942

<https://theses.hal.science/tel-01376942>

Submitted on 6 Oct 2016

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 DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE Biologie Santé 524

EA 6309 Maintenance Myélinique et Neuropathies Périphériques

Thèse

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline / Spécialité : Neurosciences

présentée et soutenue par

Pierre-Antoine FAYE

Le 05 octobre 2015

**Cellules souches pluripotentes induites (iPSc)
différenciées en motoneurones spinaux :
vers des modèles cellulaires de neuropathies
périphériques d'origine génétique**

Thèse co-dirigée par

Mme le Dr. Anne-Sophie LIA, Maître de conférences, Université de Limoges

M. le Pr. Benoît FUNALOT, Professeur, Université de Paris XII

M. le Pr. Franck STURTZ, Professeur, Université de Limoges

Jury :

Rapporteurs

Pr Pascal REYNIER

Dr Nicolas TRICAUD

Professeur à l'Université d'Angers

Chargé de recherche INSERM (HDR) à l'Université de Montpellier

Examineurs

Pr Benoît FUNALOT

Pr Georg HAASE

Dr Anne-Sophie LIA

Pr Laurent MAGY

Pr Franck STURTZ

Professeur à l'Université Paris XII

Professeur à l'Université d'Aix-Marseille

Maître de conférences à l'Université de Limoges

Professeur à l'Université de Limoges

Professeur à l'Université de Limoges

A Sophie...

Remerciements

Pour clôturer ces années de thèse, je tiens à remercier l'ensemble des personnes qui m'ont aidé tout au long de ce travail, de près comme de loin.

A ma co-direction de thèse,

A Monsieur le Professeur **Franck Sturtz** ; je vous adresse mes plus sincères remerciements pour m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire et de votre équipe. Je vous remercie pour votre aide et vos conseils avisés tout au long de ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma plus profonde reconnaissance.

A Madame le Docteur **Anne-Sophie Lia** ; je vous remercie d'avoir su porter ce projet et de m'avoir fait confiance. Vous avez su me laisser assez de liberté dans mon travail pour que je puisse pleinement m'approprier ce sujet. Je tiens également à vous remercier pour votre aide lors de la rédaction de cette thèse. Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur **Benoît Funalot** ; je vous remercie pour votre confiance, votre rigueur, votre aide pertinente et précieuse tout au long de ce travail. Malgré la distance vous étiez toujours disponible et à l'écoute que ce soit à l'hôpital comme aux Halles lors de nos réunions improvisées du samedi matin ! Soyez assuré, Monsieur, de toute mon estime et de mon profond respect.

Aux membres du jury,

Je remercie Monsieur le Professeur **Pascal Reynier** ainsi que Monsieur le Docteur **Nicolas Tricaud** d'avoir accepté d'être mes rapporteurs. Veuillez trouver ici l'expression de ma plus profonde reconnaissance.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur **Georg Haase** ainsi que Monsieur le Professeur **Laurent Magy** d'avoir accepté d'examiner ce travail et j'espère qu'il a suscité votre intérêt. Veuillez trouver ici l'expression de ma plus profonde reconnaissance.

A l'équipe Maintenance Myélinique et Neuropathies Périphériques

A Madame le Docteur **Sylvie Bourthoumieu**. Je voudrais te remercier Sylvie d'avoir toujours été disponible. Tes précieux conseils m'ont permis d'avoir une approche différente de la recherche et de sans cesse me remettre en question. Merci pour ta rigueur et ta gentillesse. Je voudrais aussi remercier Madame le Docteur **Laurence Richard** pour son efficacité et pour sa gentillesse au sein du labo mais aussi en dehors. Merci à la fameuse équipe de doctorants, Max et Flavien, pour leur bonne humeur, Adama pour sa grande gentillesse mais aussi Aurore, Betty

et Dorothée. Je tiens à remercier Angélique Nizou pour son aide plus que précieuse, sa réactivité et sa bonne humeur, Claire-Cécile Barrot pour son aide précieuse en stat, et je n'oublie pas les bons moments passés avec le reste de l'équipe. Je voudrais remercier Monsieur le Professeur **Alexis Desmoulière** pour m'avoir encadré tout au long de mes études pharmaceutiques. Vous m'avez permis de confirmer mon idée de poursuivre dans la voie de la recherche. Soyez assuré, Monsieur, de toute mon estime et de mon profond respect.

A l'équipe de neurologie du CHU

Je remercie Monsieur le professeur **Jean-Michel Vallat** de m'avoir accueilli au sein du laboratoire de Neurologie du CHU de Limoges et de m'avoir consacré du temps pour l'explication de biopsies nerveuses. Je remercie tout particulièrement les filles du 5^{ème}, Emilie et Fanny, pour leur bonne humeur permanente.

A l'équipe de cytologie de l'HME

Je voudrais remercier Mesdames les Professeurs **Catherine Yardin** et **Françoise Esclaire** ainsi que tout le personnel du service de cytogénétique de l'HME. Vous m'avez tout de suite accueilli et avez toujours été disponible.

A l'équipe Homéostasie cellulaire et pathologie

Merci au Docteur **Nicolas Vedrenne** pour ta bonne humeur, tes précieux conseils, les coups de pouce sur certaines manips et surtout merci d'avoir pris le relais des manips pour que je puisse prendre quelques vacances. Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements à Monsieur le Professeur **Serge Battu** pour sa bonne humeur, sa disponibilité et ses précieux conseils. Ce fut un plaisir pour moi de travailler avec vous. Je pense à l'équipe doctorante du 2^{ème}, sans qui les pauses café n'auraient pas eu la même saveur, mais aussi à Monsieur le Docteur **Ludovic Micallef** pour m'avoir fait l'honneur de me former. Tes phrases « cultes » et ta bonne humeur ont rythmé les journées. Sans oublier le Docteur **Miguellito** la machine « de faire les Western ».

A l'équipe d'Xlim

Je voudrais remercier le Professeur **Rod O'Connor** d'avoir pris de son temps afin de pouvoir permettre une collaboration entre le laboratoire BioEPIX du LABEX Sigmalim Xlim et notre laboratoire. Merci pour vos remarques scientifiques toujours pertinentes, pour votre enthousiasme et votre accueil. Ce fut un immense plaisir de travailler avec vous. Merci à Monsieur le Docteur **Sergii Romanenko** pour m'avoir initié à l'électrophysio, et avoir consacré

de très longues soirées à cette technique ; je pense aussi à nos conversations très intéressantes autour d'une tasse de thé en attendant qu'assez de pipettes soient étirées. Je n'oublie pas le reste de l'équipe qui a su m'intégrer au sein du labo, Sylvia, Lynn, Philippe et les autres.

A tous les autres

Je n'oublie pas les discussions très enrichissantes avec le Docteur **Faraj Terro**, mais aussi les moments passés au confocale avec **Claire Carrion**.

A Sophie, ma famille et mes amis

Je remercie Hugo et Jo pour m'avoir permis de découvrir la joie du camping sous la pluie et l'orage et même la grêle lors de notre tour express du Mont Blanc en 7 jours (la semaine de vacances que je ne pense pas oublier de sitôt) ! Je tiens à remercier Mo, Jimmy, Guillaume et Jb pour avoir « toléré » un simple pharmacien dans leur groupe de médecins, mais aussi pour tous les bons moments passés avec vous autour d'une bière et d'un bon repas. Je n'oublie pas Clarou qui même loin est restée présente mais aussi Aïcha, Laurent, Anaïs, Sabi, P'ti Pierre, Alex, mes potes du hand, et tous les autres, qui m'ont soutenu tout au long des études pharmaceutiques et durant cette thèse.

J'adresse un immense merci à mes parents qui m'ont toujours soutenu dans mes choix et qui ont tout mis en œuvre pour que je puisse mener à bien mes études. Merci à ma sœur, Anne-Cécile et son ami Loïc.

Enfin, merci à Sophie, ma moitié, de m'avoir supporté pendant toutes ces années, d'avoir été présente à mes côtés et d'avoir tout fait pour que je puisse suivre ma passion de la recherche.

Je remercie

L'université de Limoges



Et la région Limousin



Qui m'ont soutenu financièrement pendant la durée de cette thèse par
l'attribution d'une bourse régionale

Table des Matières

Remerciements	ii
Table des Matières	vi
Abréviations	x
Introduction	1
Partie I – Etude bibliographique	3
1 Le système nerveux	4
1.1 Généralités.....	4
1.2 Origine embryonnaire	5
1.2.1 Mise en place du tube neural.....	7
1.2.2 Le neuroépithélium	9
1.2.2.1 Les mécanismes moléculaires de différenciation	9
a. Différenciation dorso-ventrale	9
b. Différenciation crânio-caudale.....	10
c. Principales voies de signalisation.....	11
1.2.2.2 Devenir des cellules du neuroépithélium.....	21
1.2.3 La Moelle épinière (ME).....	24
1.3 Architecture du nerf périphérique	25
1.3.1 Les neurones.....	26
1.3.1.1 Généralités	26
1.3.1.2 L'axone.....	27
1.3.1.3 Les motoneurones.....	29
1.3.2 Les cellules de Schwann	31
2 Mitochondries et nerf périphérique	32
2.1 Généralités.....	32
2.2 Production d'énergie	35
2.2.1 Glycolyse, β -oxydation et cycle de Krebs.....	36
2.2.2 Phosphorylation oxydative.....	37
2.2.3 Stress oxydatif.....	38
2.3 La mitophagie.....	40

2.4	Dynamique mitochondriale	42
2.4.1	Fusion mitochondriale.....	42
2.4.2	Fission mitochondriale	44
2.5	Interaction mitochondrie / réticulum endoplasmique, une structure particulière.....	46
2.6	GDAP1, un rôle controversé	48
2.7	Rôle de la mitochondrie au sein du nerf périphérique	50
3	Neuropathies périphériques.....	50
3.1	Généralités.....	50
3.2	Anamnèse et examen clinique.....	51
3.3	Examens complémentaires	53
3.3.1	Examen électrophysiologique	53
3.3.2	Examen biologique.....	53
3.3.3	Examen histopathologique	54
4	Neuropathies héréditaires sensitivomotrices ou maladie de Charcot-Marie-Tooth.....	55
4.1	Généralités.....	55
4.2	Classification et gènes impliqués	56
4.3	Recherche récente sur les CMT, exemple de GDAP1	60
4.3.1	CMT et GDAP1	60
4.3.2	Les modèles animaux	62
4.3.3	Les modèles cellulaires	63
4.3.4	Perspectives cliniques	65
5	Cellules souches pluripotentes induites.....	67
5.1	Définition cellules souches.....	67
5.2	Cellules souches embryonnaires (cellules ES).....	69
5.2.1	Historique et Législation	69
5.2.2	Comparaison des cellules ES murines et humaines	71
5.2.3	Intérêts en recherche des cellules ES humaines	72
5.3	Les cellules souches pluripotentes induites, iPS	73
5.3.1	Origine des iPS.....	73
5.3.2	Reprogrammation.....	74
5.3.2.1	Choix du type cellulaire.....	74
5.3.2.2	Choix des facteurs de reprogrammation.....	75
5.3.2.3	Méthodes de reprogrammation	77

5.3.3	Entretien et caractéristiques	82
5.3.3.1	Entretien.....	82
5.3.3.2	Caractéristiques et contrôles.....	83
5.3.4	Différenciation des iPS et espoirs thérapeutiques	84
5.3.4.1	Mémoire épigénétique	84
5.3.4.2	Etat des lieux des différentes applications.....	85
5.3.4.3	Différenciation en Motoneurone	88
6	Description de quelques techniques	92
6.1	Sédimentation par couplage flux force.....	92
6.1.1	Principes généraux de la technique de SdFFF : mode d'éluion inertiel	92
6.1.2	Mise au point du matériel.....	95
6.1.3	Tri cellulaire par SdFFF	96
6.2	Observation des cellules.....	96
6.2.1	La microscopie optique	97
6.2.1.1	La microscopie à transmission	97
6.2.1.2	La microscopie à fluorescence	98
6.2.2	La microscopie électronique	99
6.3	Electrophysiologie et patch clamp	99
	Partie II – Objectifs.....	104
	Partie III – Partie expérimentale	107
1	Obtention de cellules dermiques humaines, reprogrammation en cellules iPSc et différenciation en motoneurones.....	109
1.1	Présentation d'ensemble.....	109
1.2	Obtention de fibroblastes dermiques et reprogrammation en iPSc.....	109
1.2.1	Méthodes utilisées pour obtenir les FDs	110
1.2.2	Méthode utilisée pour reprogrammer les FDs en iPSc.....	110
1.3	Différenciation des iPSc en motoneurones : Article 1	112
1.4	Conclusion.....	123
2	Amélioration de la pureté cellulaire par SdFFF	124
2.1	Situation du problème	124
2.2	Article 2.....	124
2.3	Conclusion.....	149

3	Différences morphométaboliques des cellules de patients vs. cellules de témoin: apparition de gouttelettes lipidiques.....	150
3.1	Introduction.....	150
3.2	Article 3.....	150
3.3	Conclusion.....	166
4	Différences morphométaboliques des cellules de patients vs. cellules de témoin: altération des mitochondries et du réseau mitochondrial.....	167
4.1	Introduction.....	167
4.2	Article 4.....	167
4.3	Conclusion.....	178
	Partie IV – Discussion et Perspectives.....	179
	Partie V – Conclusion	188
	Bibliographie.....	190
	Annexes	208
	Annexe I – Protéines associées aux « Mitochondrial-Associated endoplasmic reticulum Membrane » d’après (Schon and Area-Gomez 2013).....	209
	Annexe II – Séquences de référence ADN et protéique de GDAP1	210
	Annexe III - Liste des amorces, taille des amplifiats et marqueur de poids moléculaire... 211	
	Annexe IV –Valeurs de référence pour l’étude électroneuromyographique au CHU de Limoges.....	212
	Annexe V – Version en vigueur de l’article L2151-5 du 7 août 2013 relative à la bioéthique	213
	Annexe VI – Résumé selon (Hoffman and Carpenter 2005) des différents types de différenciations de cellules hES en 2005	214
	Annexe VII – Plasmides de S. Yamanaka utilisés pour la reprogrammation	215
	Annexe VIII – Séquences nucléiques de <i>GDAP1</i> du contrôle et du patient obtenu après extraction des ARN des fibroblastes dermiques et des motoneurones (après différenciation des iPSc).....	216
	Annexe IX – Identification des protéines après spectroscopie de masse (Relatif à l’article SdFFF).....	218
	Table des illustrations.....	224
	Table des tableaux.....	226

Abréviations

2D : deux Dimensions	DMSO : DiMéthyl SulfOxyde
3D : trois Dimensions	dNTP : DésoxyriboNucléotides-Tri-Phosphates
AA : Acide Aminé	DPBS : Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
AD : Autosomique Dominant	DRP1 : Dynamin-Related Protein 1
ADN : Acide DésoxyriboNucléique	Dsh : DiShveled
ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire	DI-CMT : Dominant Intermédiaire – Charcot-Marie-Tooth
ADP : Adénosine DiPhosphate	EB : Embryoid Bodies = corps embryonnaire
AM : Adressage Mitochondrial	EGF : Epidermal Growth Factor
APC : Adenomatosis Polyposis Coli	ENMG : ElectroNeuroMyoGramme
AR : Autosomique Récessif	EpiSC : Cellule Souche EPIblastique
ARN : Acide RiboNucléique	ESc : Embryonic Stem cells
ARNm : Acide RiboNucléique messenger	FD : Fibroblaste Dermique
ARNr : Acide RiboNucléique ribosomique	FGF : Fibroblast Growth Factors
ATCC : American Type Culture Collection	FGFR : Fibroblast Growth Factors Receptor
ATP : Adénosine TriPhosphate	Fig. 1 : Figure 1
AUFS : Absorbance Unit Full Scale	Fis1 : mitochondrial FISsion 1
BAD : B-cell lymphoma 2 Antagonist of cell Death	FIV : Fécondation <i>In-Vitro</i>
BAX : B-cell lymphoma 2-Associated X protein	FNA : Front Neural Antérieur
BCL2: B-Cell Lymphoma 2	FoxG1 : Forkhead box protein G1
BDNF : Brain Derived Neurotrophic Factor	FOXO : Forkhead box class O
bHLH : basic Helix Loop Helix	FRS2 α : Fibroblast Growth Factors Receptor Substrate 2 α
BMP : Bone Morphogenetic Proteins	Fz : Frizzled
BSA : Bovine Serum Albumin	Gbx2 : Gastrulation Brain homeobX 2
C1 : 1 ^{ère} vertèbre Coccygienne	GDAP1 : Ganglioside-induced Differentiation-Associated Protein-1
Ca ²⁺ : ion Calcium	GDAP1-L1 : Ganglioside-induced Differentiation-Associated Protein-1 Like1
CK1 α : Caséine Kinase 1 α	GDF : Growth Differentiation Factors
CMT : Charcot-Marie-Tooth	GDNFs : Glial-Derived Neurotrophic Factors
CMT1 : Charcot-Marie-Tooth démyélinisante	GRB2 : Growth factor Receptor-Bound 2
CMT2 : Charcot-Marie-Tooth axonale	GSH : Glutathione
CMTX : Charcot-Marie-Tooth lié à l'X	GST : Glutathione-S-Transferase
CoEQ10 : Co-Enzyme Q10	GTPaseED : Domaine Effecteur GTPase
CRABP : Cellular Retinoic Acid-Binding Protein	GTPaseD : Domaine GTPase
CRBP : Cellular Retinol-Binding Protein	HAS : Haute Autorité de Santé
CS : Cellule de Schwann	HD1 : Domaine Hydrophobe 1
DAG : DiAcylGlycerol	hES : human Embryonic Stem
DAPI : 4',6-DiAmidino-2-PhenylIndole	Hes : Hairy Enhancer of Split
DD : Domaine Dynamine	H ₂ O ₂ : peroxyde d'hydrogène
ddNTP : DiDésoxyriboNucléotides-Tri-Phosphates	HO ₂ [*] : radical hydroperoxyl
Dhh : Desert HedgeHog	
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium	
DMLA : Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age	

Hox : gène Homéotique
 HR1 : domaines Heptad Repeats1
 HSMN : Neuropathies SensitivoMotrices Héritaires
 IGF-1 : Insulin-like Growth Factor-1
 Ihh : Indienne HedgeHog
 IP₃ : Inositol-1,4,5,-triPhosphate
 iPSc : induced Pluripotent Stem cells
 Irx3 : Iroquois homeobox protein 3
 j19 : jour 19
 JPH1 : Junctophiline-1
 Klf4 : Krüppel-like factor 4
 KO-GDAP1 : Knock-Out pour GDAP1
 L3 : 3^{ème} vertèbre Lombaire
 LAB : Bactérie à Acide Lactique
 LAP : Latency-Associated Peptide
 LC3-1 : protein 1 Light Chain 3
 LEF : Lymphoid Enhancer Factor
 LIR : LC3-Interacting Region
 LRP5/6 : Low density lipoprotein Related Protein
 LTBP : Latent Transforming Growth Factors - β Binding Protein
 MAM : Mitochondrial-Associated endoplasmic reticulum Membrane
 MAML1 : MAsterMind-Like 1
 MARCKS : Myristoylated Ala-Rich C kinase Substrate
 MD : Middle Domain = domaine central
 Mdv1 : Mitochondrial DiVision protein 1
 MEF : Mouse Embryonic Fibroblast = fibroblaste embryonnaire de souris
 mES : murine Embryonic Stem
 MET : Microscopie Électronique à Transmission
 MFN1 : MitoFusiNe 1
 miARN : microAcide RiboNucléique
 MN : MotoNeurone
 MT : MicroTubules
 NECD : Notch ExtraCellular Domain
 NEFH : Heavy NeuroFilament
 NEFL : Low NeuroFilament
 NEFM : Medium NeuroFilament
 NFAT : Nuclear Factor of Activated T cells
 NGF : Nerve Growth Factor
 NICD : Notch IntraCellular Domain
 Nkx2.2 : NK2 Homeobox 2
 Nkx6.1 : NK6 Homeobox 1
 NRG : Neuréguline
 NT-3 : Neurotrophine-3
 NTM : domaine TransMembranaire Notch
 O₂^{*} : radical superoxide
 Oct4 : OCTamer-binding Transcription factor 4 = POU5F1
 OH^{*} : radical hydroxyl
 OIs : Organisateur Isthmique
 ONOO⁻ : peroxyinitrites
 OPA1 : optical atrophy 1
 Otx2 : Orthodenticle Homeobox 2
 Parkin : E3 ubiquitin ligase
 Pax6 : PAired boX 6
 Pb : Paire de Bases
 PBS : Phosphate Buffer Saline
 PCP : Planar Cell Polarity
 PCR : Polymerase Chain Reaction
 PD0325901 : N-[(2R)-2,3-dihydroxypropoxy]-3,4-difluoro-2-[(2-fluoro-4-iodophenyl)amino]-benzamide
 PFA : Para-FormAldéhyde
 PH : domaine d'Homologie aux Pleckstrines
 PINK1 : PTEN - Induced putative protein Kinase 1
 PKC : Protéine Kinase C
 PLCγ1 : PhosphoLipase Cγ1
 PMP22 : Peripheral Myelin Protein 22
 POU5F1 = Oct4 : OCTamer-binding Transcription factor 4
 PTCH1 : Patched
 PTEN : Phosphatase and TENsin homolog
 RA : Retinoïc Acid
 RALDH : RétinALDehyde DeHydrogenases
 RAR : Retinoïc Acid Receptor
 RARE : Retinoïc Acid Response Element
 RBP-κ : Recombination signal Binding Protein κ
 RCPG : Récepteur Couplé à une Protéine G
 RE : Réticulum Endoplasmique
 Réf. : Référence
 REG : Réticulum Endoplasmique Granuleux
 RI-CMT : Récessif Intermédiaire – Charcot Marie Tooth
 RISC : Ribonucleic acid Induced Silencing Complex
 RO^{*} : radical alkoxy
 RO₂^{*} : radical peroxy
 ROCK : Rho-associated coiled-coil kinase
 RoDH : RetinOl DésHydrogénase
 ROS : Reactive Oxygen Species
 rpm : Rotation Par Minute
 RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium
 RT: Reverse Transcription

RXR : Retinoid X Receptors
 S2 : 2^{ème} vertèbre Sacrée
 SB431542 : 4-[4-(1,3-benzodioxol-5-yl)-5-(2-pyridinyl)-1H-imidazol-2-yl]-benzamide
 SdFFF : Sedimentation Field Flow Fractionation
 SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
 Shh : Sonic HedgeHog
 sh-RNA : Short Hairpin Acide RiboNucléique
 si-RNA : Small Interfering Acide RiboNucléique
 SMA : Atrophie Musculaire Spinale
 SMN : Survival Motor Neuron
 Smo : Smoothened
 SNC : Système Nerveux Central
 SNP : Système Nerveux Périphérique
 SNS : Système Nerveux Somatique
 SNV : Système Nerveux Végétatif
 SOD : SuperOxyde Dismutase
 Sox2 : sex-determining region Y-box 2
 SSEA-1 : Stage-Specific Embryonic Antigen-1
 SVF : Sérum de Veau Fœtal
 TA : Température Ambiante
 Tab. 1 : Tableau 1
 TCF : T cell factor
 TGF- β : Transforming Growth Factors - β
 TIM : Translocase Inner Membrane
 TMD : Domaines TransMembranaires
 TOM : Translocase Outer Membrane
 TPR : TetratricoPeptide Repeat motifs
 TRA-1-60 : Tumor Rejection Antigen 1-60
 TRPV4 : Transient Receptor Potential cation channel subfamily V member 4
 VDAC : Voltage-Dependent Anion Channel
 VCN : Vitesse de Conduction Nerveuse
 UV : Ultra-Violet

Introduction

La maladie de Charcot-Marie-Tooth correspond à un ensemble de neuropathies sensitivomotrices d'origine héréditaire dont la prévalence est d'environ 1/2500 personnes. Elle représente la pathologie génétique dégénérative la plus courante du système nerveux périphérique. Historiquement, cette pathologie a été divisée en deux groupes selon la vitesse de conduction nerveuse (VCN) et le niveau de l'atteinte. Le type 1 (CMT1) correspond à une atteinte démyélinisante chronique des nerfs périphériques avec une VCN diminuée et le type 2 (CMT2) est lié à une atteinte axonale avec une VCN normale. Les différents modes de transmission (autosomique dominant, récessif ou lié à l'X) ont été décrits et plus de 80 gènes ont été mis en cause dans les CMT. Dans ce travail, je me suis intéressé aux maladies de Charcot-Marie-Tooth de type axonale (CMT2) causées entre autre par le gène *GDAP1*. Ce gène code une protéine de la membrane externe mitochondriale qui serait impliquée dans la dynamique mitochondriale, notamment la fission, mais dont l'étendue de sa fonction reste encore méconnue. Des pistes suggèrent son implication lors de la formation des interactions mitochondrie / réticulum endoplasmique régulant ainsi l'homéostasie calcique ou lipidique, mais aussi lors de la mitophagie, en permettant au phagosome de se lier. Des modèles animaux ou des lignées cellulaires modifiées ont déjà été développés par d'autres équipes afin de mimer le comportement des motoneurones lors de cette pathologie, mais laissant apparaître d'importants biais. De manière à se rapprocher au plus près d'un modèle humain de la pathologie, et grâce à la proximité du Centre National de Référence des neuropathies périphériques rares, il a été choisi de développer le modèle des cellules souches induites à la pluripotence ou cellules iPS. Ce centre, situé au sein du service de neurologie du CHU ainsi que la grande disponibilité de son personnel, nous a permis d'avoir accès à un grand nombre d'échantillons biologiques de patients, tout ceci dans le but de progresser dans la compréhension de cette pathologie génétique. Des fibroblastes dermiques ont été obtenus après une simple biopsie de peau de patient et ont été reprogrammés grâce au cocktail de Yamanaka. Les cellules obtenues présentent les mêmes caractéristiques que les cellules souches embryonnaires humaines, à savoir l'auto-renouvellement et la capacité de pouvoir générer l'ensemble des cellules de l'organisme humain, et sont appelées cellules iPS pour cellules souches induites à la pluripotence. De plus, les cellules iPS ne présentent pas la lourdeur éthique et administrative des cellules souches embryonnaires humaines. Ces cellules iPS ont été différenciées en cellules d'intérêt qui sont pour nous les motoneurones. De manière à pouvoir

établir un protocole de différenciation fiable et rapide, il est nécessaire de connaître les différentes voies embryonnaires ainsi que les facteurs nécessaires à la mise en place du système nerveux périphérique et en particulier des motoneurones. L'obtention de motoneurones permet une étude physiopathologique mais aussi une étude dynamique du réseau mitochondrial. Pour parvenir à notre but, des techniques particulières ont été utilisées comme des techniques de microscopie électronique ou confocale, mais aussi des techniques de tri cellulaire ou encore d'électrophysiologie.

De manière à appréhender et à s'appropriier ce sujet d'étude, nous avons développé, dans une première partie, les différents termes de cette problématique. Dans un second temps, nous avons décrit l'ensemble des résultats produits pendant cette période de trois ans. Enfin, nous avons conclu ce manuscrit par une partie Discussion-Perspectives, qui permettra, nous l'espérons, d'envisager la suite à donner à ce travail.

Partie I – Etude bibliographique

1 Le système nerveux

1.1 Généralités

D'un point de vue anatomique, le système nerveux se décompose en deux grandes parties, le système nerveux central (SNC) et le système nerveux périphérique (SNP) (Fig. 1).

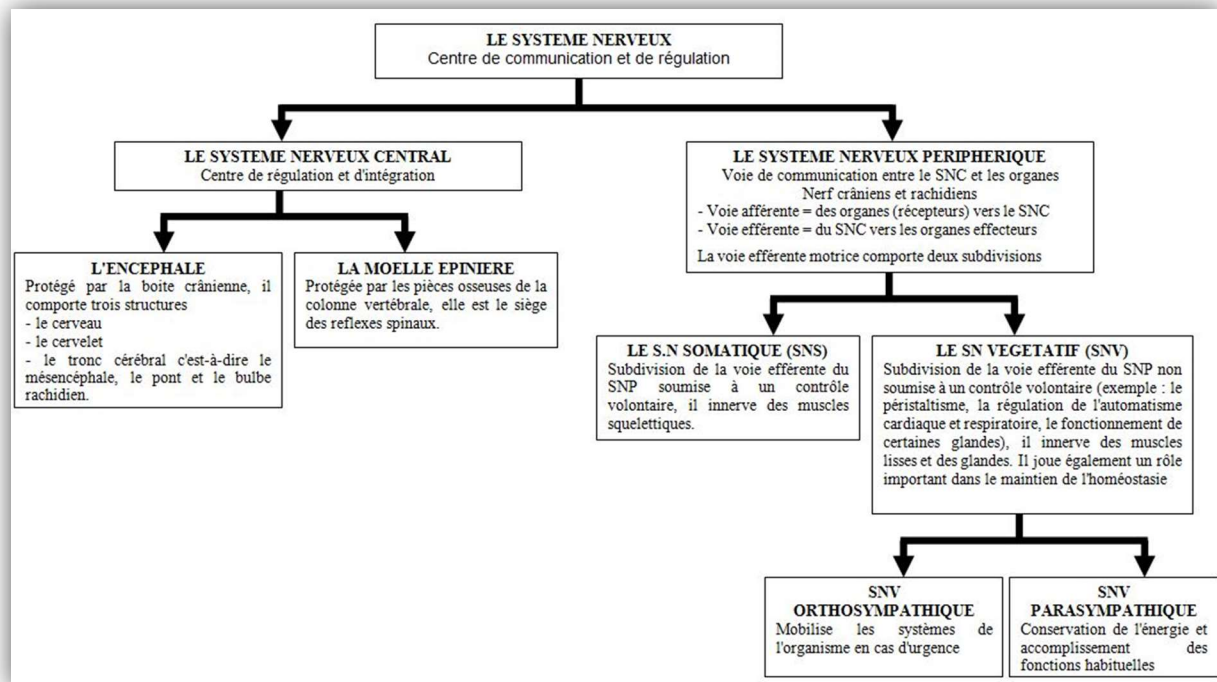


Figure 1 : Structure du système nerveux

<http://acces.ens-lyon.fr>

Le SNC est constitué de l'encéphale comprenant le cerveau, le tronc cérébral, le cervelet, et de la moelle épinière. Il participe au recueil des informations en provenance des différentes régions du corps, à l'intégration de ces informations, et enfin à l'élaboration d'une réponse adaptée. Le SNP comprend les voies nerveuses situées en dehors de la cavité crânienne et du canal rachidien, et il est constitué par les nerfs crâniens et rachidiens (ou spinaux). Il se divise en deux parties : les voies afférentes sensibles, qui relient les récepteurs sensoriels de la surface du corps jusqu'à la zone adéquate du SNC ; et les voies efférentes motrices, qui relient le SNC aux organes effecteurs. Les fibres afférentes sensibles pénètrent la moelle épinière par les racines dorsales, et les fibres efférentes motrices en sortent par les racines ventrales. La réunion des racines dorsales et ventrales forme un nerf spinal (Fig. 2). L'Homme possède 31 paires de nerfs spinaux de la première vertèbre cervicale jusqu'à la seconde vertèbre lombaire. Ces nerfs

spinaux vont ensuite former les nerfs périphériques, qui vont se distribuer à l'ensemble de l'organisme (voies efférentes motrices et afférentes sensibles).

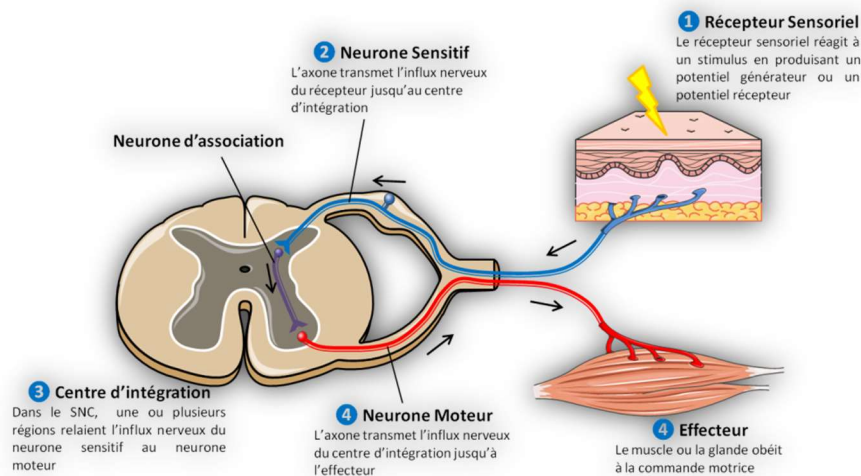


Figure 2 : Propagation de l'influx nerveux suite à un stimulus du récepteur sensoriel à l'effecteur

Le récepteur sensoriel réagit à un stimulus en produisant un potentiel générateur ou un potentiel récepteur. L'information transite via l'axone jusqu'au centre d'intégration. Dans le SNC, une ou plusieurs régions relaient l'influx nerveux du neurone sensitif au neurone moteur. L'axone transmet l'influx nerveux du centre d'intégration jusqu'à l'effecteur. Enfin cet effecteur obéit à la commande motrice.

Les voies efférentes motrices comportent deux subdivisions, le système nerveux somatique (SNS) ou volontaire et le système nerveux végétatif (SNV) ou autonome. Le SNS réunit des neurones dont les corps cellulaires se trouvent dans le SNC (tronc cérébral et moelle épinière) et les axones s'étendent du SNC jusqu'aux muscles striés squelettiques. Le SNV est quant à lui responsable de la contraction involontaire, il contrôle par exemple les muscles lisses, le muscle cardiaque ou encore le fonctionnement de certaines glandes. Il est lui-même subdivisé en deux, avec le SNV sympathique ou orthosympathique, et le SNV parasympathique. Il existe une balance entre ces deux composantes ; le SNV sympathique est activé lors de situations extrêmes ou présentant une menace pour augmenter les chances de survies, alors que le SNV parasympathique est activé en cas contraire (fonctions habituelles, métabolisation de ressources...).

1.2 Origine embryonnaire

Le système nerveux se forme et se développe très tôt au cours de la troisième semaine de l'embryogenèse. Lors de la gastrulation, l'embryon passe d'un stade didermique, c'est-à-dire

composé de seulement deux feuillets embryonnaires, l'ectoderme et l'endoderme, à un stade tridermique (l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme) par la prolifération et l'invagination des cellules ectoblastiques au niveau de la ligne primitive (Fig. 3). Durant ce stade, l'embryon est orienté selon un axe dorso-ventral avec l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme, mais aussi suivant un axe crânio-caudal avec l'ébauche de la membrane oropharyngienne en crâniale, et de la membrane cloacale en caudale, et selon un axe latéro-médian avec la ligne primitive.

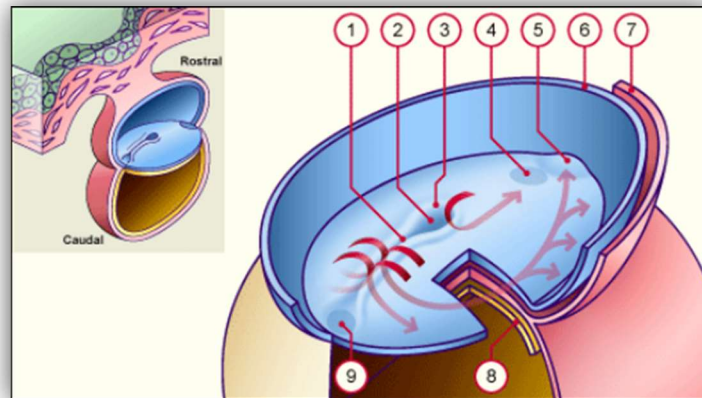


Figure 3 : Disque embryonnaire à j19 vue dorsale

(<http://www.embryology.ch/francais/hdisqueembry/triderm01.html>)

Les flèches rouges représentent la migration des cellules ectoblastiques (1) sillon primitif ; (2) dépression primitive ; (3) nœud primitif ; (4) membrane oropharyngée ; (5) aire cardiaque ; (6) bord de l'amnios ; (7) mésoderme ; (8) endoderme ; (9) future membrane cloacale ; (1+2+3 = ligne primitive)

A ce stade, une nouvelle structure apparaît, il s'agit de la chorde ou notochorde. A j19 le processus chordal est constitué par des cellules ectoblastiques qui s'invaginent au niveau dorsal dans la région du nœud primitif et migrent sur la ligne médiane en direction céphalique. La chorde passe d'un tube creux (Fig. 4 (A)), à un canal (Fig. 4 (B)) puis à un cylindre plein et individualisé s'étendant au niveau de la ligne médiane, de la partie antérieure jusqu'à l'extrémité postérieure de l'embryon (Fig. 4 (C)). La chorde définit donc l'axe longitudinal de l'embryon en indiquant l'emplacement des futurs corps vertébraux, et joue un rôle très important lors de la neurulation primaire et la mise en place du tube neural.

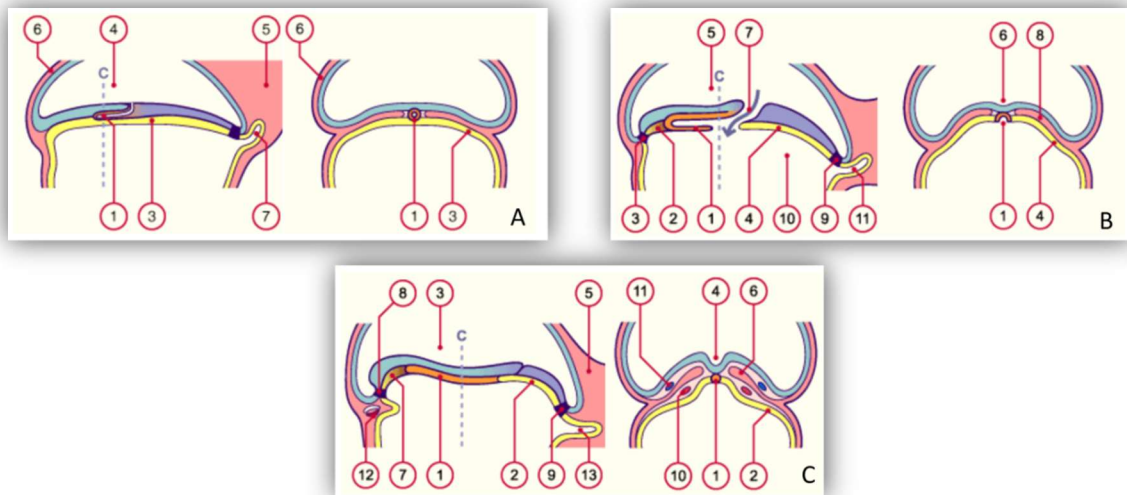


Figure 4 : Formation de la chorde

<http://www.embryology.ch/francais/hdisqueembry/triderm03.html>

A j19 (A) le processus notochordal (1) est formé par l'invagination en doigt de gant de cellules ectoblastiques dans la région du nœud primitif en direction de l'extrémité céphalique et suivant la ligne médiane. (3) entoblaste embryonnaire, (4) cavité amniotique, (5) pédicule embryonnaire, (6) mésoblaste extra-embryonnaire, (7) allantoïde.

A j23 (B) le processus notochordal (1) fusionne avec l'entoblaste sous-jacent et forme un canal transitoire au niveau du nœud primitif canal neurentérique (7). (2) plaque préchordale, (3) membrane bucco-pharyngienne, (4) entoblaste embryonnaire, (5) cavité amniotique, (6) gouttière neurale, (8) mésoblaste intra-embryonnaire, (9) membrane cloacale, (10) vésicule vitelline, (11) allantoïde.

A j25 (C) la notochorde (1) se détache de l'entoblaste pour former un cordon plein situé au sein du mésoblaste. (2) entoblaste embryonnaire, (3) cavité amniotique, (4) gouttière neurale, (5) pédicule embryonnaire, (6) mésoblaste intra-embryonnaire, (7) plaque préchordale, (8) membrane bucco-pharyngienne, (9) membrane cloacale, (10) aorte, (11) veines, (12) ébauche cardiaque, (13) allantoïde.

1.2.1 Mise en place du tube neural

La mise en place du système nerveux débute par la mise en place de la chorde qui sert d'inducteur de l'ectoblaste dans la différenciation de la plaque neurale. La couche de cellules au niveau de l'ectoderme va se densifier et le feuillet va s'épaissir pour former la plaque neurale (Fig. 5). Les bords de cette plaque vont s'épaissir pour former les bourrelets neuraux et se replier sur eux-mêmes, pour finir par fusionner et passer d'une gouttière neurale au tube neural. Cette fusion débute au niveau central de l'embryon et se propage vers les extrémités crânio-caudales où se situe le neuropore antérieur, qui se ferme à j26, et le neuropore postérieur, qui se ferme quant à lui à j28. Le tube neural est donc comparable à un cylindre creux où la lumière porte le

nom de canal épendymaire, et les parois celui de neuroépithélium. En fusionnant, les bourrelets neuraux laissent apparaître une nouvelle structure, les crêtes neurales. Les cellules des crêtes neurales vont par la suite migrer et donner naissance à différentes structures comme les ganglions spinaux et sympathiques ou encore les cellules de Schwann, responsables de la myélinisation dans le SNP. La partie du tube neural située juste au-dessus de la corde se différencie en plaque du plancher, et la partie du tube neural située juste au-dessous de l'ectoderme porte le nom de plaque du toit (Fig. 5). De chaque côté du tube neural, le mésoderme s'épaissit et se subdivise en structures appelées somites, qui sont les précurseurs de la musculature et du squelette axial.

Le tube neural va donner au cours du développement les différentes vésicules cérébrales (prosencephale / mésencéphale / rhombencéphale), ainsi que la moelle épinière.

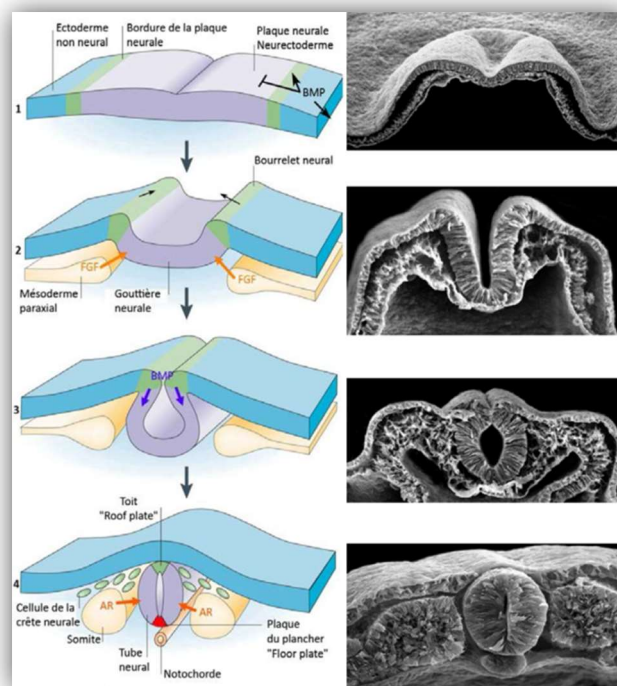


Figure 5 : Neurulation

Schémas d'après (Gammill and Bronner-Fraser 2003); microscopie électronique à balayage d'embryon de poulet (Colas and Schoenwolf 2001)

(1) Formation de la plaque neurale à partir de l'ectoderme. (2) Formation de la gouttière neurale. (3) Les bords se replient sur eux-mêmes pour finir par fusionner et donner le tube neural (canal épendymaire et neuroépithélium) ainsi que les crêtes neurales (situées entre ectoderme et le tube neural). (4) Maturation du tube neural composé du canal épendymaire et du neuroépithélium (plaque du toit et plaque du plancher).

1.2.2 Le neuroépithélium

1.2.2.1 Les mécanismes moléculaires de différenciation

Le bon développement du système nerveux fait appel à des mécanismes de régulation très sophistiqués. Bergmann, Gregor et Harfe et collègues ont décrit chez la drosophile et la souris une modulation de l'expression de certains gènes par une variation temporelle (durée d'exposition) et spatiale de gradients de diffusion de molécules de signalisation endogènes (Harfe *et al.* 2004; Bergmann *et al.* 2007; Gregor *et al.* 2007). On peut alors décrire la différenciation du tube neural selon deux axes ; l'axe dorso-ventral et l'axe crânio-caudal. La variété des cellules neurales qui seront produites auront des fonctions spécifiques selon leur position le long de ces deux axes.

a. Différenciation dorso-ventrale

Dans le tube neural embryonnaire, des signaux inducteurs influencent la mise en place des axes ainsi que la détermination de l'identité cellulaire. Lors de sa formation, la transformation des cellules ectoblastiques en cellules neurales se ferait par défaut (Fig. 6 (1)). Toutefois, la BMP (Bone Morphogenetic Protein), membre de la famille du TGF- β (Transforming Growth Factors- β), synthétisée au niveau des cellules ectodermiques, inhiberait cette différenciation (Fig. 6 (2), (3)). Mais cette molécule est à son tour inhibée par la chordine, le noggin et la follistatine, trois molécules provenant de la chorde (Fig. 6 (4), (5)). De plus, les FGFs (Fibroblast Growth Factors) agissent en inhibant la transcription de la BMP à un stade plus précoce (Fig. 6 (6)) (Bier and De Robertis 2015).

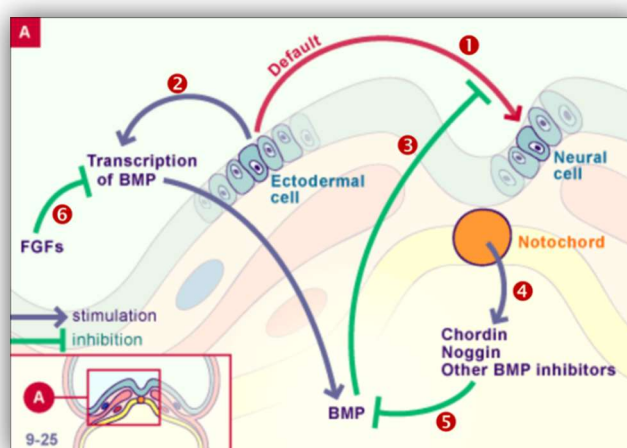


Figure 6 : Mécanismes moléculaires impliqués dans la formation du tube neural coupe transversale (entre j9 et j25)

<http://www.embryology.ch/francais/vcns/tubecrete02.html>

Une fois le tube neural formé, les gradients de Sonic Hedgehog (Shh), molécule synthétisée par la corde et la plaque du plancher (floor plate), et de molécules de la famille du TGF- β , principalement les BMPs, molécules synthétisées par la plaque du toit (roof plate), vont déterminer respectivement les patrons d'expressions ventral et dorsal (Fig. 7).

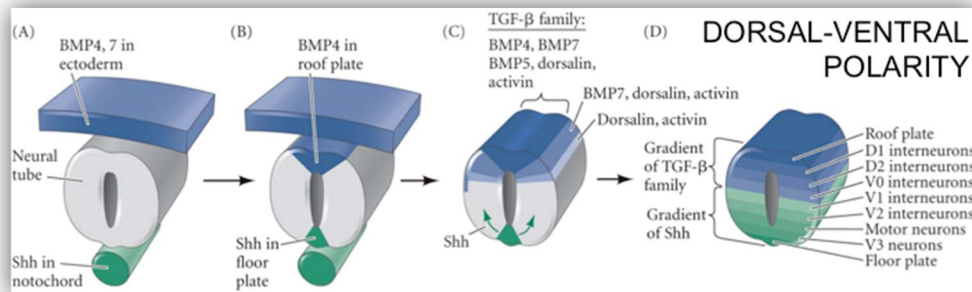


Figure 7 : Gradients d'expression de différentes molécules aidant à l'élaboration de l'identité cellulaire au sein du tube neural axe dorso ventral (coupe transversale)

d'après (Gilbert 2000b)

La polarité du tube neural selon l'axe dorso ventral est établie par les molécules de la famille du TGF- β (BMPs, dorsaline, activine) au niveau de l'ectoderme et du Shh au niveau de la corde. Cette sécrétion entraîne la formation de la plaque du toit (roof plate) et de la plaque du plancher (floor plate).

Ainsi les gradients de Shh et de molécules de la famille du TGF- β vont organiser le tube neural en stimulant des facteurs de transcriptions spécifiques (Pax6, Irx3, Dbx2, Pax7, Nkx2.2, Nkx6.1), laissant apparaître les futurs interneurons, ou motoneurons (Casarosa *et al.* 2013).

b. Différenciation crânio-caudale

La différenciation crânio-caudale, s'effectue selon deux points. Tout d'abord, des signaux moléculaires comme l'acide rétinoïque (RA), les Fibroblasts Growth Factors (FGFs) ou les Wnts (Kudoh *et al.* 2002), sont produits par le mésoderme axial, para-axial et l'endoderme. Ils exercent un gradient de concentration allant de la partie caudale à la partie crâniale (Fig. 8). Ils sont responsables de la modification du mésencéphale, rhombencéphale, et de la partie antérieure de la moelle épinière. Le RA agit sur les gènes Hox, nécessaires au contrôle du « plan d'organisation segmentaire » et de la régionalisation de l'embryon, particulièrement du cerveau et de la moelle épinière. Les gènes Hox sont des gènes homéotiques codant pour des facteurs de transcription qui se lient à une séquence spécifique de l'ADN génomique appelé homeobox. Ces gènes ont été mis en évidence par Lewis dans les années 1970 sur la drosophile (Lewis 1978), et ont été décrits dans de nombreuses espèces, notamment chez l'Homme.

De plus, il existe deux centres de signalisation secondaires qui sont le front neural antérieur (FNA) et l'organisateur isthmique (OIs) (Fig. 8) (Wurst and Bally-Cuif 2001). Le FNA est situé au niveau de la limite du prosencéphale et de l'ectoblaste non neural. Cette structure sécrète des molécules organisatrices comme le noggin, ou la chordin, qui vont inhiber l'action du BMP qui va conduire à la production de FGF₈. Il en résulte l'expression de facteur de transcription comme le facteur FoxG1 qui selon Anderson est nécessaire au développement du prosencéphale (Anderson *et al.* 2002). L'OIs est situé au niveau de la jonction entre le mésencéphale et le rhombencéphale. Cette structure joue un rôle extrêmement important lors de la mise en place antéro-postérieure de l'encéphale. Cette structure est responsable de la sécrétion de FGF₈ (Casarosa *et al.* 2013), molécule impliquée dans le développement et la mise en place de l'architecture cérébrale durant le stade embryonnaire. Il constitue la limite entre deux facteurs de transcription de gradients inverses, Otx2 (Orthodenticle Homeobox 2) et Gbx2 (Gastrulation brain homeobox 2). Le gène Otx2 code un facteur de transcription jouant un rôle primordial dans le développement du cerveau, mais aussi influence la prolifération et la différenciation de progéniteurs neuraux dopaminergiques. Le gène Gbx2 quant à lui code un facteur de transcription exprimé préférentiellement pendant la gastrulation mais qui continue à être exprimé pendant les différentes étapes embryonnaires. Il est responsable du bon développement du rhombencéphale et du cerveau en général.

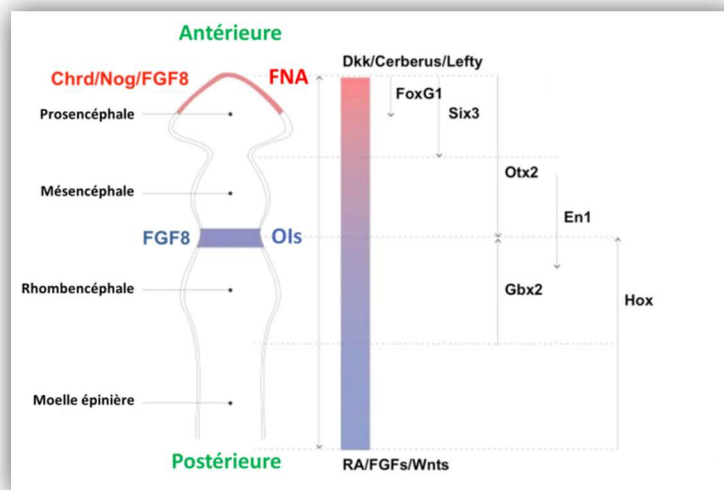


Figure 8 : Facteurs moléculaires influençant le développement antéro-postérieur du tube neural pendant le développement embryonnaire

D'après (Casarosa et al. 2013)

c. Principales voies de signalisation

« On-State » le Shh (ou les ligands Hedgehog) va être excrété dans le milieu extracellulaire où il va être activé par clivage de sa partie N-terminale. Le Shh va donc pouvoir se fixer sur le récepteur Patched (PTCH1) et sur les co-récepteurs CDO / BOC. De cette liaison résulte la translocation au niveau de la membrane plasmique du cil primaire du récepteur couplé à une protéine G α i (RCPG), Smoothened (Smo). Smo catalyse la dissociation de la protéine Gli et du complexe SuFu / COS2 (=Kif7 chez les vertébrés) en un complexe activateur Gli 1/2. Ce complexe est alors transloqué au niveau du noyau et va activer les gènes cibles Hedgehog (Cycline D, E...). A droite du schéma, « off-State », l'absence de Shh (ou de ligand Hedgehog) sur le récepteur de PTCH1 et les co-récepteurs CDO / BCO, réprime l'incorporation membranaire du RCPG Smo au niveau du cil primaire. Le complexe SuFu / COS2 (ou Kif 7 chez les vertébrés) séquestre le facteur de transcription Gli dans le cil primaire. Gli1/2/3 va être phosphorylé par des kinases (PKA, CK1, GSK-3 β), et sera alors reconnu par une enzyme, la β -TrCP. Ce complexe va être dégradé par les protéasomes et seul le complexe Gli3-R (pour répresseur) va pouvoir être transloqué dans le noyau. Ceci conduit à une répression des gènes cibles Hedgehog (Yang *et al.* 2015).

▫ Transforming Growth Factor- β (TGF- β)

La superfamille du TGF- β comprend différents facteurs de transcription comme la protéine TGF- β , les BMPs, les GDFs (Growth Differentiation Factors), les GDNFs (Glial-derived Neurotrophic Factors), les Activines, les Inhibines, le Nodal, le Lefty, et le MIS (Müllerian Inhibiting Substance). Le TGF- β est synthétisé de façon ubiquitaire dans l'organisme et il contrôle la prolifération, la différenciation, l'adhésion et la migration cellulaire ainsi que d'autres fonctions dans la plupart des cellules. Trois isoformes structurellement très proches existent, le TGF- β 1, le TGF- β 2 et le TGF- β 3. Le gène TGF- β 1 est fréquemment surexprimé dans les cellules tumorales, le gène TGF- β 2 quant à lui est impliqué dans les troubles du développement, et le gène TGF- β 3 code une protéine impliquée dans l'embryogénèse et la différenciation cellulaire, mais sa sous-expression peut conduire à des pathologies du trouble de la conduction cardiaque du ventricule droit jusqu'à la cardiomyopathie. Au vu de ces propriétés relativement larges et parfois contradictoires, il est impliqué dans pratiquement tous les grands processus physiopathologiques comme la prolifération ou encore l'établissement de cancers (Bartram and Speer 2004) (Akhurst and Hata 2012). Différentes voies de signalisations peuvent être décrites mais seule la voie canonique sera développée ici (Fig. 10).

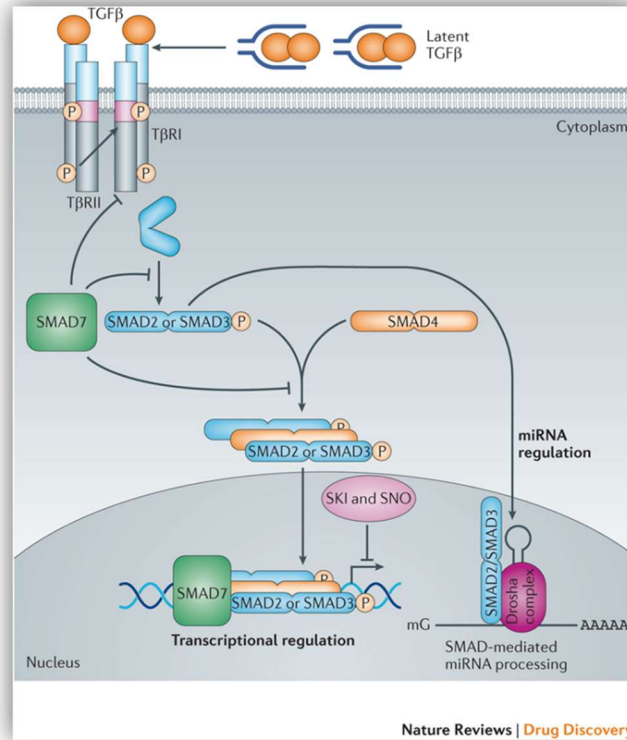


Figure 10 : Voie de signalisation du TGF-β (Transforming Growth Factors β)

(Akhurst and Hata 2012)

Le ligand TGF-β est synthétisé sous forme d'un pro-complexe « Latent TGF-β ». Ce pro-complexe est constitué d'un dimère de TGF-β associé avec un peptide de la latence, LAP (latency-associated peptide) et une protéine de latence de liaison au TGF-β, LTBP (latent TGFβ-binding protein), non montré sur ce schéma. Lors de l'activation, les dimères TGF-β induisent la formation du complexe hétéromère entre les récepteurs serine / thréonine kinase le type I (TβRI) et II (TβRII). Le récepteur de type II va pouvoir transphosphoryler le récepteur du type I, et ainsi phosphoryler Smad2 et Smad3. Ils forment alors un complexe hétéromère avec Smad4, qui est par la suite transloqué vers le noyau. Une fois dans le noyau, ce complexe va pouvoir se fixer au niveau des gènes cibles. Cette voie est régulée à différents niveaux. Les protéines nucléaires SKI et SNO (également connues sous le nom de SKIL) sont des antagonistes de la régulation transcriptionnelle du complexe Smad. Au niveau cytoplasmique, Smad7 inhibe la voie de TGF-β par de multiples mécanismes, comme la dégradation du récepteur de type I, l'inhibition de la phosphorylation des Smad2 ou Smad3, ou encore l'inhibition de la formation du complexe Smad2/3 et Smad4. De plus, le complexe Smad2/3 peut réguler l'expression de microARN (miARN) responsables de la transcription, en facilitant le passage de miARN primaires en miARN précurseurs.

▫ *Bone Morphogenetic Proteins (BMP)*

Les BMPs sont des facteurs de transcription appartenant à la superfamille du TGF-β, initialement découverts lors de l'induction de la formation du tissu osseux et du cartilage. Ils sont aujourd'hui connus pour jouer un rôle crucial lors du développement embryonnaire mais aussi dans le maintien de l'homéostasie chez l'adulte (Wang *et al.* 2014).

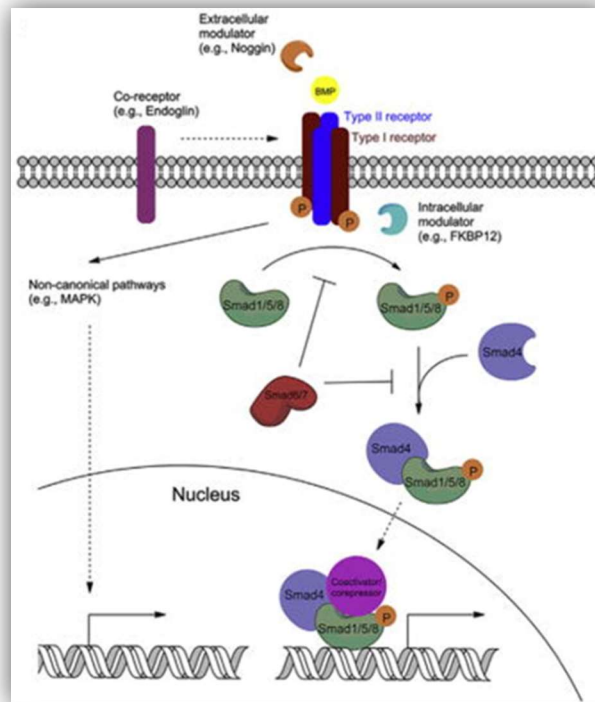


Figure 11 : Voie de signalisation des BMPs (Bone Morphogenetic Proteins)

d'après (Wang et al. 2014)

Les facteurs de transcription de la famille des BMPs vont se fixer sur les récepteurs sérine / thréonine kinase type I ou type II pour former un complexe hétérotétramérique. Le récepteur de type II va transphosphoryler le récepteur de type I qui va alors pouvoir phosphoryler Smad1/5/8. Celui-ci va pouvoir s'associer à Smad4. Le complexe Smad4 / Smad1/5/8 va être transloqué dans le noyau où il sera associé de nouveau à un co-activateur ou co-répresseur de manière à réguler l'expression génique. La voie des BMPs peut-être régulée à différents niveaux, notamment par la voie des MAPK mais aussi au niveau extracellulaire par le noggin et la chordin qui se lient directement aux BMPs empêchant leurs fixations sur les récepteurs sérine / thréonine kinase et donc la modulation génique. Cette régulation peut avoir lieu au niveau intracellulaire par FKBP12, des miRNAs, des phosphatases, I-Smads ou le co-récepteur Endoglin au niveau de la membrane plasmique.

▫ Wnt

Les voies de signalisation Wnt sont hautement conservées tout au long de l'évolution. Elles ont été identifiées initialement lors de la morphogenèse chez la drosophile, et par la suite comme jouant un rôle prépondérant dans le développement embryonnaire. Il apparaît donc normal que les anomalies rencontrées pour ce facteur entraînent de nombreuses pathologies, comme le cancer du côlon (Zhang *et al.* 2015), ou le cancer du sein (Lu *et al.* 2015). Les Wnts sont des glycoprotéines dont le nom vient de la contraction de Wg pour « wingless », sans ailes et Int pour « integration site », site d'intégration. Le facteur Wnt inhibe l'action du FGF et va donc renforcer l'action du BMP (induction de l'épiderme).

Trois voies de signalisation pour le Wnt sont décrites. La voie Wnt canonique, première voie largement étudiée chez la drosophile, la mouche ou encore la souris et qui conduit à la régulation de gènes de transcription (Komiya and Habas 2008). Elle se caractérise par une accumulation et une translocation au niveau du noyau de protéine β -caténine, mais sans Wnt la β -caténine est dégradée (Fig. 12 (A)). La voie de signalisation de la polarité cellulaire non canonique (PCP) « The Non-Canonical Planar Cell Polarity Pathway » fait souvent référence à la voie β -caténine indépendante et peut être divisée en deux sous-ensembles, la voie PCP (Fig. 12 (B)) et la voie Wnt/ Ca^{2+} (Fig. 12 (C)). La voie PCP conduit à l'activation de différentes cascades enzymatiques comme JNK, ou de différents facteurs comme le Rock, qui jouent un rôle dans les modifications du cytosquelette lors de la polarisation de la cellule et de la motilité pendant la gastrulation. La voie Wnt/ Ca^{2+} , régule négativement la formation de l'axe dorso-ventral, mais aussi arbitre la séparation des tissus et du mouvement cellulaire pendant la gastrulation via la calmoduline et calcineurine (Komiya and Habas 2008).

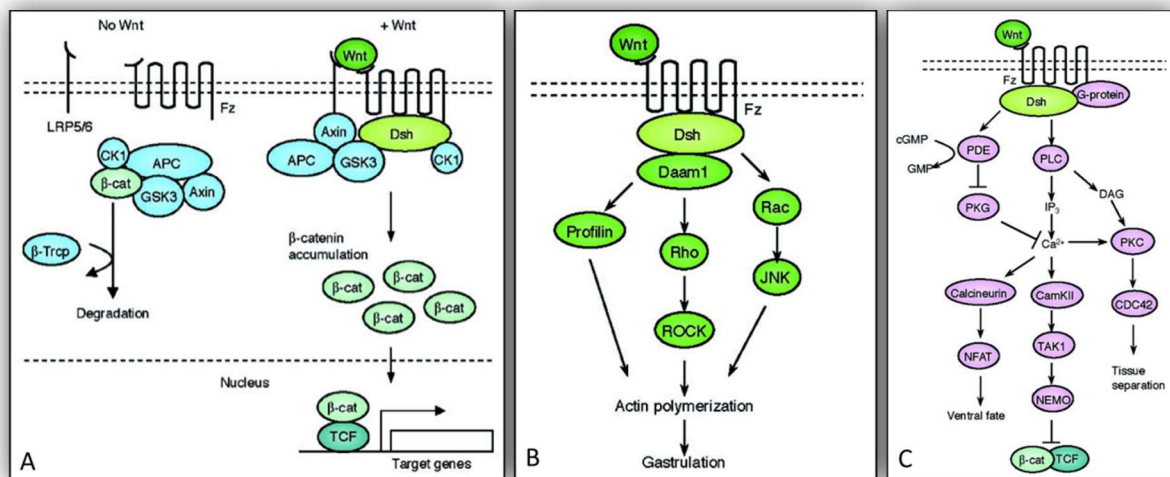


Figure 12 : Voie de signalisation du Wnt

D'après (Komiya and Habas 2008)

Représentation schématique de la voie canonique Wnt (A). En absence de ligand Wnt (à gauche), le complexe Axine (suppresseur de tumeur), APC (Adenomatosis Polyposis Coli), GSK-3 β et CK1 α (caséine kinase 1 α) se lie à la β -caténine. La β -caténine est alors phosphorylée, grâce à l'activité kinase de la GSK-3 β , puis poly-ubiquitinilée par la ligase E3 β -Trcp et enfin dégradée par les protéasomes. Les quantités de β -caténine libre sont alors très faibles voire inexistantes. Les facteurs de transcription TCF (T cell factor) / LEF (lymphoid enhancer factor) sont réprimés par Groucho dans le noyau. En présence de Wnt ((A) côté droit), Wnt se fixe sur un complexe de récepteur comprenant le récepteur LRP5/6 (Low density lipoprotein Related Protein) et un RCPG Frizzled (Fz). Il en résulte la double phosphorylation de LRP6 par CK1 et GSK3- β , ce qui permet la translocation du cytosol à la membrane plasmique d'un complexe protéique contenant l'Axine. L'Axine se fixe au récepteur phosphorylé LRP5/6 et va interagir avec la protéine dishevelled (Dsh) recrutée par Fz. GSK-3 β sera alors piégé par ce complexe et ne pourra pas phosphoryler la β -caténine. Elle s'accumule dans le cytoplasme et est transloquée dans le noyau où elle

s'associe aux facteurs de transcription TCF/LEF, réprime l'action de Groucho et contrôle la transcription de gènes cibles. Il existe de nombreuses voies de régulation de Wnt / β -caténine, notamment grâce à différents agonistes (RSPO, norrin) ou des antagonistes (DKK1, SOST et Wise). De plus la N-cadhérine inhibe aussi la voie Wnt / β -caténine en interagissant avec LRP5. Représentation schématique de la voie PCP (B). Dans la voie PCP, Wnt en se liant à Fz permet le recrutement des récepteurs tyrosine kinase ROR ou RYK indépendamment des récepteurs LRP5/6. La protéine Dsh est recrutée et Daam1 peut alors s'associer au complexe pour déclencher l'activation de Rho en Rho protéine kinase (ROCK). Damm1 active aussi la polymérisation d'actine, par sa liaison avec la protéine Profiline. Dsh peut aussi former un complexe avec Rac qui va pouvoir activer JNK. Les différents signaux provenant de ROCK, Profiline, et JNK vont permettre le changement de la morphologie cellulaire par l'intermédiaire de son cytosquelette et donc le changement de la mobilité cellulaire pendant le stade de gastrulation. (C) représentation schématique de la voie Wnt/ Ca^{2+} . La fixation du ligand sur Fz permet le recrutement de Dsh via l'activation d'une protéine G. Dsh active la phosphodiesterase PDE qui inhibe l'action de PKG et donc la libération de Ca^{2+} . De plus Dsh permet la production d'IP3 et de DAG par l'intermédiaire de PLC. DAG, par l'intermédiaire de PKC, active CDC42, qui contrôle la séparation tissulaire et donc la migration des cellules pendant la gastrulation. Ip3 conduit à la libération cytoplasmique de Ca^{2+} , ce qui entraîne l'activation de la CamK11 et de la calcineurine. La calcineurine active NF-AT, qui régule le devenir des cellules ventrales. CamK11 active TAK et NLK, qui vont inhiber l'action du complexe β -caténine / TCF au niveau nucléaire, de manière à réguler de façon négative la formation de l'axe dorsal de l'embryon.

▫ Fibroblast Growth Factor (FGF)

Les membres de la famille des FGF se lient à l'héparine et sont impliqués dans de nombreux processus biologiques comme l'angiogenèse, la cicatrisation, le développement embryonnaire, la croissance et la survie cellulaire, mais aussi lors de processus pathologiques comme le développement de tumeurs (Goetz and Mohammadi 2013). Cette famille est composée d'au moins 24 membres, agissant sur des récepteurs spécifiques. Plusieurs membres de cette famille apparaissent comme incontournables lors du développement embryonnaire comme le FGF₂ (ou FGF basique), ou encore le FGF₈.

Le FGF₂ est produit par les cellules épithéliales, tumorales ou encore de nombreux autres types cellulaires mais il est présent en concentration élevée dans le cerveau et l'hypophyse. Il est nécessaire pour l'auto-renouvellement et la pluripotence des cellules souches (iPSc ou hESc) (Dvorak *et al.* 2006) en régulant notamment l'expression du facteur de transcription Oct4 (Ding *et al.* 2010). De plus, le FGF₂ module la voie de signalisation de Wnt en jouant sur la phosphorylation de GSK-3 β . La β -caténine en excès est alors transloquée dans le noyau et va pouvoir activer le complexe TCF/LEF, et ainsi maintenir la pluripotentialité des iPSc ou des hESc (Ding *et al.* 2010).

Le FGF₈ joue un rôle important lors du développement et de la mise en place de l'architecture du cerveau durant le stade embryonnaire. Il est exprimé dans la région où les gradients de Otx2 et Gbx2 s'inhibent, mais aussi au niveau de la FNA.

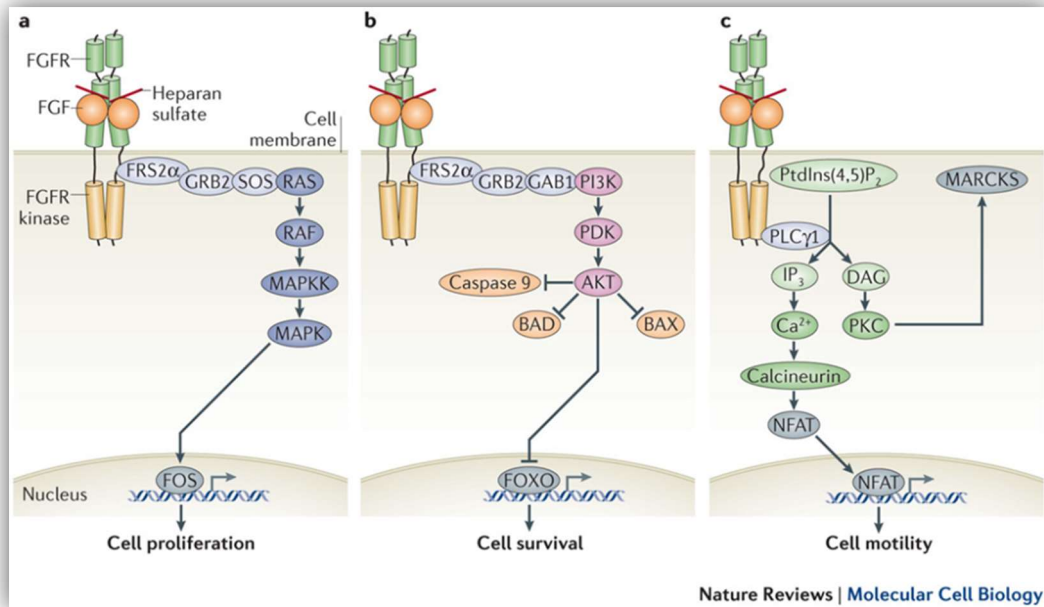


Figure 13 : Voie de signalisation du FGF

(Goetz and Mohammadi 2013)

La liaison de FGF aux récepteurs FGFR induit leurs dimérisations, ce qui permet la juxtaposition intracellulaire de leurs domaines Tyrosine Kinase et donc leurs transphosphorylations. Les récepteurs une fois activés vont activer à leur tour leurs substrats intracellulaires par phosphorylation. Le substrat privilégié est le FGFR substrat 2 α (FRS2 α), qui est associé avec la phospholipase γ 1 (PLC γ 1). Le FRS2 α activé va se lier à la protéine adaptatrice GRB2 (Growth factor Receptor-Bound 2). GRB2 va soit recruter (a) SOS (Son Of Sevenless) soit (b) une protéine adaptatrice GAB1 (GRB2-associated binding protein 1). Le recrutement de SOS active la protéine Ras GTPase, qui va alors initier la cascade MAPK, être transloquée vers le noyau, et activer l'expression de certains gènes, comme par exemple FOS, impliqué dans la prolifération cellulaire. Il résulte de cette voie la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire ainsi que de nombreuses autres réponses cellulaires. (b) GAB1 conduit à l'activation d'une protéine kinase AKT par l'intermédiaire de PI3K. L'AKT kinase a deux fonctions principales qui sont l'inactivation d'effecteurs pro-apoptotiques comme BAD (BCL-2 Antagonist of cell Death), BAX (BCL2-associated X protein) et la caspase 9, mais aussi l'inactivation de facteur de transcription FOXO (forkhead box class O), conduisant à la survie cellulaire. (c) Le recrutement et la phosphorylation de PLC γ 1 par la partie kinase du récepteur FGFR initie une voie de signalisation ayant pour finalité la migration et la différenciation cellulaire, et pouvant aussi influencer les deux autres voies (a) (b). Une fois PLC γ 1 activé, elle va catalyser l'hydrolyse d'un phospholipide membranaire, le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P₂) en diacylglycerol (DAG) et inositol-1,4,5-trisphosphate (IP₃). DAG active une protéine kinase C (PKC) qui à son tour active par phosphorylation MARCKS (myristoylated Ala-rich C kinase substrate), régulateur de la motilité cellulaire. IP₃ stimule la libération de Ca²⁺ des compartiments intracellulaires et déclenche l'activation de la calcineurine, protéine calcium dépendante. L'activation de cette protéine induit la translocation nucléaire du facteur de

transcription NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells), et stimule l'expression de protéines essentielles pour la motilité cellulaire.

▫ Acide Rétinoïque (RA)

L'acide rétinoïque est un métabolite de la vitamine A ou rétinol, nécessaire au développement et à la croissance. Au cours du développement, il est synthétisé par le mésoderme axial, para-axial, et l'endoderme. Le RA est une molécule de signalisation intercellulaire qui participe à la détermination de l'axe crânio-caudal en guidant la partie postérieure de l'embryon. Il régule le développement des interneurones et des motoneurones le long de l'axe dorso-ventral. Il joue un rôle sur l'activation de signaux inducteurs comme de Shh, le FGF₈ (Kumar and Duester 2014) et les gènes Hox. Le rôle du RA est complexe, car il participe au bon développement mais peut avoir un effet tératogène en fonction de sa concentration (ni en excès ni en défaut) et de son lieu d'action (Ruberte *et al.* 1991). Ainsi, il est important de rappeler que certains médicaments et aliments sont à proscrire lors de la grossesse comme certains traitements contre l'acné rebelle, l'Accutane® (ou acide 13-cis-rétinoïque) par exemple.

Les récepteurs au RA ont été découverts lors des années 1980, et appartiennent à la super famille des récepteurs des hormones stéroïdes et thyroïdiennes. La voie de signalisation est médiée par 2 sous-types de récepteurs nucléaires : récepteur RA (RAR) et récepteur rétinoïde X (RXR) agissant comme des facteurs de transcription.

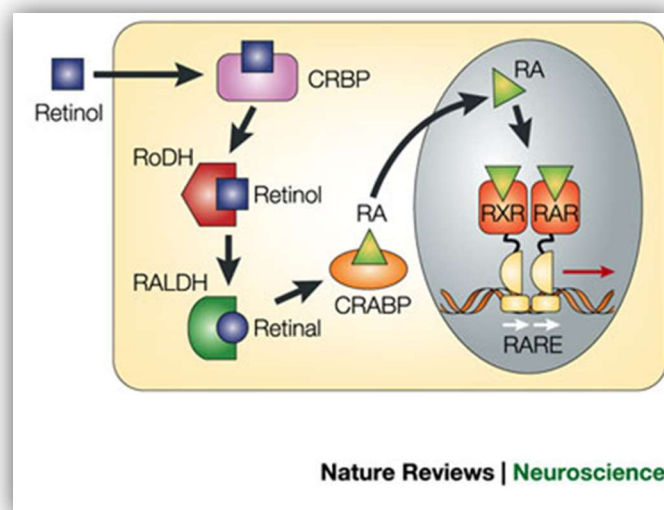


Figure 14 : Voie de signalisation de l'acide rétinoïque

(Maden 2002)

Le rétinol se lie au niveau du compartiment cytoplasmique à la protéine CRBP (Cellular Retinol-Binding Protein). L'enzyme RoDH pour rétinol déshydrogénase métabolise le rétinol en rétinal. Le rétinal va par la suite être

métabolisé en acide rétinoïque par la rétinoldehyde dehydrogenase (RALDH). Le RA se lie alors à la protéine CRABP (Cellular RA-Binding Protein) afin de pouvoir être transloqué dans le noyau où il pourra se lier aux récepteurs RARs (RA Receptors) et RXRs (retinoid X receptors). Ces récepteurs, en absence de RA, sont fixés sur une séquence d'ADN portant le nom de séquence RARE (RA response element), et forment un complexe co-répresseur. En présence de RA, ce complexe va changer de conformation et pouvoir recruter un complexe co-activateur et donc induire la transcription de gènes cibles, les gènes Hox.

Le RA est couramment utilisé en culture cellulaire lors de nombreuses différenciations, comme par exemple lors de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses de la gelée de Wharton en motoneurones (Bagher *et al.* 2015), ou encore lors de la différenciation de cellules souches en précurseurs pancréatiques (Kroon *et al.* 2008), ou en cardiomyocytes (Wobus *et al.* 1997).

▫ Notch

La voie de signalisation Notch est très conservée au cours de l'évolution. Elle contrôle le devenir des cellules lors du développement embryonnaire (auto-renouvellement et prolifération) mais aussi elle maintient l'homéostasie au sein des tissus matures. Cette voie peut être déséquilibrée au cours des divisions asymétriques, ce qui aura pour effet l'adoption de devenirs cellulaires différents. Durant l'embryogénèse, la voie Notch réprimerait la voie neuronale en favorisant la voie gliale, mais aussi agirait sur les progéniteurs en réprimant la différenciation des neurones et oligodendrocytes et en stimulant celle des astrocytes (Roegiers and Jan 2004). La voie de signalisation Notch définit un mécanisme d'interactions cellulaires qui s'exerce essentiellement entre cellules voisines. Elle est médiée par des signaux juxtacrines où les cellules envoient et reçoivent en même temps les informations conduisant à la régulation de différentes cellules telles que les cellules neuronales, les cellules cardiaques ou encore les cellules endocrines (Teodorczyk and Schmidt 2014).

Les récepteurs Notch sont des protéines à un seul passage transmembranaire et comportant trois domaines, un domaine extracellulaire NECD (Notch ExtraCellular Domain), une partie transmembranaire NTM (Notch Transmembranair Domain), et un domaine intracellulaire NICD (Notch IntraCellular Domain). Elle peut être régulée à plusieurs niveaux, notamment par Numb, une protéine jouant un rôle dans la division asymétrique des cellules neurales. Cette régulation se ferait par poly-ubiquitination du récepteur Notch qui serait par la suite dégradé par les protéasomes (McGill and McGlade 2003).

D'un point de vue pharmacologique, cette voie de signalisation présente de nombreux intérêts en raison des nombreuses pathologies dans lesquelles elle est impliquée (maladie d'Alzheimer, glioblastome...).

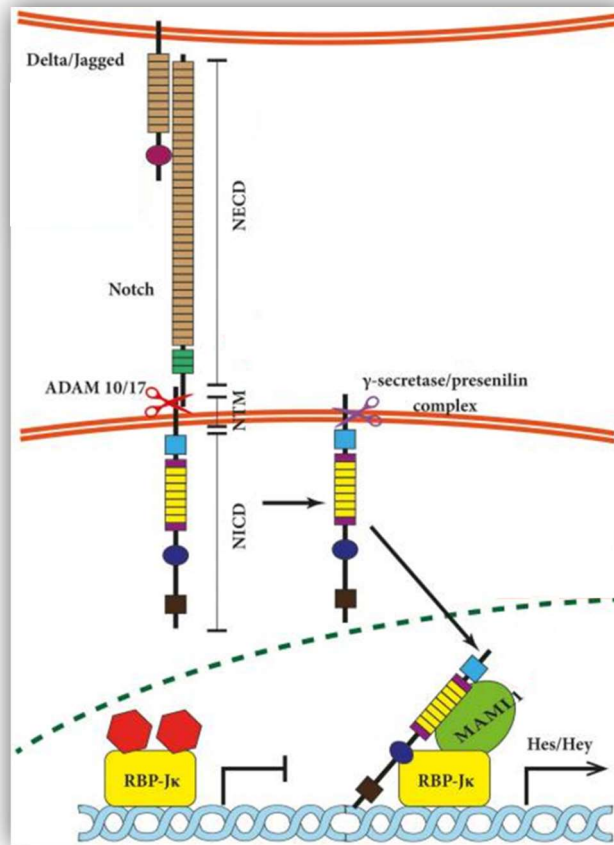


Figure 15 : Voie de signalisation de Notch

D'après (Teodorczyk and Schmidt 2014)

L'interaction entre le ligand Delta/Jagged et le récepteur Notch aboutit au clivage S2 du site extracellulaire NECD (Notch ExtraCellular Domain) par un complexe désintégrine et métalloprotéinase 10 (ADAM10) ou ADAM17. Il s'en suit un second clivage S3 de la partie transmembranaire NTM (Notch Transmembranair Domain) par un complexe γ -secretase–preseniline. La partie intracellulaire du récepteur Notch est alors transloquée dans le noyau, où NICD (Notch IntraCellular Domain) se lie à un complexe protéique RBP-J κ (recombination signal-binding protein J κ). En l'absence du fragment Nocth, RBP-J κ est lié à un complexe répresseur, empêchant ainsi la transcription de gènes cibles. L'interaction NICD / RBP-J κ conduit au recrutement d'un complexe activateur mastermind-like 1 (MAML1). Il en résulte la transcription de gènes cibles canoniques de la voie de signalisation Notch comme Myc, p21, et les membres de la famille Hes (hairy / enhancer of split).

1.2.2.2 Devenir des cellules du neuroépithélium

Cette étape se déroule en trois temps : la prolifération, la différenciation et la migration des cellules.

En premier lieu, il y a une phase de prolifération intense qui suit la fermeture du tube neural. Les cellules du neuroépithélium se multiplient par mitoses et passent d'un épithélium prismatique pseudostratifié à un épithélium pluristratifié. Durant cette étape, les noyaux vont évoluer en fonction du cycle mitotique vers les différents pôles des cellules. Parallèlement à ce phénomène, les cellules vont se déplacer dans l'épaisseur du neuroépithélium, c'est-à-dire de la lumière du tube neural, vers le bord externe du tube neural. Durant cette phase, les cellules souches neurales s'auto-renouvellent par divisions symétriques.

La phase de différenciation est composée de la neurogenèse puis de la gliogenèse. Il y a à la fois une différenciation spatiale (crâniale / caudale) mais aussi temporelle. Les neuroblastes apparaissent les premiers, suivis des glioblastes. Il en résulte une différence au niveau de la composition du neuroépithélium, qui se caractérise par trois couches : la couche ventriculaire, au niveau de la lumière du tube neural, la couche du manteau et la couche marginale, au niveau du bord externe du tube neural. Le tube neural perd donc son caractère de neuroépithélium pluristratifié. Au cours de la phase de neurogenèse, des divisions asymétriques génèrent des neuroblastes qui migrent de la zone ventriculaire où ils sont produits, vers la zone externe du tube neural qu'ils colonisent en suivant les prolongements cellulaires de la glie radiaire (Hartfuss *et al.* 2001). Il faut noter que les neuroblastes perdent leur liaison avec la couche ventriculaire.

L'interaction entre cellules mais aussi la régulation de l'expression de certains gènes par des facteurs de transcription spécifiques, comme le BMP, noggin, TGF- β , Shh, RA ou Notch, sont les moteurs de cette différenciation (Fig. 16).

Néanmoins, ce mécanisme de différenciation est de plus en plus remis en question. D'après Malatesta et collègues (Malatesta *et al.* 2000), la glie radiaire présenterait l'avantage de pouvoir, après la neurogenèse, se différencier selon deux types majeurs de cellules, les neurones et les astrocytes. De plus, Pax6 serait un déterminant intrinsèque extrêmement important pour le potentiel neurogénique des cellules gliales (Heins *et al.* 2002). Enfin l'équipe de M. Götz a démontré que suite à une lésion du cerveau, les cellules gliales en dehors des niches de cellules souches cérébrales pouvaient acquérir ou réactiver leur « potentiel souche » dans le cadre de gliose réactive (Robel *et al.* 2011).

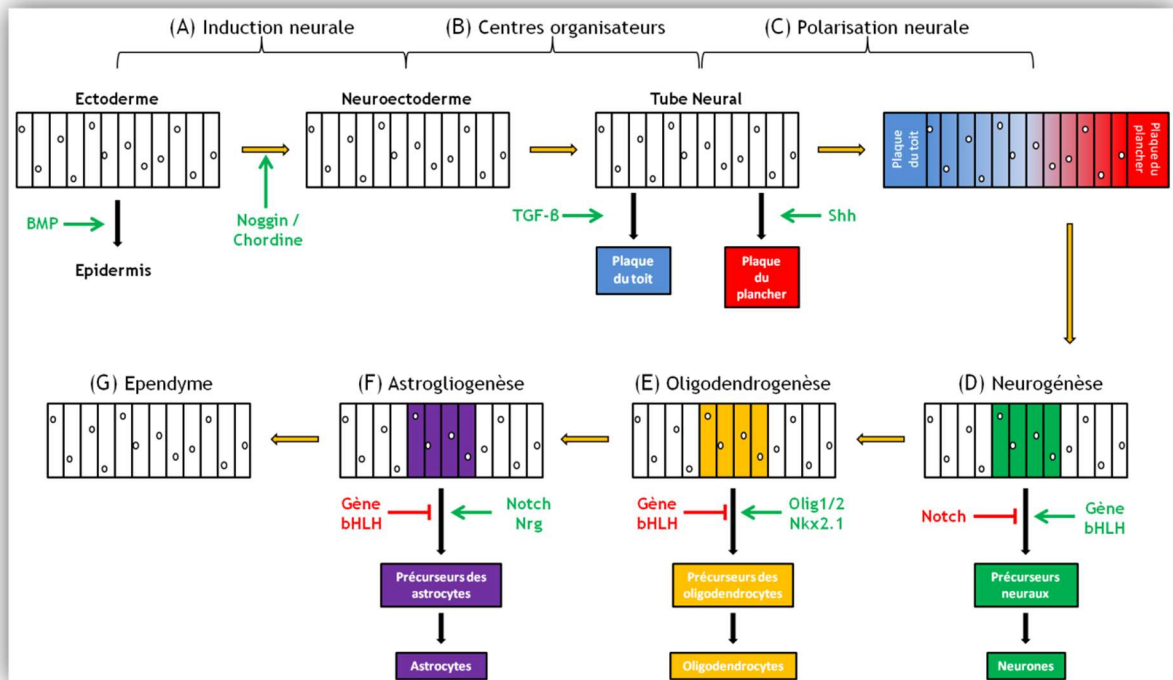


Figure 16 : Mécanismes moléculaires et cellulaires guidant la différenciation neurale dans le neuroectoderme

Le devenir de l'ectoderme (A) va dépendre de l'équilibre entre le BMP et ses antagonistes, le noggin et la chordine. Sous l'action du BMP, l'ectoderme donnera l'épiderme. Le neuroectoderme sera formé par défaut grâce à l'inhibition du BMP par le noggin et la chordine. Par la suite, les molécules organisatrices vont hiérarchiser le tube neural en plaque du toit, sous l'induction du TGF- β et plaque du plancher, sous l'induction du Shh (B). Des gradients de concentration s'opposent créant alors la polarisation du tube neural (C). La neurogenèse puis la gliogenèse se produisent sous l'influence de différents facteurs mais aussi grâce à la division asymétrique des cellules souches neurales. La neurogenèse (D) est inhibée par Notch et stimulée par bHLH. Ce dernier réprime la différenciation en oligodendrocytes et en astrocytes. Olig1/2 et Nkx2.1 sont nécessaires à l'obtention d'oligodendrocytes (E). Notch et Nrg sont indispensables pour le bon développement des astrocytes (F).

En résumé, la couche ventriculaire ou germinative est à l'origine des cellules souches du neuroépithélium donnant naissance par division asymétrique aux neuroblastes et aux glioblastes. Ces cellules migrent via la glie radiaire vers la couche du manteau. Elles donneront par la suite la substance grise. Les cellules restées au niveau de la couche ventriculaire vont pouvoir donner entre autres les cellules épendymaires. La couche marginale rassemble des cellules gliales et les axones et forme la substance blanche.

1.2.3 La Moelle épinière (ME)

Au stade embryonnaire, le tube neural est divisé en trois couches (ventriculaire, du manteau et marginale). La couche marginale contient essentiellement les fibres provenant des neurones du manteau. A un stade plus tardif, les axones s'entourent d'une gaine de myéline et cette zone marginale devient la substance blanche de la ME. La ME atteint sa structure définitive vers la dixième semaine. Elle fait suite au rhombencéphale et est prisonnière des corps vertébraux qui ont pour origine la chorde. On ne peut pas parler de la genèse de la ME sans évoquer la métamérie (ou segmentation). En effet durant le développement, la ME est segmentée, c'est-à-dire qu'à chaque segment correspond l'émergence de deux racines dorsales et de deux racines ventrales. De plus, ces racines sont en contact étroit avec les somites, structures issues de la fragmentation du mésoblaste para-axial, et qui par la suite donneront le sclérotome et le dermatomyotome. Il faut bien se rendre compte que l'embryon est organisé de façon segmentaire selon un plan de coupe dorso-ventral, mais cette métamérie est compliquée par les voies ascendantes et descendantes. Lors de la prolifération et de la différenciation des cellules neuroépithéliales et sous l'influence de différents facteurs, le tube neural va s'épaissir de façon plus importante du côté de la paroi du plancher. Le canal épendymaire va se rétrécir jusqu'à devenir un canal étroit au centre de la ME. Les lames basales motrices se développent en position ventrale de la ME, et contiennent les motoneurones et des interneurones. En position dorsale, les lames alaires sensibles se développent. Ces deux lames sont séparées par un sillon appelé sillon limitant. Vers la dixième semaine de développement, des neurones se disposent en position intermédiaire, au niveau thoracique et lombaire, formant la corne intermédiolatérale peuplée de neurones du SNA (Fig. 17).

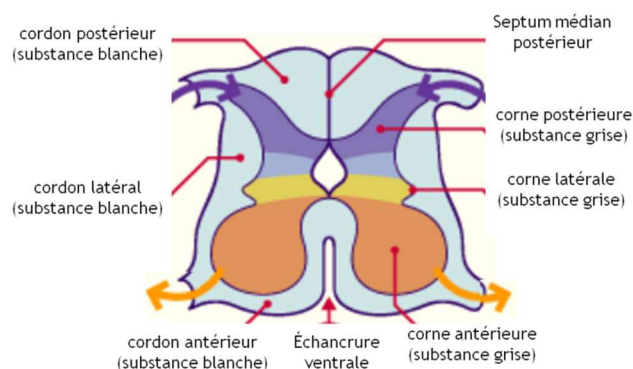


Figure 17 : Développement segmentaire de la moelle épinière à 10 semaines

D'après <http://www.embryology.ch/francais/vcns/moelle02.html>

La longueur de la ME varie au cours du développement embryonnaire. A huit semaines, la ME, engainée dans ces trois couches de méninges en formation (arachnoïde, pie-mère, dure-mère) occupe toute la longueur de l'embryon (Fig. 18). Le cône médullaire situé à l'extrémité caudale de la ME et symbolisé par la flèche noire sur la Fig. 18, se situe en regard de la 1^{ère} vertèbre coccygienne C1. A vingt-quatre semaines, la différence de croissance entre la colonne vertébrale et la ME est de plus en plus grande. La dure mère étant fixé à C1, et la colonne vertébrale s'allongeant plus vite que la ME, il en résulte l'apparition du filum terminal, aval du cône médullaire. A la naissance, l'extrémité de la moelle est au niveau de la troisième lombaire (L3). Chez l'adulte, la moelle se termine en L1-L2 mais la dure-mère et l'arachnoïde s'étendent jusqu'à la S2. Le filum terminal va s'étendre au-delà du cul de sac dural pour prendre la dénomination de filum terminal externe.

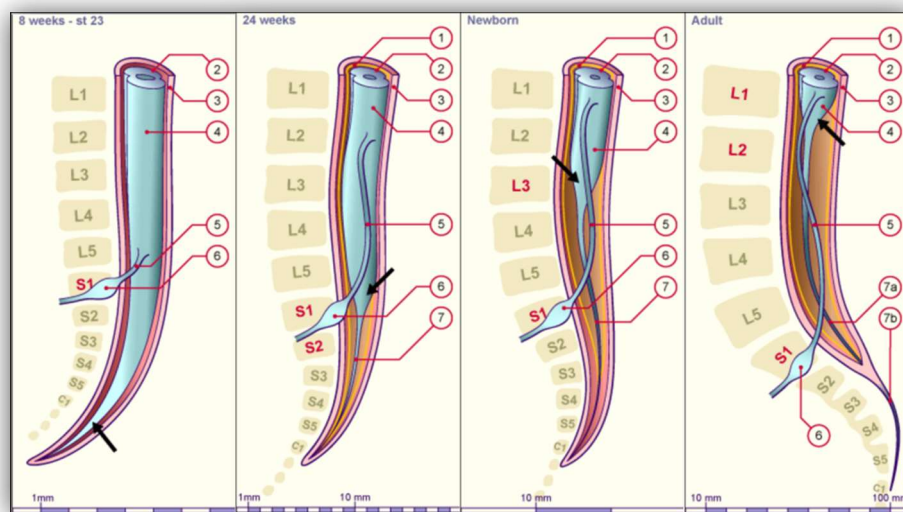


Figure 18 : Evolution de la moelle épinière entre 8 semaines et l'âge adulte

<http://www.embryology.ch/francais/vcns/moelle04.html>

(1) arachnoïde, (2) pie-mère, (3) dure-mère, (4) moelle épinière, (5) racine dorsale de S1, (6) ganglion spinal, (7) filum terminal, (7a) filum terminal interne, (7b) filum terminal externe, flèche noire : cône médullaire

1.3 Architecture du nerf périphérique

Le nerf périphérique est composé de fibres nerveuses myélinisées et amyéliniques organisées en faisceaux ou fascicules. Le nerf périphérique est entouré par l'épinèvre, formé de cellules conjonctives et de fibres de collagène. Le périnèvre, formé également de cellules conjonctives et de fibres collagènes, entoure les différents faisceaux de fibres nerveuses.

Chaque fibre nerveuse est entourée par une gaine de tissu conjonctif lâche, l'endonèvre (Fig. 19). Les fibres nerveuses sont composées d'axone et de cellules de Schwann.

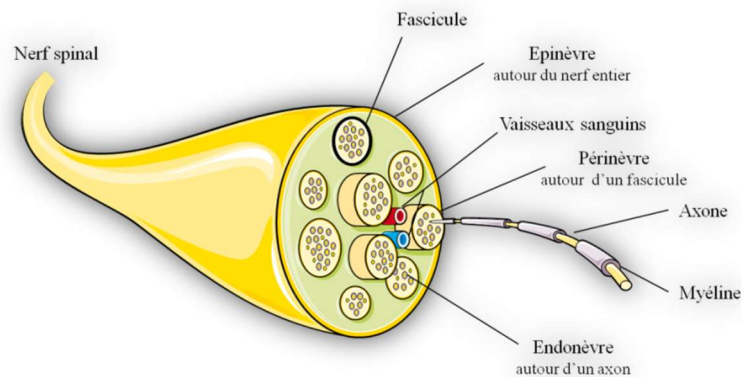


Figure 19 : Structure du nerf périphérique

1.3.1 Les neurones

1.3.1.1 Généralités

Les neurones présentent deux propriétés physiologiques majeures qui sont l'excitabilité et la conductibilité. Ils représentent l'unité structurale fonctionnelle de base du système nerveux. Ils doivent en effet être capables de répondre à un stimulus, de le convertir en une impulsion nerveuse, et de pouvoir transmettre cette impulsion grâce à la sécrétion de molécules chimiques. Les informations sont collectées par les extrémités (ou dendrites), et le corps cellulaire, puis sont analysées au niveau du corps cellulaire afin de transmettre une réponse adaptée à la cellule cible.

Les neurones possèdent les organites nécessaires au bon fonctionnement de ces propriétés physiologiques, et assurent donc une homéostasie énergétique correcte ainsi que l'apport nécessaire des différents métabolites. Leur morphologie dépend de leur topographie dans le SN mais aussi de la fonction qu'ils y occupent. Ainsi des neurones dont l'activité concerne une région réduite sont assez courts, comme les interneurones. A l'opposé, certains neurones assurant la communication entre des régions très distinctes, comme les motoneurones, ont un axone de plusieurs dizaines de centimètres de long.

Morphologiquement, les neurones sont généralement divisés en trois parties qui sont le corps cellulaire, les dendrites et l'axone.

- Le corps cellulaire ou soma contient un noyau volumineux. Il renferme le réticulum endoplasmique granuleux (REG), l'appareil de Golgi et des mitochondries

- transportées vers les dendrites et l'axone. Les agrégats de REG forment les corps de Nissl, qui sont aussi présents dans les dendrites mais totalement absents dans l'axone.
- Les dendrites : le nombre de dendrites est variable selon les neurones, et l'ensemble des dendrites d'un neurone porte le nom d'arbre dendritique. L'arbre dendritique est en constante évolution lors de la vie. La plasticité dendritique est modulée par la fréquence et la quantité de stimulations et donc par le nombre de connexions nécessaires pour répondre efficacement à ces stimuli nerveux. Elles présentent à leur surface des petites projections appelées épines dendritiques et généralement les mêmes organites que dans le soma sont retrouvés.
 - L'axone dialogue avec ses cellules effectrices par le biais de ses terminaisons, les terminaisons présynaptiques. La grande majorité de ces terminaisons sont de type chimique (libération de neurotransmetteurs spécifiques du type de neurone) mais il existe également des synapses électriques. La composition de l'axone sera traitée dans le chapitre suivant.

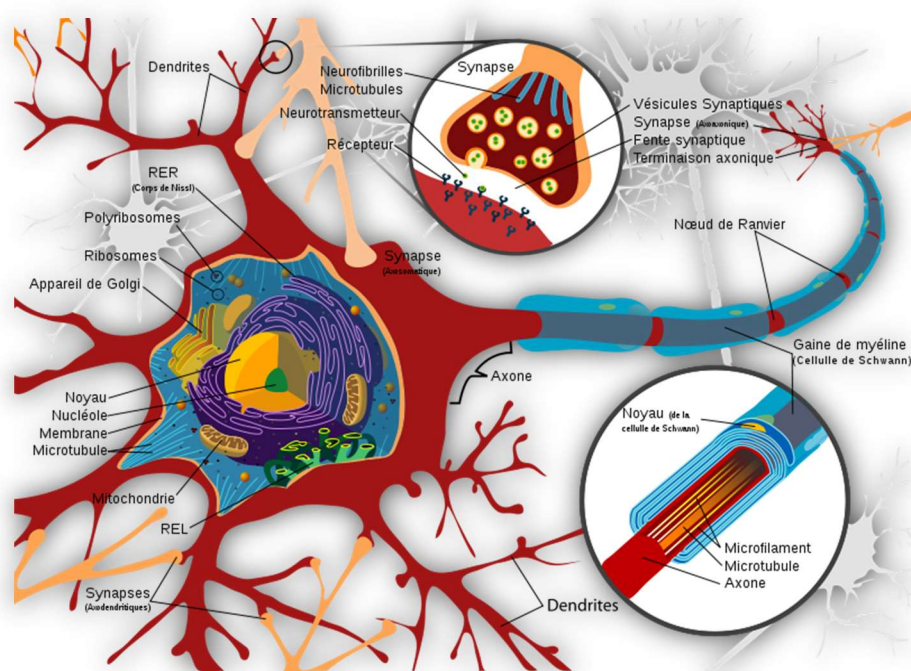


Figure 20 : Structure du neurone
(d'après Mariana Ruiz Villarreal)

1.3.1.2 L'axone

L'axone est le prolongement cytoplasmique du neurone qui se différencie des dendrites par son aspect lisse et son diamètre uniforme. Il est unique et son rôle principal est la

transmission de l'information nerveuse. La membrane plasmique de l'axone, ou axolemme, contient le cytoplasme, ou axoplasme, en continuité avec le soma.

L'axolemme forme une bicouche lipidique dont le rôle est primordial dans la conduction de l'influx nerveux, grâce à sa composition en protéines, responsable du potentiel de membrane (décrit au chapitre 6.3 Electrophysiologie et Patch clamp). Elle participe aussi aux communications entre neurone et cellules de Schwann. Avant de se terminer, l'axone se ramifie, et on parle alors d'arborisation terminale. Chaque ramification se termine par un renflement ou bouton synaptique. Ce bouton synaptique est doté des mêmes constituants que le corps cellulaire, en particulier de nombreuses mitochondries et un grand nombre de vésicules synaptiques mais peu de ribosomes et de lysosomes. Malgré la faible proportion de ribosomes, l'axone est capable localement de synthèse protéique notamment lors de la régénération du système nerveux (Willis and Twiss 2006).

L'axoplasme contient trois types de filaments qui constituent le cytosquelette de l'axone : les microfilaments d'actine, les microtubules et les neurofilaments.

Les microfilaments d'actine sont le résultat de la polymérisation de protéines globulaires d'actine, ou actine G, mesurant environ 7 nm de diamètre. Ils jouent un rôle dans la mobilité du cône axonal ainsi que lors de la mise en place des synapses.

Les microtubules, mesurant 25 nm de diamètre, sont des structures cylindriques creuses, formées par 13 protofilaments, eux-mêmes formés de dimères de tubuline alpha et bêta. Les rôles des microtubules sont multiples mais ils sont impliqués principalement au niveau de l'axone lors du transport axonal. Il existe un flux constant d'organites et de protéines entre le soma et l'extrémité axonale. Il peut être antérograde, c'est-à-dire du soma vers la périphérie, ou rétrograde, de la périphérie vers le soma. Le transport antérograde peut être décomposé en deux selon la vitesse du transport. Le transport antérograde rapide, environ 400 mm/j, assure le transport des organites mais aussi de vésicules formées dans le soma et contenant des protéines membranaires ou des précurseurs des neurotransmetteurs. Le transport antérograde lent quant à lui a une vitesse de 1 à 4 mm/j et assure le renouvellement de 80% des protéines de l'axone. Le transport rétrograde rapide, environ 300 mm/j, permet le retour de vésicules vers le soma que ce soit de déchets ou de molécules absorbées au niveau des terminaisons nerveuses (enzymes, facteurs de transcription...) (Denoulet *et al.* 1989). Ainsi les microtubules sont de véritables rails, permettant les échanges de matériels cellulaires du centre de la cellule vers la périphérie via les molécules de la famille des kinésines, tandis que les dynéines permettent un transport rétrograde.

Les neurofilaments ont une taille intermédiaire (environ 10 nm de diamètre) et résulte de la polymérisation de trois protéines, NEFL (low), NEFM (medium) et NEFH (heavy). Ils sont très abondants au niveau de l'axone et jouent un rôle majeur dans la détermination du diamètre axonal et la transmission de l'impulsion électrique le long de l'axone (Yuan *et al.* 2012).

1.3.1.3 Les motoneurones

A chaque type de réponse correspond un type adapté de neurones. Ainsi on peut différencier les neurones selon leur structure (bipolaire, multipolaire...), ou selon leur fonction (afférent/efférent, moteur/sensitif, production de médiateurs ...). Ici nous nous intéresserons plus particulièrement aux motoneurones.

Les motoneurones (MN) sont des cellules neuronales dont le corps cellulaire est situé dans le SNC. Ils sont classés en deux types principaux selon la localisation de leurs corps cellulaires. Les MN supérieurs ont pour origine le cortex cérébral, et les MN inférieurs localisés dans le tronc cérébral et la ME et dont les principales caractéristiques sont répertoriées dans le tableau 1 (Stifani 2014).

Tableau 1 : Comparaison entre les motoneurones supérieurs et inférieurs

	Motoneurones supérieurs	Motoneurones inférieurs
Localisation	Cortex	Tronc cérébrale et ME
Neurotransmetteur	Glutamate	Acétylcholine
Cible	Dans le SNC	Hors du SNC

D'après (Stifani 2014)

Les MN supérieurs sont localisés dans la région motrice et pré-motrice du cerveau. Ils utilisent le glutamate comme neurotransmetteur. Les MN inférieurs sont localisés dans le tronc cérébral et la ME. Ils sont dits cholinergiques car ils utilisent l'acétylcholine comme neurotransmetteur pour propager l'information et aboutir à la contraction des muscles. L'acétylcholine est synthétisée par l'enzyme choline acétyltransférase et est concentrée dans des vésicules synaptiques par un transporteur vésiculaire. L'acétylcholine est libérée dans l'espace synaptique suite à un potentiel d'action (décrit dans le chapitre 6.3 Electrophysiologie et patch clamp). Dans cette étude nous nous intéresserons principalement aux MN spinaux, MN inférieurs localisés au sein de la ME. Ils sont classés en plusieurs catégories, les MN branchiaux, les MN viscéraux et les MN somatiques.

Les MN branchiaux sont localisés dans le tronc cérébral et forment avec les neurones sensoriels les noyaux crâniens. Ils innervent les arcs branchiaux des muscles de la face et du cou par l'intermédiaire des noyaux des nerfs crâniens V trijumeau, VII facial, IX glossopharyngien, X vague et XI accessoire.

Les MN viscéraux appartiennent au SNA (sympathique et parasympathique), et sont responsables du contrôle des muscles lisses et des glandes. Ils relaient l'information du SNC aux neurones ganglionnaires du SNP. Contrairement aux deux autres types de MN, les MN viscéraux ne sont pas reliés directement à l'effecteur final.

Les MN somatiques peuvent être divisés en trois groupes selon le type de fibre musculaire qu'elles innervent : alpha, bêta et gamma. Les MN alpha sont responsables de l'innervation de la périphérie des fibres musculaires, et jouent un rôle clé dans la contraction. Ils sont caractérisés par un vaste corps cellulaire et des terminaisons neuromusculaires bien définies. Leur rôle est majeur dans le signal réflexe au niveau de la ME (Eccles *et al.* 1960). Les MN bêta sont petits et peu abondants. Ils sont peu décrits dans la littérature, mais semblent jouer un rôle dans l'innervation à la fois de la périphérie et de l'intérieur des fibres musculaires. Enfin les MN gamma contrôlent exclusivement l'intérieur des fibres musculaires.

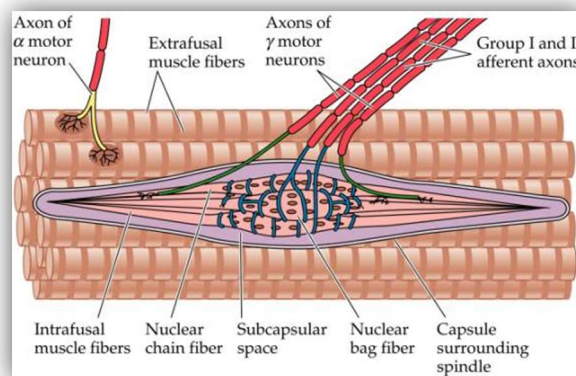


Figure 21 : Innervation par les motoneurones du fuseau musculaire

D'après <http://www.edoctoronline.com/medical-atlas.asp?c=4&id=21958&m=3>

Les MN spinaux sont des neurones multipolaires, dont le corps cellulaire se trouve dans la corne ventrale de la ME. L'axone du motoneurone est très long, de gros calibre et est myélinisé. Leur rôle consisterait à relayer les signaux du cerveau vers l'ensemble des muscles du corps pour contrôler les mouvements. Les MN sont caractérisés par leur grande taille et leur arbre dendritique très fourni.

Lors du développement embryonnaire, plusieurs facteurs apparaissent extrêmement importants pour la différenciation des précurseurs neuronaux en motoneurones. Le Shh ainsi

que le RA sont les deux principaux morphogènes nécessaires à la différenciation des cellules du tube neural. L'équipe de Haase et collègues (Haase *et al.* 2002) a démontré l'importance de GDNF lors de l'organisation des MN dans la ME. Bréjot et collègues (Bréjot *et al.* 2006) ont pointé l'importance de l'apport de HB9 pour la maturation correcte des MN. Enfin en 2008 Bohl et collègues (Bohl *et al.* 2008) ont montré que l'on pouvait influencer le devenir des précurseurs neuraux en leur apportant des facteurs de transcription tels que HB9, Nkx6.1 et Neurogenin 2. Ces facteurs rendaient les précurseurs sensibles au Shh et au RA et permettaient ainsi leur différenciation en MN cholinergique projetant leurs axones sur les myotubes.

1.3.2 Les cellules de Schwann

Les cellules de Schwann (CS) sont les cellules gliales du SNP. Elles assurent la myélinisation de certains axones du SNP par des enroulements successifs de leur membrane autour de ces axones. Elles jouent donc un rôle à la fois protecteur, nourricier à l'égard des neurones et jouent un rôle clef lors de la propagation du signal électrique (Allen and Barres 2009). Leur fonction est comparable à celle des oligodendrocytes au niveau du SNC, à la différence que ces derniers myélinisent plusieurs axones en même temps alors que les CS ne myélinisent qu'un seul axone. Durant le stade embryonnaire, les CS dérivent des crêtes neurales et vont par la suite migrer et se différencier sous l'influence de certains facteurs pour donner des cellules de Schwann myélinisantes ou non myélinisantes (Jessen and Mirsky 2005) (Fig. 22). La myélinisation au niveau du SNP est plus précoce qu'au niveau du SNC, et débute vers le 4^{ème} mois de vie fœtale. Elle reste incomplète à la naissance et se termine vers la puberté. Les neurégulins (NRGs) ont un rôle central dans la myélinisation du SNP. En effet, si le diamètre de l'axone est supérieur à 1 µm, il sécrète un fort taux de NRGs et sera donc myélinisé (Taveggia *et al.* 2005), alors que les petits axones sécrètent un faible taux de NRGs et seront uniquement engainés par le cytoplasme Schwannien.

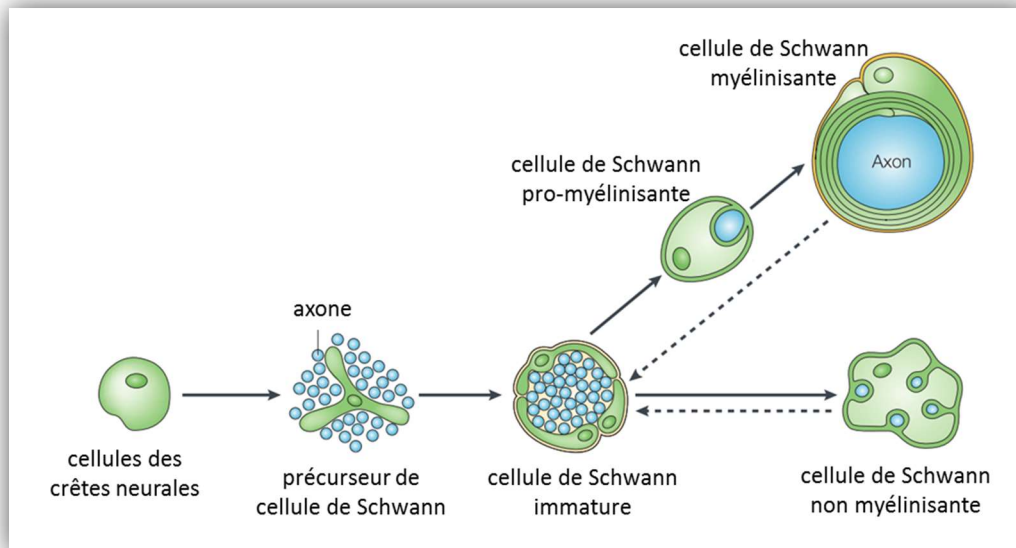


Figure 22 : Maturation des cellules de Schwann d'après (Jessen and Mirsky 2005)

Durant le développement embryonnaire des cellules de Schwann, plusieurs stades peuvent être décrits : les cellules de la crête neurale, les précurseurs de CS et enfin les CS immatures. Le devenir de ces précurseurs va dépendre du diamètre de l'axone et des facteurs qu'il sécrète (notamment le NRG).

2 Mitochondries et nerf périphérique

2.1 Généralités

La mitochondrie est responsable de la respiration cellulaire et est la principale source d'énergie de la cellule. Etymologiquement, mitochondrie vient du grec *mitos* fil, et *chondros* grain. Ces « bioblastes » ont été décrits et observés par Altmann vers 1890, mais ce n'est que quelques années plus tard que Carl Benda leur donna le nom de mitochondries. Ce sont de petits organites intra-cytoplasmiques de 1 à 10 μm de long et de 0,5 à 1 μm de diamètre, mais dont la forme et la taille peuvent varier en fonction du type cellulaire (Collins *et al.* 2002). De même, le nombre de mitochondries par cellule peut varier en fonction des besoins énergétiques du tissu, pouvant aller de quelques dizaines à plusieurs milliers.

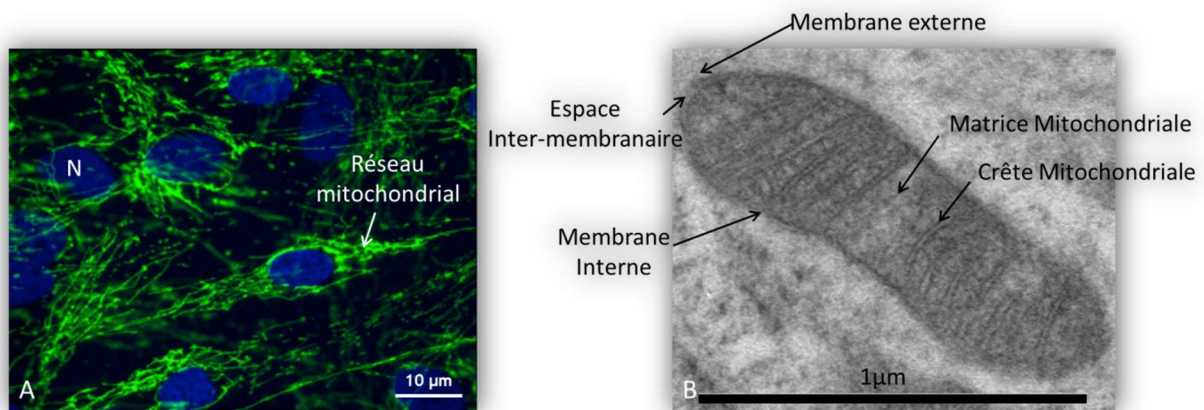


Figure 23 : Réseau mitochondrial et structure de la mitochondrie

(A) Observation du réseau mitochondrial en microscopie optique où les mitochondries sont marquées par Tom20 en vert et les noyaux (N) en bleu au DAPI (avec l'accord du Dr F. Terro). (B) Structure mitochondriale observée au microscope électronique avec la membrane interne, externe et l'espace inter-membranaire ainsi que la matrice mitochondriale et les crêtes.

Les mitochondries ne sont pas des organelles statiques comme on les décrit la plupart du temps, mais forment un véritable réseau tubulaire hautement dynamique, dont la morphologie est en perpétuelle évolution (Fig. 23). Elles se déplacent le long des microtubules dans un sens antérograde ou rétrograde selon les besoins de la cellule. Elles sont composées d'une membrane externe et d'une membrane interne délimitant un espace inter-membranaire, contenant la matrice mitochondriale (Fig. 23).

- La membrane externe est constituée d'une bicouche phospholipidique relativement perméable aux molécules. Elle est riche en porines ou VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel), permettant le transport passif de certaines molécules de faible poids moléculaire (inférieures à 10 kDa) nécessaires pour assurer ses fonctions énergétiques. De plus, elle est riche en translocase TOM (Translocase Outer Membrane), assurant le transport sélectif et régulé de grosses protéines mitochondriales.

- L'espace inter-membranaire. Sa composition est proche de celle du cytoplasme de la cellule, en regard de la grande perméabilité de la membrane externe.

- La membrane interne. Elle est de par sa densité plus imperméable aux ions et aux petites molécules, grâce à sa composition en un phospholipide particulier : la cardiolipine. Néanmoins la proportion de lipides par rapport aux protéines est inférieure à celle retrouvée dans la membrane externe, tout en restant proche de la composition de la membrane bactérienne. De plus, elle ne contient aucune porine. Pour pouvoir intégrer la matrice mitochondriale, les ions ou molécules nécessiteront donc des transporteurs actifs spéciaux. Les protéines quant à elles

sont importées grâce à des translocases TIM (Translocase Inner Membrane). Enfin, la membrane interne contient les complexes de la chaîne respiratoire. Elle forme des invaginations dans la matrice mitochondriale, appelées crêtes. L'activité énergétique d'une cellule peut être déterminée en fonction du nombre de crêtes des mitochondries qui la composent. Plus ces crêtes seront nombreuses, plus la surface de la membrane interne sera importante et plus la capacité de phosphorylation oxydative par la chaîne respiratoire sera importante.

- La matrice mitochondriale est constituée de différentes enzymes rentrant dans le cycle de Krebs, ou responsables de l'oxydation des acides gras ou du pyruvate. Elle contient un ADN circulaire double brin de 16569 pb ayant des similitudes avec l'ADN bactérien. Il code 13 sous-unités protéiques, les ARN ribosomiques (ARNr) 16S et 12S, ainsi que des ARNt. De plus, la matrice mitochondriale renferme des granules responsables de la fixation du calcium, des ribosomes 70S de composition et taille identiques aux ribosomes procaryotes.

La taille des ribosomes, l'ADN circulaire, mais aussi la réplication par scissiparité ou la composition de la membrane interne sont des indices suggérant l'origine bactérienne des mitochondries. Cette origine endosymbiotique est aujourd'hui admise. Elle représente la symbiose entre une protéobactérie et une cellule eucaryote primitive il y a environ 2 milliards d'années (Margulis, 1975). Enfin lors de l'embryogénèse, les mitochondries sont uniquement héritées de la mère, les mitochondries d'origine paternelle étant ubiquitinylées et détruites lors de la fécondation de l'ovocyte par le spermatozoïde.

Le réseau mitochondrial est en permanente évolution (Fig. 24). Il devient soit de plus en plus tubulaire grâce aux protéines MFN1/2 et OPA1 (optical atrophy 1) (phénomène de fusion), soit il est fragmenté grâce à des protéines particulières telles que GDAP1 et DRP1 (Dynamin-related protein 1) (phénomène de fission). Les mitochondries peuvent être dégradées par mitophagie, phénomène nécessitant l'intervention de lysosomes et le recrutement de protéines autophagiques (PINK, Parkin, p62, LC3-II), mais elles peuvent aussi subir des dommages conduisant à un déséquilibre de l'homéostasie mitochondriale, notamment de la chaîne respiratoire, libérant des ROS, et pouvant aller jusqu'à la mort de la cellule.

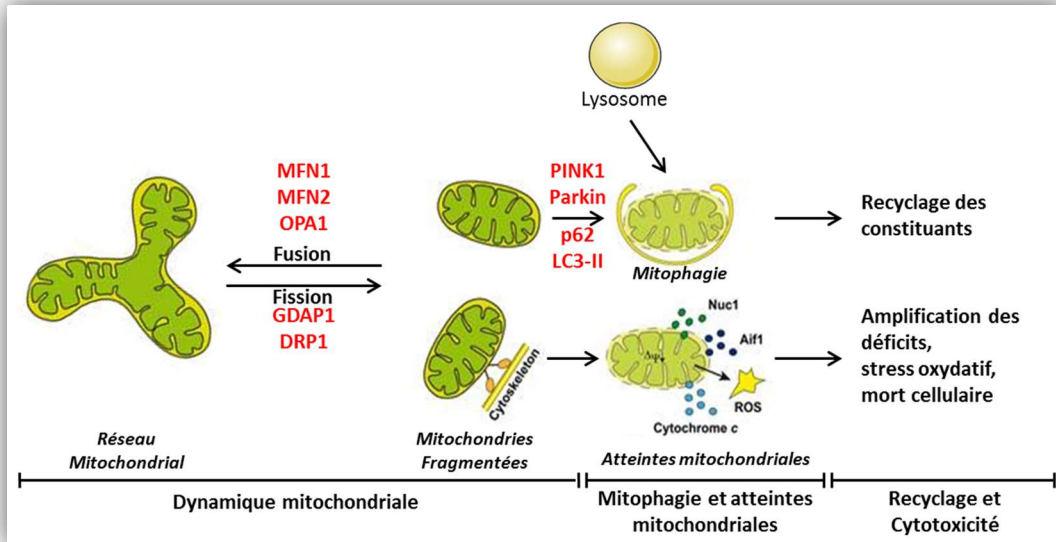


Figure 24 : Cycle de vie mitochondrial

D'après (Braun 2012)

2.2 Production d'énergie

Une des principales fonctions de la mitochondrie est la production d'énergie, assurée par la phosphorylation oxydative via la glycolyse, dégradation du glucose, et via la β -oxydation, dégradation des acides gras (AG) (Fig. 25).

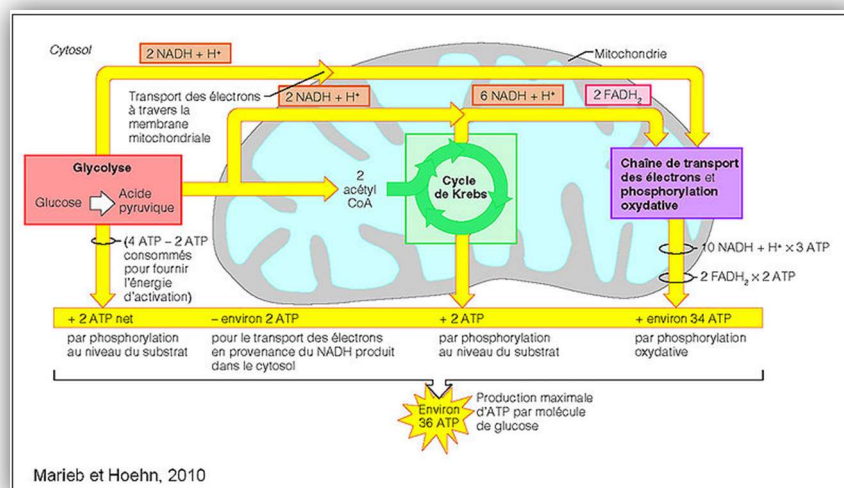


Figure 25 : Schéma général de la production d'énergie de la cellule

2.2.1 Glycolyse, β -oxydation et cycle de Krebs

La glycolyse, dont le substrat est le glucose, se déroule dans le cytoplasme de la cellule et produit de l'acide pyruvique en libérant de faible quantité d'ATP et de NADH (Fig. 25). Le pyruvate va pouvoir soit entrer dans le cycle de Krebs via la formation Acétyl-CoA, qui se déroule dans la mitochondrie, soit réaliser la fermentation en produisant du lactate.

En parallèle les AG, sous l'action de l'Acyl-CoA synthétase, vont donner des Acyl-CoA ainsi que du NADH H^+ et du FADH₂. L'Acyl-CoA va pouvoir s'associer à la carnitine pour être transporté via une translocase, au sein de la matrice mitochondriale. Une fois dans la matrice, l'Acyl-carnitine va être clivée par la carnitine palmityl transferase II, en carnitine et Acyl-CoA. Les acides gras « activés » (par leur couplage au coenzyme A) vont alors être catabolisés dans la matrice mitochondriale par un processus enzymatique appelé β -oxydation. Chaque tour raccourcit l'Acyl-CoA de 2 carbones (car l'oxydation se fait sur le carbone situé en β) et libère entre autre 1 molécule Acétyl-CoA. Ce processus sera possible jusqu'à ce que la chaîne carbonée des AG soit complètement découpée (Fig. 26).

Quels que soient les substrats, le catabolisme des glucides et des lipides conduit à la production d'Acétyl-CoA qui va pouvoir se complexer à l'oxaloacétate pour donner du citrate. Ceci constituera la première étape du cycle de Krebs ou cycle de l'acide citrique. Ce cycle est constitué de 9 étapes et libèrera entre autres 6 NADH H^+ et 2 ATP.

La finalité de la glycolyse, de la β -oxydation et du cycle de Krebs, est la production d'ATP ainsi que de fournir les substrats nécessaires, NADH H^+ et FADH₂, à la chaîne respiratoire pour la production d'énergie.

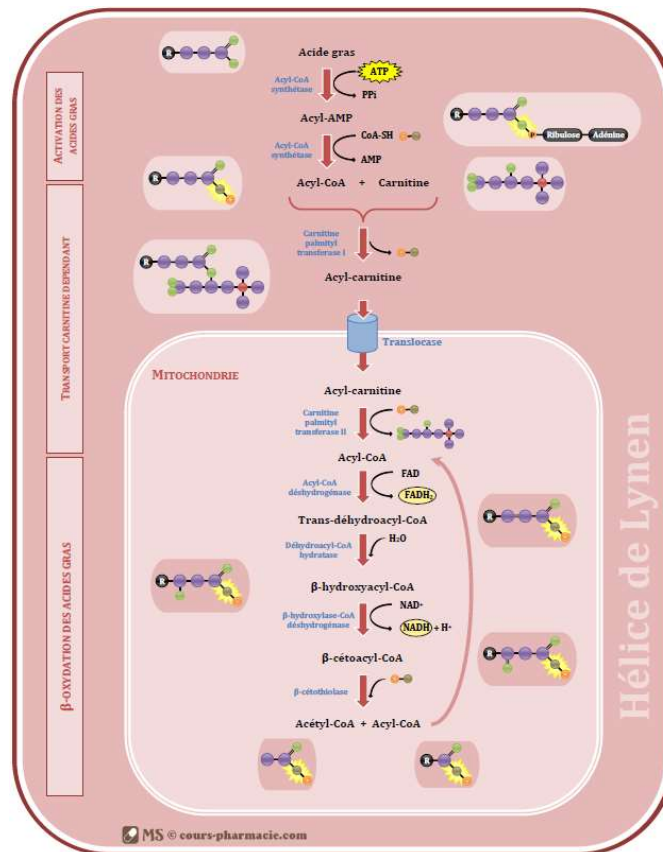


Figure 26 : Hélixe de Lipoic ou β -oxydation

D'après <http://www.cours-pharmacie.com/biochimie>

2.2.2 Phosphorylation oxydative

La chaîne respiratoire ou chaîne de transport des électrons est située au niveau de la membrane interne mitochondriale, et se compose de (Fig. 27) :

- 4 complexes multiprotéiques enchâssés dans la membrane interne mitochondriale :
 - complexe I ou NADH - coenzyme Q réductase
 - complexe II ou Succinate - coenzyme Q réductase
 - complexe III ou Coenzyme Q - cytochrome réductase
 - complexe IV ou Cytochrome c oxydase
- 2 transporteurs d'électrons mobiles :
 - coenzyme Q ou ubiquinone
 - cytochrome C
- 1 complexe de phosphorylation de l'ATP : ATP synthase (complexe V).

La chaîne respiratoire est responsable de la production massive d'ATP à partir des substrats produits par la glycolyse, la β -oxydation et le cycle de Krebs (FADH_2 et NADH H^+).

Le transfert exergonique d'électrons tout au long de la chaîne respiratoire va être couplé à un flux de protons de la matrice vers l'espace inter-membranaire (pompes à proton des complexes I, III et IV), générant ainsi un gradient de proton. Le dernier accepteur d'électrons est l'oxygène qui va être réduit en une molécule d'eau.

Les protons repasseront vers la matrice mitochondriale via le canal à protons de l'ATP synthase, et le transfert d'énergie produit par leur retour vers la matrice sera à l'origine de la formation d'ATP.

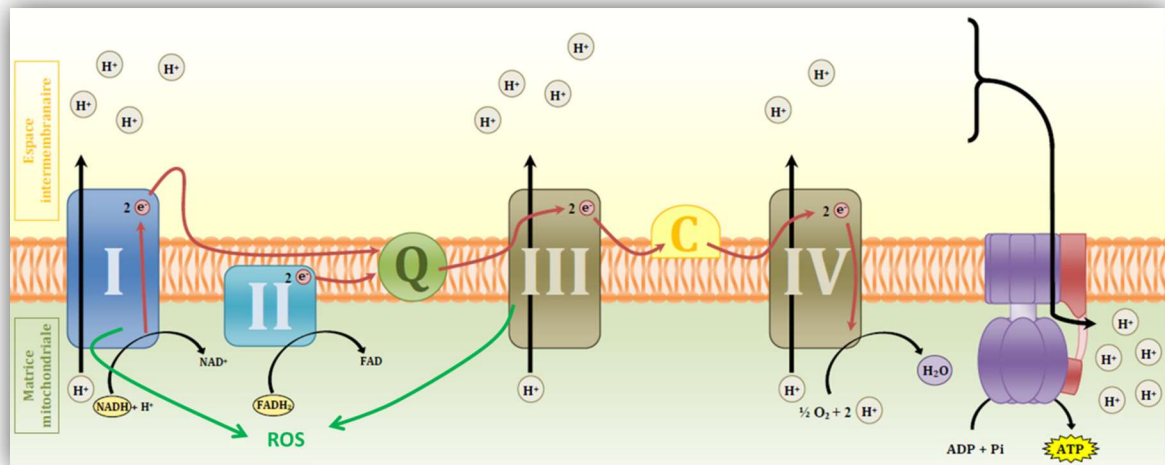


Figure 27 : Chaîne respiratoire de la membrane interne mitochondriale

D'après <http://www.cours-pharmacie.com/biochimie/chaine-respiratoire-et-phosphorylation-oxydative.html>

Elle est constituée des complexes protéiques (I à IV), de deux transporteurs d'électrons mobiles (Q et C) et d'un complexe de phosphorylation, l'ATP synthase (complexe V). Les substrats NADH H⁺ et FADH₂ (produits par la glycolyse, la β-oxydation et le cycle de Krebs) sont oxydés respectivement par les complexes I et II. Les radicaux libres (ROS) sont essentiellement produits par les complexes I et III et vont pouvoir, sous l'action de certaines enzymes, donner d'autres ROS, puis finalement être neutralisés.

2.2.3 Stress oxydatif

Les complexes I et III de la chaîne mitochondriale sont les principaux producteurs de radicaux libres ou ROS (Reactive Oxygen Species) (Boveris and Chance 1973). Les ROS sont des composés radicalaires très instables et donc très réactifs car ils présentent un électron de valence non appariée (Gilbert 2000a). Il existe une grande quantité de ROS, qui sont : le radical superoxyde (O₂^{-*}), le radical hydroxyl (OH^{*}), le radical peroxy (RO₂^{*}), le radical alkoxy (RO^{*}) et le radical hydroperoxy (HO₂^{*}). Ils peuvent être convertis en espèces non radicalaires, mais également réactives, comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) ou les peroxynitrites (ONOO⁻).

Il existe une production physiologique de ROS au sein des cellules qui ne constitue pas de stress en soi (Evans and Halliwell 2001). Ces ROS peuvent être synthétisés dans les macrophages (Shio *et al.* 2015) ou peuvent jouer le rôle de messagers secondaires (Burdon *et al.* 1987). Des mécanismes sont mis en place pour contrebalancer la toxicité des ROS, comme la superoxyde dismutase SOD, la glutathion peroxydase GSH ou encore les catalases (Fig. 28). La cellule doit donc éliminer le radical superoxyde $O_2^{\cdot-}$ par l'intermédiaire de la SOD, ce qui aboutit à la formation de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), toxique lui aussi. Ce dernier est transformé en eau par une catalase ou par la GSH. Mais en présence de métaux de transition comme le fer ou le cuivre, la réaction de Fenton donne lieu à la formation du radical hydroxyle (OH^{\cdot}), hautement réactif, très instable et sûrement le plus agressif des ROS. Enfin il existe des molécules dites anti-oxydantes capables d'inhiber les réactions d'oxydation, donc les ROS. Elles peuvent être soit liposolubles (la vitamine E, la vitamine A...), soit hydrosolubles (vitamine C, glutathion...). Leur utilisation en clinique est partagée. Certaines études montrent l'aspect bénéfique de ces antioxydants, comme par exemple lors de CMT1A ou le sorbitol est associé à d'autres drogues (Baclofene et Naltrexone) (Attarian *et al.* 2014a), alors que d'autres études pointent l'inefficacité voire même la dangerosité de ces molécules (Bjelakovic *et al.* 2012).

Plus la proportion de ces ROS est élevée, moins les mécanismes de compensation sont accessibles, plus les ROS vont donc s'accumuler et plus les dommages présentés par la cellule seront irréversibles allant jusqu'à la mort de celle-ci. Les inducteurs de ROS sont l'hypoxie, les défauts métaboliques, les oncogènes, le stress du RE et de la mitochondrie (Gorrini *et al.* 2013).

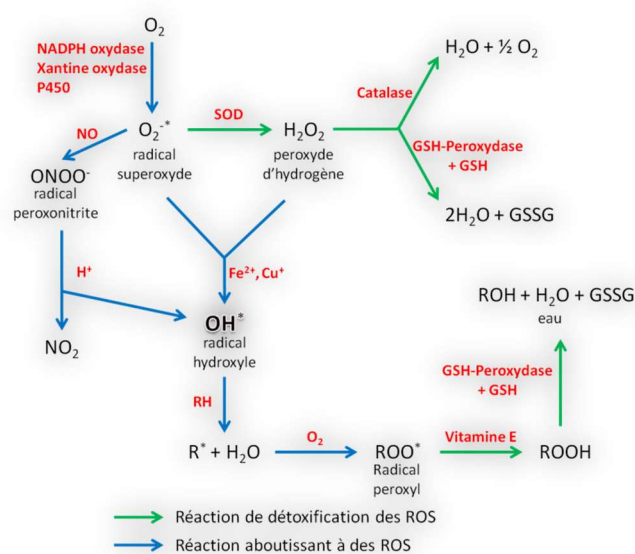


Figure 28 : Stress oxydant

L'accumulation des ROS est néfaste pour la cellule et peut entraîner une oxydation des complexes de la chaîne mitochondriale, ce qui va augmenter la proportion de ROS. Ils peuvent aussi entraîner des mutations sur l'ADN génomique et mitochondrial, altérer l'imperméabilité de la membrane interne de la mitochondrie, et des autres membranes et favoriser la survenue de maladies neurodégénératives variées (Fridovich 1999), telles que la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer (Fernández-Moriano *et al.* 2015) ou la sclérose latérale amyotrophique (Vehviläinen *et al.* 2014).

2.3 La mitophagie

Le recyclage des constituants de la cellule fait appel à deux mécanismes majeurs, la dégradation protéasomique et l'autophagie. La dégradation protéasomique concerne essentiellement les protéines à demi-vie courte qui présentent des anomalies ou qui sont en trop grande quantité. Elles subissent alors des modifications post-traductionnelles, telles que la poly-ubiquitinylation permettant au protéasome de les reconnaître et de les dégrader. Par la suite les constituants seront recyclés. L'autophagie concerne un public plus large comme les protéines à demi-vie longue, les agrégats protéiques, ou encore les organites tels que les mitochondries : on parlera dans ce dernier cas de mitophagie. Ces deux mécanismes sont donc complémentaires et leur efficacité diminue avec le vieillissement.

Autophagie vient du grec *auto* soi-même et *phagein* manger. La cellule dégrade ses propres constituants dans un but de recyclage. Il est important de parler de cycle ou flux autophagique et non pas d'autophagie seule. Selon le niveau de l'atteinte de ce cycle, et de son caractère précoce ou tardive, certains mécanismes ou protéines pourront être incriminés, et une ébauche thérapeutique pourra être suggérée (Martinez-Vicente 2015).

De façon physiologique ou lors d'un stress, la protéine LC3-I (protein 1 light chain 3) se lie à une phosphatidyl éthanolamine, change de conformation pour donner la protéine LC3-II, et se lie au phagophore (Fig. 29 (A)) (Ashrafi and Schwarz 2013). Il y a alors une phase d'expansion de ce phagophore. La protéine LC3-II va pouvoir se lier au domaine LIR (LC3-interacting region) de la protéine p62, protéine qui contient un autre domaine d'intérêt pour la liaison du substrat poly-ubiquitinylé, le domaine UBA (ubiquitin-associated). Le repliement de la membrane va être total, formant un autophagosome. Ces vésicules vont alors se fixer et migrer le long des microtubules via les dynéines ou les kinésines vers les lysosomes. Il est important de préciser que pour que le flux autophagique soit efficace, le réseau de MT

(MicroTubules) ainsi que toute la machinerie nécessaire au déplacement des autophagosomes doit être intacte. L'autophagosome s'acidifie par fusion avec le lysosome contenant des pompes H^+ et des hydrolases acides, et prend alors le nom d'autophagolysosome. Les différents substrats pourront être dégradés et les constituants produits seront recyclés.

L'autophagie a un rôle crucial au niveau neuronal, si bien que la moindre anomalie lors de cette étape peut entraîner des maladies neurodégénératives (Maday and Holzbaur 2012). La biosynthèse des autophagosomes se déroule en distalité, au niveau des neurites. A cause des dynéines et des kinésines, leur mouvement est anarchique et bidirectionnelle mais prend très vite une orientation rétrograde due à l'adhésion robuste de la dynéine. Puis les autophagosomes mûrent pendant leur trajet le long des microtubules jusqu'au soma. Arrivés au niveau du corps cellulaire, il existe de nouveau un mouvement bidirectionnel, caractéristique des lysosomes. Les substrats digérés vont être livrés aux différents lieux de synthèse protéique et lipidique (Maday *et al.* 2012) (Fig. 29 (B)).

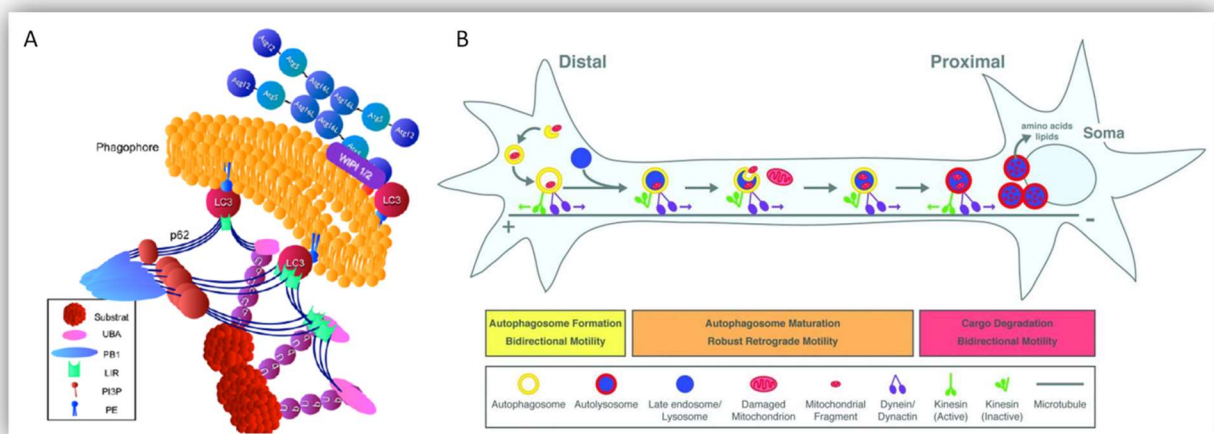


Figure 29 : Formation et maturation des autophagosomes dans les neurones

D'après (Magnaudeix 2011) (A) et (Maday and Holzbaur 2012) (B)

(A) Le substrat ubiquitinylé est internalisé par le phagophore suite à sa reconnaissance par le domaine UBA de la protéine p62, qui elle-même est ancrée à la membrane du phagophore grâce à l'interaction entre le domaine LIR et la protéine LC3-II. La protéine LC3-II est liée à la membrane de l'autophagosome via une molécule de phosphatidyl éthanolamine. (B) Les autophagosomes sont produits au niveau des neurites et internalisent les substrats à dégrader (comme les mitochondries usagées). Ceci s'accompagne de la fusion lysosomale (vésicule bleue). En progressant vers le corps cellulaire, l'autophagolysosome peut intégrer d'autres substrats. Il devient de plus en plus mature et donc de plus en plus acide (passe de jaune à rouge). Arrivé au niveau du soma les substrats digérés vont pouvoir être recyclés et participer aux synthèses protéique et lipidique.

Il se peut que dans certaines conditions pathologiques, notamment lors de CMT, de la maladie de Parkinson, ou de l'atrophie optique, les mitochondries ne soient pas correctement réparties dans l'axone (Chen and Chan 2009) :

- soit du fait d'un déficit de fusion ou de fission ; les mitochondries, fonctionnelles ou non, seront essentiellement localisées au niveau du soma
- soit du fait d'une perte de mobilité ; il y aurait un dysfonctionnement au niveau de la machinerie permettant le mouvement
- soit du fait d'une absence de mitophagie, où les mitochondries endommagées se trouvent accumulées dans le prolongement du neurone.

La mitophagie est régulée par des voies de la kinase PINK1 (PTEN-induced putative protein kinase 1), et par la ligase Parkin E3 ubiquitin ligase. PINK1 et Parkin accumulés à la surface des mitochondries endommagées, provoquent leurs séparations du réseau mitochondrial en inhibant des protéines de fusion (Burté *et al.* 2014) et donc en déstabilisant la dynamique mitochondriale. Par la suite, elles adresseraient ces mitochondries endommagées aux autophagosomes en les poly-ubiquitinylant. On peut émettre l'hypothèse que des pathologies de la dynamique mitochondriale pourraient avoir pour effet de déstabiliser le mécanisme de mitophagie (Ashrafi and Schwarz 2013).

2.4 Dynamique mitochondriale

Les mitochondries ne sont pas des organites fixes, bien au contraire. Il existe un véritable réseau mitochondrial dont la dynamique est liée aux besoins de la cellule. Lors du cycle de vie d'une mitochondrie, un équilibre existe entre deux phénomènes, la fission et la fusion (Fig. 24). La fusion permet de « lier » les mitochondries entre elles, créant un échange de matériel, alors que la fission permet de les séparer. Nous pouvons en conclure que lorsque le processus de fusion est altéré, le réseau mitochondrial apparaît fragmenté alors que si le processus de fission est endommagé, le réseau devient tubulaire et filamenteux. Différentes protéines influencent cette dynamique, jouant un rôle clef dans l'établissement de nombreuses pathologies et en particulier les CMT (Stuppia *et al.* 2015; Kabzińska *et al.* 2011).

2.4.1 Fusion mitochondriale

Deux mitochondries qui se rencontrent peuvent fusionner. Cette fusion doit s'effectuer sur les deux membranes, tout en conservant les propriétés de celles-ci. La fusion des deux

membranes est donc indépendante, de façon successive (fusion de la membrane externe puis de la membrane interne), mais coordonnées. Les principales protéines impliquées dans la fusion mitochondriale sont les protéines MFN1/2 (mitofusine 1/2) et la protéine OPA1 (optical atrophy 1) (Chen and Chan 2009).

Le gène *MFN1* est situé sur le chromosome 3 et code une protéine de 741 AA. Le gène *MFN2* est situé sur le bras court du chromosome 1 et code une protéine de 757 AA. Les mitofusines sont localisées au niveau de la membrane externe mitochondriale et ont pour fonction la fusion de ces membranes. Ce sont des protéines comprenant un domaine GTPase (GTPaseD), 2 domaines Heptad Repeats (HR1 et HR2), et 2 domaines transmembranaires (TMD) séparés par une courte boucle située dans l'espace intermembranaire (Fig. 30). Les domaines HR2 de deux mitochondries adjacentes se lient entre eux, formant une interaction forte intramoléculaire antiparallèle de type hélice-hélice ou coiled-coil. Cette interaction est à l'origine du mélange des lipides membranaires. L'énergie de ce processus est fournie par les domaines GTPase (Westermann 2010). Chacun des domaines de MFN2 peut être affecté par des mutations, qui sont à l'origine d'environ 10 à 20 % des pathologie de Charcot-Marie-Tooth type 2A (CMT2A) (Züchner *et al.* 2004). MFN2 joue un rôle essentiel dans les diverses fonctions mitochondriales, comme la fusion mais aussi le transport axonal, la communication inter-organites ou la mitophagie (Stuppia *et al.* 2015). Il n'est donc pas exclu qu'un défaut d'une ou de plusieurs de ces fonctions conduise à une CMT2A. Le Pr JM. Vallat et le Pr B. Funalot ont mis en évidence en microscopie électronique, une morphologie anormale des mitochondries (plus ou moins rondes et avec très peu de crêtes) regroupées en agrégats non loin de la gaine de myéline, sur des coupes longitudinales de biopsie de nerf de patients. (Vallat *et al.* 2008; Funalot *et al.* 2009).

Le gène *OPA1* est localisé sur le chromosome 3. Il comprend 30 exons et code une protéine de 960 AA. OPA1 est localisée de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale, mais la majeure partie de la protéine se trouve dans l'espace intermembranaire. C'est une protéine appartenant à la superfamille des Dynamines et qui comprend un domaine N-terminal nécessaire à l'adressage mitochondrial, un domaine transmembranaire, une GTPase liée à la dynamine, et un domaine C-terminal hélicoïdal (Fig. 30). La dynamine est une GTPase impliquée dans les événements de clivage membranaire. Elle régule la fusion mitochondriale ainsi que la structure des crêtes (Frezza *et al.* 2006). De plus, il a été démontré qu'OPA1 régulerait l'assemblage et la stabilité des complexes de la chaîne respiratoire par le remodelage des crêtes mitochondriales (Cogliati *et al.* 2013). Lors de la fusion, les mitofusines interviennent en premier, initiant la fusion de la membrane externe, suivis de l'interaction de la

protéine OPA1 avec le court domaine intermembranaire de la protéine MFN1 (Fritz *et al.* 2001). D'après Cipolat et collègues, le phénomène de fusion nécessite l'interaction OPA1/MFN1 mais reste indépendant de l'interaction OPA1/MFN2 (Cipolat *et al.* 2004).

Les mutations du gène *OPA1* sont décrites dans les neuropathies optiques autosomiques dominantes avec une prévalence estimée est de 1 pour 50000 dans le monde. Les mutations touchent principalement les domaines GTPase et dynamine. L'atteinte visuelle, le plus souvent bilatérale, évolue de manière progressive.

La fusion mitochondriale est régulée par l'activité protéolytique de ces deux médiateurs (MFN et OPA1). La dégradation de MFN2 après ubiquitination est le fait de PINK1, et ce mécanisme est intimement lié à la perte du potentiel mitochondrial et de l'autophagie. OPA1 est d'abord pris en charge par des métalloprotéinases de la matrice qui vont cliver le domaine d'adressage mitochondrial. Par la suite différentes protéases vont intervenir dans le clivage d'OPA1 pour la rendre inactive (Burté *et al.* 2014).

2.4.2 Fission mitochondriale

La fission est un phénomène extrêmement important permettant de réguler et de faciliter les échanges inter-mitochondriaux de matériel et d'information. Elle est régulée par de nombreux gènes notamment *DRP1* (Dynamamin-related protein 1). Le gène *DRP1* est localisé sur le chromosome 12 et code une protéine de 710 AA. DRP1 est la protéine la plus importante dans la régulation de la fission mitochondriale (Westermann 2010). C'est une protéine soluble contenant un domaine GTPase côté N-terminal et un domaine effecteur GTPase côté C-terminal (Fig. 30). Les cellules présentant un défaut de DRP1 ont un réseau mitochondrial très dense, ce qui suggère que DRP1 est impliqué lors de la fission. Des études montrent que DRP1, localisé initialement dans le cytoplasme, est recruté par la membrane externe mitochondriale. Il interagira alors avec les protéines Fis1 (mitochondrial fission 1) via des molécules adaptatrices Mdv1 (mitochondrial division protein 1) pour former une structure hélicoïdale s'enroulant autour des mitochondries, et aboutissant à la fission par constriction de l'anneau (hydrolyse du GTP) (Ingerman *et al.* 2005). Fis1 est une petite protéine encrée dans la membrane externe mitochondriale, dont la partie N-terminale orientée vers le cytosol, forme un faisceau de six hélices associé au motif TPR (tetratricopeptide repeat motifs). Cette association augmente l'affinité pour la protéine adaptatrice Mdv1, qui possède un domaine d'interaction en C-terminal pour la protéine DRP1 (Tieu *et al.* 2002).

En raison de son rôle dans le mécanisme de fission mitochondriale, un défaut de DRP1 entraîne de nombreuses pathologies neurodégénératives comme la maladie de Huntington (Shirendeb *et al.* 2012), dans laquelle est observée une fragmentation excessive, un défaut de transport axonal des mitochondries et une dégénérescence synaptique au niveau des neurones ; ou comme la maladie d'Alzheimer (Manczak and Reddy 2012), dans laquelle est constatée une augmentation des interactions d'amyloïde bêta avec DRP1, une augmentation de la fragmentation mitochondriale, un défaut de transport axonal des mitochondries et une dégénérescence synaptique.

DRP1 n'est pas le seul gène à jouer un rôle dans la fission mitochondriale. *GDAP1* semblerait lui aussi être impliqué dans les phénomènes de fission (Niemann et al. 2005), mais aucune preuve mécanistique n'a été apportée à ce jour.

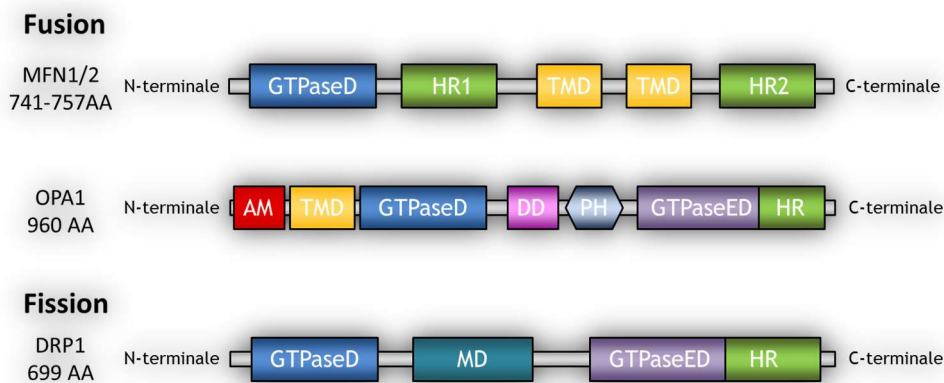


Figure 30 : Représentation schématique des principales protéines impliquées dans la dynamique mitochondriale

Les protéines de fusion sont principalement les mitofusines (MFN1/2) et OPA1. MFN1/2 possède un domaine GTPase (GTPaseD), 2 domaines Heptad Repeats (HR1 et HR2), et 2 domaines transmembranaires séparés par une courte boucle située dans l'espace inter-membranaire. OPA1 possède une séquence d'adressage mitochondriale (AM), un domaine transmembranaire (TM), un domaine GTPase (GTPaseD), un domaine dynamine (DD), un domaine d'homologie aux pleckstrines (PH) et un domaine effecteur GTPase (GTPaseED) suivi d'une séquence Heptad Repeats (HR). La principale protéine impliquée dans la fission mitochondriales est DRP1. Elle possède un domaine GTPase, un domaine central (MD) et un domaine GTPase effecteur (GTPaseED) suivi d'une séquence Heptad Repeats (HR).

2.5 Interaction mitochondrie / réticulum endoplasmique, une structure particulière

La MAM ou Mitochondrial-Associated ER Membrane, ou zone d'interaction mitochondrie / RE est une structure jouant un rôle essentiel dans l'homéostasie cellulaire. Elle désigne une région où les membranes de la mitochondrie et du RE sont liées de manière réversible et donc suffisamment proches pour favoriser les échanges de substrats (Burté *et al.* 2014). Les MAM créent un microenvironnement unique qui influence la biosynthèse des lipides ainsi que l'homéostasie calcique (Area-Gomez *et al.* 2012). Il faut savoir que plus de 70 protéines sont localisées de façon spécifique au niveau des MAM (Annexe I), et sont impliquées entre autres dans l'apoptose, l'autophagie, l'homéostasie calcique, le métabolisme des lipides, du cholestérol, du glucose et des acides gras, l'interaction mitochondrie RE, ou encore l'inflammation et l'immunité.

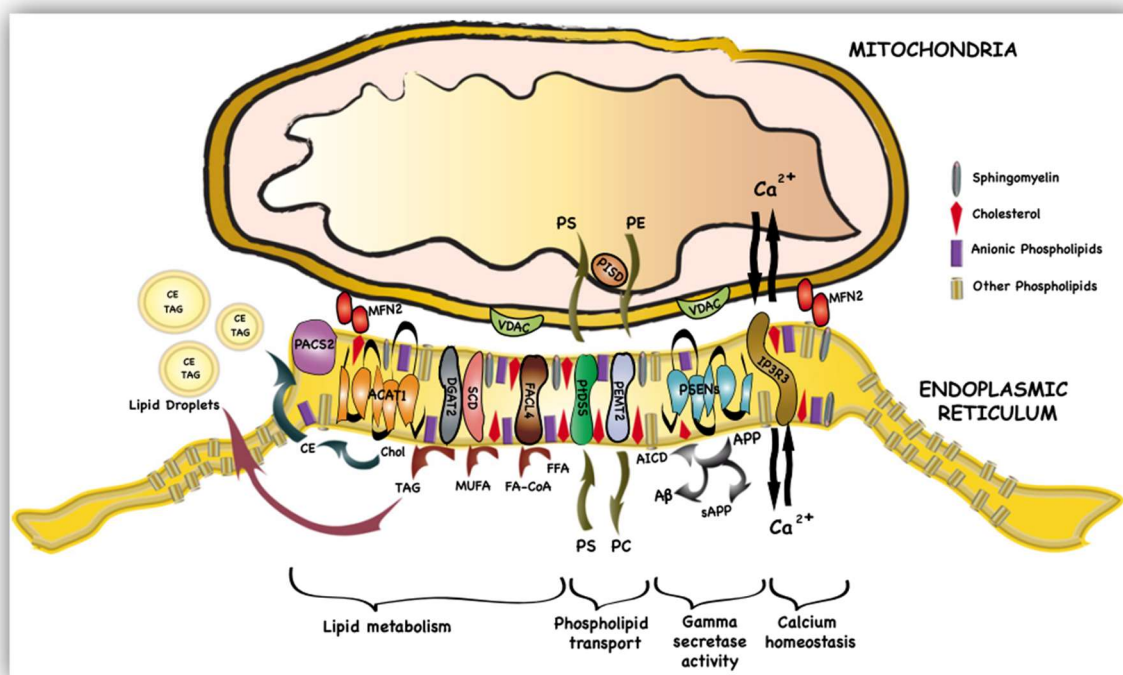


Figure 31 : Organisation schématique d'une MAM

D'après (Schon and Area-Gomez 2013)

Représentation schématique de l'implication d'une MAM dans l'homéostasie cellulaire, notamment dans le métabolisme lipidique, le transport phospholipidique, ou encore l'homéostasie calcique. CE : cholesteryl esters ; Chol : cholestérol ; DGAT2 : diacylglycerol O-acyltransferase 2 ; FA-CL4 : fatty acid-CoA ligase 4 ; FA-CoA : fatty acyl-CoA ; FFA : free fatty acids ; IP3R3 : inositol 1,4,5-triphosphate receptor type 3 ; MFN2 : mitofusine 2 ; MUFA : mono-unsaturated fatty acids ; PC : phosphatidylcholine ; PE : phosphatidylethanolamine ; PEMT : phosphatidylethanolamine methyltransferase ; PISD : phosphatidylserine decarboxylase ; PS : phosphatidylserine ; SCD : stearoyl-CoA desaturase ; TAG : triacylglycerol ; VDAC : voltage-dependent anion channel.

Les MAM jouent un rôle clef dans la dynamique mitochondriale. MFN2 tient une place prépondérante dans les interactions mitochondrie / RE. Ces protéines sont enchâssées dans la membrane du RE et de la mitochondrie permettant l'interaction directe de ces membranes et donc la genèse des MAM (de Brito and Scorrano 2008). Lorsque les protéines de fusion telle que MFN2 sont surexprimées, les MAM deviennent plus nombreuses entraînant une augmentation de la synthèse de phosphatidyléthanolamines par la mitochondrie, une recapture accrue par la mitochondrie de Ca^{2+} , et une diminution de la fragmentation mitochondriale. DRP1 est activée par une forte concentration Ca^{2+} (Saotome *et al.* 2008; Rowland and Voeltz 2012) et aura un effet indirect sur les MAM. Si les DRP1 sont surexprimées et donc que les MFN2 sont sous-exprimées, les MAM seront moins nombreuses, diminuant la synthèse de phosphatidyléthanolamine, recapturant le Ca^{2+} , et augmentant de la fragmentation mitochondriale (Vance 2014).

En regard du nombre considérable de protéines impliquées dans les MAM, de nombreuses pathologies y sont associées, notamment des pathologies neurodégénératives (Tableau 2).

Tableau 2 : Principales pathologies associées aux protéines composant les MAM

Disease	Protein	Function
Alzheimer's disease	Presenilin	β -Amyloid production
Alzheimer's disease	DRP1	Mitochondrial fission
Batten's disease	CLN1	Palmitoylation
Charcot-Marie Tooth	MFN2	Mitochondrial fusion
Dominant optic atrophy	OPA1	Mitochondrial fusion
Insulin resistance	MFN2	Mitochondrial fusion
Insulin resistance	Akt	Glucose metabolism
Insulin resistance	mTORC	Glucose metabolism
Parkinson's disease	Parkin	Ubiquitination
Parkinson's disease	PINK	Protein kinase
Parkinson's disease	MFN2	Mitochondrial fusion
Parkinson's disease	DRP1	Mitochondrial fission
Parkinson's disease	Synuclein	?
Pseudoxanthoma elasticum	ABCC6	Apoptosis
Pulmonary hypertension	Nogo-B	Apoptosis
Viral infections	Viral proteins	Infection

D'après (Vance 2014)

Selon une étude d'E. Schon (Schon and Area-Gomez 2013), l'hypothèse des MAM offre une explication novatrice à la maladie d'Alzheimer, permettant de réorienter le diagnostic et d'entrevoir un nouvel espoir thérapeutique. D'après cette étude, la distance classique entre la mitochondrie et le RE serait fortement réduite, permettant ainsi une augmentation de la communication entre ces deux organites et donc favorisant un dysfonctionnement. Ainsi le taux

de calcium serait en forte hausse, mais aussi le cholestérol, d'où la formation de gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme, et une fission démesurée. Il serait intéressant d'utiliser ces augmentations comme diagnostic de la pathologie.

Il est intéressant de noter que les protéines MFN2 sont directement impliquées dans la formation de MAM. Une mutation de *MFN2* dans les CMT pourrait expliquer une moindre interaction mitochondrie / RE, avec une homéostasie et un métabolisme lipidique perturbés. Actuellement, aucune information sur le rôle de GDAP1 au sein de ces MAM n'a été décrite.

2.6 GDAP1, un rôle controversé

Le gène *GDAP1* est situé sur le bras long du chromosome 8 au niveau du locus q21 et contient 6 exons et 5 introns (Annexe II). Il a été identifié en 2002 (Baxter *et al.* 2002) et son expression est régulé par le facteur de transcription YY1 (Ratajewski and Pulaski 2009). La protéine GDAP1 est une protéine ubiquitaire mais dont l'expression est plus importante au niveau du tissu nerveux (SNC et SNP). De plus, elle est présente en plus grande quantité dans le SNC que dans le SNP. Au niveau de ce dernier, elle est retrouvée plus particulièrement dans les neurones et les cellules de Schwann (Cuesta *et al.* 2002), mais une autre étude aux résultats contradictoires suggère que GDAP1 serait exprimée principalement au niveau des axones, et très peu au niveau des cellules de Schwann (Pedrola *et al.* 2005).

GDAP1 code une protéine de 358 AA enchâssée dans la membrane externe mitochondriale (Niemann *et al.* 2005), et possédant un domaine transmembranaire (TMD) du côté C-terminal (Fig. 32). Des études bio-informatiques suggèrent l'appartenance de la protéine à la famille des glutathion-S-transférases (GST) (Cuesta *et al.* 2002) (Pedrola *et al.* 2005), possédant un domaine GST typique (domaine I ou GST-N) en N-terminal, et un domaine II ou GST-S en C-terminal. Les GST sont connus pour jouer un rôle prédominant dans la détoxification et la diminution des ROS. En revanche, aucune activité enzymatique de GDAP1 n'a encore été démontrée (Shield *et al.* 2006). Le domaine HD1 est un domaine hydrophobe et délimite avec le domaine TMD une séquence riche en AA basiques, nécessaire à la fois à l'ancrage de la protéine dans la membrane mitochondriale, mais qui semblerait aussi être nécessaire au bon déroulement de la fonction de fission (Wagner *et al.* 2009).

GDAP1 serait impliqué lors de la fission mitochondriale (Niemann *et al.* 2005) et peroxysomale (Huber *et al.* 2013). Contrairement aux autres protéines décrites dans le chapitre 2.4.2 dynamique mitochondriale, GDAP1 ne possède pas de domaine GTPase, domaine

impliqué dans la dynamique mitochondriale, et n'a donc aucune implication directe dans ce mécanisme (Cassereau *et al.* 2011). GDAP1 jouerait par contre un rôle dans l'homéostasie calcique de la cellule via les MAM (Pla-Martín *et al.* 2013). Une étude a mis en évidence le rôle de GDAP1 dans l'augmentation du taux de GSH (Glutathion réduit), cofacteur d'enzyme comme les GST et dans la diminution du taux de ROS. Ainsi, GDAP1 permettrait la protection des cellules neuronales contre le stress oxydatif. Les mutations de *GDAP1*, provoquant l'inactivation de la protéine dans les syndromes CMT, rendraient les cellules neuronales plus sensibles au stress oxydatif et augmenteraient ainsi la mort de ces cellules (Noack *et al.* 2012).

Le gène *GDAP1* possède un paralogue, codant la protéine GDAP1-like 1 ou GDAP1-L1. Ce gène, localisé sur le chromosome 20q12, comporte 8 exons, et code une protéine de 386 AA. La structure de la protéine de GDAP1-L1 est assez similaire à celle de GDAP1, on y retrouve en intégralité les différents domaines fonctionnels de GDAP1 (Shield *et al.* 2006 ; Marco *et al.* 2004). En revanche, GDAP1-L1 est exprimé dans le SNC mais pas dans le SNP. En réponse à un taux élevé de glutathion oxydé, GDAP1-L1 est transloquée du cytosol vers la mitochondrie, où elle s'insère au niveau de la membrane externe. Niemann et collègues ont démontré que chez les souris knockout pour *Gdap1* (génotype *Gdap1*^{-/-}) le stress oxydatif est persistant au niveau du SNP, tandis que dans le SNC, GDAP1-L1 est transloqué vers la mitochondrie et permet de compenser la perte de GDAP1, et par là d'atténuer l'atteinte du SNC (Niemann *et al.* 2014).

Du fait de résultats contradictoires de différentes études et du manque de données mécanistiques, il est encore difficile de préciser la(les) fonction(s) biologique(s) de la protéine GDAP1 de manière formelle. L'hypothèse la plus solide à ce jour est que des mutations de *GDAP1* (en particulier bi-alléliques : mutations récessives responsables d'une perte de fonction) ont pour effet de déstabiliser l'ensemble des fonctions mitochondriales, pouvant conduire à la mort cellulaire.



Figure 32 : Représentation schématique de GDAP1

D'après (Cassereau et al. 2011)

GDAP1 est composé de deux domaines caractéristiques des protéines GST (GST-N et GST-C), un domaine hydrophobe (HD1), important pour l'adressage de la protéine dans la membrane mitochondriale et un domaine

transmembranaire (TMD) encadrant une séquence d'acides aminés basiques extrêmement importante pour la localisation et la fonction de la protéine. Ha4α5 est une région comprenant 2 hélices α4α5.

2.7 Rôle de la mitochondrie au sein du nerf périphérique

Les neurones sont des cellules demandant énormément d'énergie. Le bon déroulement de la propagation de l'influx nerveux est donc dépendant de la fonction mitochondriale. Les régions des nœuds de Ranvier ont une densité mitochondriale élevée de manière à apporter l'énergie nécessaire au fonctionnement des pompes ioniques lors de la propagation de l'influx nerveux (Landon and Williams 1963). Outre sa fonction principale de centrale énergétique, la mitochondrie présente quelques rôles extrêmement intéressants comme la recapture du Ca^{2+} , le développement correct des cellules, mais aussi la régulation des ROS. Le bon déroulement de la dynamique mitochondriale est essentiel, permettant soit le recyclage de mitochondries vieillissantes ou usagées soit le développement du réseau mitochondrial de manière à répondre aux besoins énergétiques de la cellule. Il en va de même pour les interactions RE / mitochondrie, qui doivent être suffisamment présentes pour garantir une homéostasie calcique, un métabolisme lipidique, et des échanges satisfaisant entre les deux organites.

La mitochondrie joue donc un rôle central au sein des neurones, si bien que la perturbation de l'une ou l'autre de ses fonctions va entraîner la déchéance des autres fonctions mitochondriales, favorisant la survenue de pathologies neurodégénératives.

3 Neuropathies périphériques

3.1 Généralités

Par définition, les neuropathies périphériques sont des affections caractérisées par l'atteinte d'une ou plusieurs structures du SNP (Fig. 1). Les neuropathies sont des affections relativement fréquentes dans la population, avec une prévalence estimée entre 2 et 8 %, mais leurs étiologies sont extrêmement variées. Les neuropathies périphériques peuvent être acquises (toxiques, traumatiques, métaboliques...) ou au contraire avoir une origine génétique (avec un mode de transmission autosomique dominant, autosomique récessif ou lié à l'X). La durée d'installation des symptômes permet de définir si la neuropathie est aiguë (inférieure à 1 mois), subaiguë (entre 1 et 6 mois) ou chronique (supérieure à 6 mois).

Les neuropathies périphériques (NP) sont classées selon la topographie de l'atteinte (1) et selon la structure atteinte (2).

(1) Elles peuvent n'affecter qu'un seul tronc nerveux, on parlera alors de mononeuropathies. Si l'atteinte est asymétrique et touche plusieurs troncs nerveux, on parlera de mononeuropathies multiples. La polyneuropathie se caractérise par une atteinte diffuse, bilatérale et relativement symétrique. Si les racines sont incluses dans cette atteinte, on parlera de polyradiculoneuropathie.

(2) Les neuronopathies touchent le corps cellulaire du neurone et peuvent être sensitives ou motrices.

L'atteinte des polyneuropathies peut être axonale (axonopathies) ou myélinique (myélinopathies). Les axonopathies se caractérisent par une atteinte sensitivomotrice à dégénérescence rétrograde. Généralement les axones les plus longs sont touchés et les troubles observés sont longueur dépendants. Enfin, on distingue différentes neuropathies périphériques selon le type de fibres atteintes (les grosses fibres myélinisées, les petites fibres et les fibres du système nerveux végétatif) (Magy and Vallat 2009).

3.2 Anamnèse et examen clinique

L'anamnèse permet de recueillir les antécédents familiaux de la personne, de rechercher des pathologies associées et éventuellement d'orienter le diagnostic étiologique (NP secondaires à la prise d'un traitement, à l'exposition à des toxiques...). Il est important de déterminer les modalités d'installation des troubles et leur évolution, la distribution topographique des signes cliniques, le type de fibres atteintes et le type lésionnel en cause.

La sémiologie clinique peut être sensitive avec des symptômes dits « positifs », liés à la génération anormale d'activité par les fibres nerveuses, ou avec des symptômes dits « négatifs », dus à la perte de fonction.

- Les symptômes sensitifs positifs regroupent les paresthésies (picotement, fourmillement), les dysesthésies (intolérance au toucher), les troubles sensitifs subjectifs distaux (engourdissements), ou des douleurs (froid, brûlure, décharge électrique...).
- Les symptômes sensitifs négatifs englobent la perte de sensibilité (hypoesthésie ou anesthésie), l'ataxie sensitive ou troubles de l'équilibre (troubles de la marche majorés

dans l'obscurité.) et des tremblements (surtout dans les membres supérieurs et s'observe dans le maintien d'une attitude ou en fin d'acte).

La sémiologie clinique peut être motrice avec des symptômes dits « positifs », ou des avec des symptômes dits « négatifs »,

- *Les symptômes moteurs positifs* englobent les crampes (survenue brutale) et les fasciculations (myokymie).

- *Les symptômes moteurs négatifs* regroupent les faiblesses musculaires (surtout distales, avec des difficultés à la marche, trébuchements), et l'amyotrophie.

De plus, des atteintes du système nerveux végétatif ont été rapportées lors de neuropathies dysautonomiques, qui sont associées à des troubles du système immunitaire, notamment des phénomènes d'auto-immunité dirigés contre les structures nerveuses.

Selon le rapport de la Haute Autorité de Santé (HAS) « Prise en charge diagnostique des neuropathies périphériques » de Mai 2007, l'examen clinique doit rechercher et préciser la topographie des symptômes. Il doit comprendre, les mensurations des membres par rapport à des repères anatomiques, la cotation de la force musculaire des quatre membres au niveau distal et proximal, la recherche des réflexes ostéo-tendineux (au niveau achilléen, rotulien, bicipital, tricipital, stylo-radial, cubito-pronateur), un examen de la sensibilité (température, douleur et toucher) et enfin un examen du thorax et de la tête. L'examen général peut mettre en évidence des déformations squelettiques et articulaires comme pieds varus équin, en griffe, une cyphoscoliose ou des pieds plats valgus chez l'enfant de moins de cinq ans. Le praticien doit rechercher différents symptômes comme une allodynie (douleur déclenchée par une stimulation normalement non douloureuse), une hyperalgésie (réponse exagérée à une stimulation normalement douloureuse) une hyperpathie (réponse exagérée, parfois explosive, à un stimulus répétitif dont le seuil est augmenté), une hypertrophie nerveuse, une arthrite ou encore des signes ophtalmologiques (liste non exhaustive).

En conclusion, l'examen clinique objective la présence de signes de neuropathie, précise leur distribution spatiale et le cas échéant oriente vers une cause particulière. Cet examen clinique doit être systématique chez tout sujet porteur d'une affection ou suivant un traitement susceptible d'entraîner une neuropathie périphérique, même si le patient ne se plaint d'aucun signe fonctionnel évocateur. Néanmoins de manière à préciser et confirmer le diagnostic, des examens complémentaires peuvent être réalisés.

3.3 Examens complémentaires

La multitude des étiologies des neuropathies rendent le diagnostic parfois difficile. Néanmoins il existe un certain nombre d'outils pour orienter et confirmer le diagnostic d'une neuropathie en éliminant d'autres pathologies comme l'étude électroneuromyographique (ENMG), l'histologie (biopsie nerveuse, biopsie de peau,...), ou l'analyse biologique. C'est l'ensemble de ces données qui nous permettront d'établir un diagnostic.

3.3.1 Examen électrophysiologique

L'examen ENMG est un examen pratiqué pour mettre en évidence une dysfonction des nerfs périphériques et/ou des muscles. Il consiste à enregistrer l'activité électrique de certains muscles au repos et à l'effort à l'aide d'électrodes à aiguille, et à mesurer la vitesse de conduction de l'influx nerveux (VCN) (Annexe IV) le long des nerfs. L'analyse des tracés électromyographiques permet de savoir si les difficultés motrices sont dues à une atteinte des muscles (origine myopathique) ou à une atteinte des nerfs (origine neuropathique). L'ENMG est l'exploration fonctionnelle incontournable pour préciser la nature, la sévérité et suivre l'évolution des neuropathies. Donc, cet examen permet d'identifier les lésions axonales et les atteintes de la gaine de myéline, et détermine la prédominance motrice ou sensitive de la neuropathie.

3.3.2 Examen biologique

Les examens biologiques vont permettre d'affiner et de compléter l'hypothèse clinique de neuropathie initiale ou d'orienter les recherches vers d'autres pathologies. Selon les recommandations de mai 2007 de la HAS, certains examens biologiques peuvent être réalisés en première intention en dehors de toute étiologie évidente comme la glycémie à jeun, la numération de la formule sanguine, l'électrophorèse des protéines sériques, le volume globulaire moyen, un bilan thyroïdien (TSH), un bilan inflammatoire (VS-CRP), un bilan hépatique (transaminases, γ -GT).

Suivant la clinique et le diagnostic posé, l'orientation de cet examen peut varier, et des analyses plus spécifiques sont nécessaires, comme le dosage de certains anticorps.

3.3.3 Examen histopathologique

L'histologie correspond à l'étude de la structure des tissus organiques normaux. Cette structure est en lien avec la fonction du tissu. L'histologie représente donc un moyen d'étudier la fonction de ces tissus. Lors de l'étude tissulaire pathologique, comme par exemple l'observation de nerf périphérique en cas de neuropathie, on parle d'histopathologie.

Le succès de cette technique conduisant à l'interprétation de résultats puis au diagnostic dépend de multiples paramètres. La valeur d'une biopsie (ou prélèvement) repose sur la qualité, le nombre et la taille des prélèvements, le choix de la zone biopsiée et la préservation des tissus en évitant les « écrasements » ou les dégradations par des outils chirurgicaux, voire sur des produits mis au contact du prélèvement, et une connaissance et une maîtrise parfaites des aspects normaux de ce même tissu.

▫ Biopsie nerveuse

Par définition, la biopsie de nerf est un geste invasif visant au prélèvement d'une partie du nerf en vue de son analyse histopathologique. Elle n'apparaît donc pas comme un examen à réalisation systématique dans le cadre de l'exploration d'une neuropathie, mais peut s'avérer extrêmement informative et caractéristique dans certains cas de diagnostic difficile. Le plus souvent, le choix du site de biopsie se porte sur un nerf sural, plus rarement sur un nerf fibulaire superficiel ou un nerf radial (ceci étant également fonction de la symptomatologie et de la morphologie du patient). Le nerf sural (branche sensitive pure d'un nerf très long) représente effectivement un choix plus judicieux dans la mesure où il est plus facilement identifiable et accessible pour une biopsie.

▫ Biopsie cutanée

La biopsie de peau est une technique d'analyse du système nerveux périphérique de développement plus récent que la biopsie de nerf. Elle consiste en l'étude de l'innervation cutanée, constituée de petites fibres sensibles de type A β , A δ et C. Elle permet notamment la mise en évidence de neuropathies à petites fibres, en montrant une altération de morphologie et/ou de densité de ces fibres intra-épidermiques tandis que l'électromyogramme n'explore classiquement que les fibres nerveuses de gros calibre.

▫ Biopsie musculaire

L'indication d'une biopsie musculaire est fonction du type d'hypothèse posée par l'anamnèse et l'examen clinique. Elle permet d'explorer le muscle et de confirmer une atteinte des MN, d'établir un diagnostic différentiel avec les myopathies par exemple, mais aussi de pouvoir confirmer ou éliminer une atteinte musculaire associée.

Ce type de prélèvement se réalise donc habituellement sur un muscle proximal, comme le deltoïde ou le quadriceps, mais il peut changer en fonction de l'examen clinique.

La sémiologie des neuropathies périphériques est donc très vaste, mais de façon générale elles peuvent être soit génétiques (autosomique dominant, autosomique récessif ou lié à l'X), soit acquise (toxiques, traumatisme, désordre métabolique...). Dans ce manuscrit, nous traiterons des neuropathies génétique, notamment des formes les plus fréquentes, sensitivomotrices, habituellement appelées maladie(s) de Charcot-Marie-Tooth.

4 Neuropathies héréditaires sensitivomotrices ou maladie de Charcot-Marie-Tooth

4.1 Généralités

La maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT) correspond à un ensemble de neuropathies sensitivomotrices d'origine héréditaire (HSMN) dont la prévalence est de 1/2500 (Emery 1991). Elle représente la pathologie dégénérative la plus courante du système nerveux périphérique. Elle est présente dans tous les pays, et touche autant les hommes que les femmes. Elle se traduit par une diminution de la force musculaire, associée à une fonte musculaire, des troubles de l'équilibre, une diminution de la sensibilité et dans certaines formes, une atteinte des muscles respiratoires, des cordes vocales, une atteinte visuelle, ou une surdité. Plus le nerf est long, plus il est susceptible d'être atteint, et les muscles qu'il innerve seront moins stimulés, entraînant une diminution de volume (amyotrophie), une perte de force, et un raccourcissement des muscles. La CMT débute la plupart du temps dans l'enfance ou chez le jeune adulte, mais parfois elle peut se développer à un âge plus avancé. Cette évolution est lente et sans conséquence pour l'espérance de vie. Cependant, il peut y avoir des périodes de « poussées » où l'atteinte musculaire augmente plus rapidement, lors d'état de stress de la personne, de

l'adolescence ou de la grossesse (liste non exhaustive). Il faut savoir qu'à l'heure actuelle aucun traitement n'est disponible, et que seuls des moyens pour prévenir des complications liées à la pathologie sont possibles, comme par exemple la kinésithérapie.

En 1886, Jean Martin Charcot et Pierre Marie décrivent une « forme particulière d'atrophie musculaire progressive, souvent familiale, débutant par les pieds et les jambes et atteignant plus tard les mains » (Charcot and Marie, 1886). La pathologie est décrite en parallèle par Howard Henry Tooth au Royaume-Uni. Charcot et Marie penchent alors pour une atteinte au niveau de la moelle épinière contrairement à Tooth qui soupçonne une lésion des nerfs périphériques (Vallat and Funalot 2010). Auparavant, certains médecins tels que Virchow, Eulenburg, Friedreich ou encore Osler, avaient déjà rapporté des cas de patients présentant une amyotrophie péronière. Jusqu'à la fin des années 1980, on parlera alors d'atrophie musculaire péronière. Au XX^{ème} siècle, Henriksen et Gilliatt montrent que certains de ces patients ont une VCN diminuée et ce n'est qu'en 1968 que Dyck et Lambert font la distinction entre la forme démyélinisante de la maladie (CMT1) pour laquelle la VCN est diminuée, et la forme axonale (CMT2) ayant des VCN normales ou sub-normales (Kazamel and Boes 2014).

Les patients présentent une atrophie musculaire des membres inférieurs, notamment muscles extenseurs des orteils, fibulaire long et du jambier antérieur (pieds creux, orteils en griffes, steppage), puis des mains jusqu'au diaphragme, dans les formes les plus sévères. Une atteinte sensitive est également observée, avec paresthésies et crampes ainsi qu'une perte de sensibilité dans les membres inférieurs.

4.2 Classification et gènes impliqués

Usuellement, les CMT sont classés selon trois critères, VCN, le mode de transmission et l'anomalie génétique en cause.

▫ La vitesse de conduction ou VCN

Deux grands groupes distincts sont décrits par Dyck et Lambert, et ceci permet de déterminer la nature de l'atteinte. La forme démyélinisante ou CMT de type 1 est caractérisée par une démyélinisation chronique du nerf avec une VCN diminuée (inférieure à 38 m/s). La forme axonale ou CMT de type 2 est caractérisée quant à elle par une VCN dite normale (supérieure à 40 m/s) et une raréfaction axonale. Enfin, en ce qui concerne la forme intermédiaire, la VCN est comprise entre 25 et 45 m/s.

▫ Le mode de transmission

Tous les modes de transmission ont été décrits dans la littérature, à savoir autosomique dominant, autosomique récessif, lié au chromosome X et même anecdotiquement, mitochondriale.

Les formes démyélinisantes peuvent être autosomiques dominantes (AD) et porteront le nom de CMT1 ou AD-CMT1, ou être autosomique récessives (AR) et porteront le nom de CMT4 ou AR-CMT1. De même, les atteintes axonales (AD ou AR) porteront respectivement la dénomination CMT2, AD-CMT2 ou AR-CMT2. Les formes intermédiaires de CMT présentent une atteinte à la fois de la myéline et de l'axone. Leur transmission est AD (DI-CMT) ou AR (RI-CMT). Les formes liées à l'X de CMT présentent une atteinte à la fois de la myéline et de l'axone mais parfois ces atteintes ne sont que axonales ou que myéliniques. Leur transmission est généralement dominante liée à l'X même si de rares cas de transmission récessive ont été observés et porteront le nom de CMTX (Tableau 3) (Tazir *et al.* 2014).

Tableau 3 : Classification des CMT selon le type de l'atteinte nerveuse

Atteinte Nerveuse	Mode de Transmission	Dénomination
Démyélinisante	Autosomique Dominant (AD)	CMT1
	Autosomique Récessif (AR)	CMT4
Axonale	Autosomique Dominant (AD) ou Autosomique Récessif (AR)	CMT2
Intermédiaire	Liée au chromosome X (dominant ou récessif)	CMTX
	Autosomique Dominant (AD)	DI-CMT
	Autosomique Récessif (AR)	RI-CMT

Selon AFM téléthon Février 2015 « La maladie de Charcot-Marie-Tooth » et Juin 2015 « Avancées dans la maladie de Charcot-Marie-Tooth »

▫ L'anomalie génétique en cause

Plus de 80 gènes sont impliqués dans l'apparition et la transmission de la pathologie (Fig. 33) mais d'autres gènes restent *a priori* encore à découvrir, de même que les mécanismes dans lesquels ils sont impliqués (Timmerman *et al.* 2014).

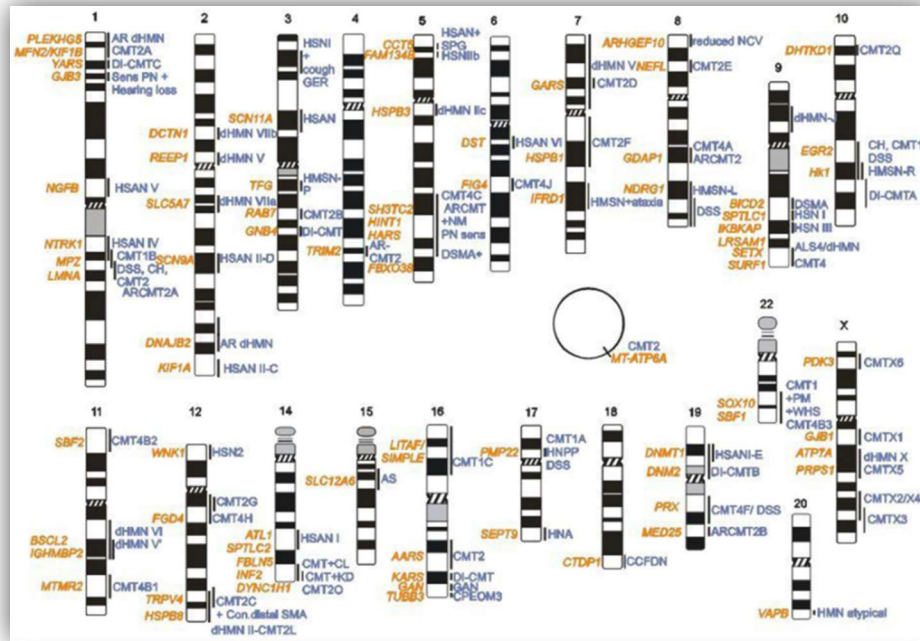


Figure 33 : Localisation des gènes impliqués dans les CMT

Cependant, la classification des CMT est très complexe et en constante évolution. En effet, la hiérarchisation des CMT est fortement débattue au sein de la communauté scientifique. Tazir et collègues en 2014 nous en propose une décrite dans le Tableau 4 (Tazir *et al.* 2014).

D'après ce tableau, il est important de souligner que la même mutation peut entraîner différentes formes de CMT suivant le mode de transmission. Par exemple, pour *GDAP1*, si l'atteinte nerveuse est axonale et que le mode de transmission est de type autosomique récessif ou dominant on parlera d'AR-CMT2H ou AD-CMT2K. En revanche, si l'atteinte nerveuse est myélinique de transmission AR, la CMT portera le nom d'AR-CMT4.

Les cas de CMT 1 sont principalement dus à une duplication du gène *PMP22*, pour Peripheral Myelin Protein 22 (70% des CMT1). Concernant les CMT 2, le diagnostic devient plus complexe, car le gène majoritairement muté : *MFN2* (Mitofusine 2) (Fridman *et al.* 2014), n'explique que 10% des cas CMT2. Au moins 30 gènes sont, à ce jour, connus pour être impliqués dans les CMT2, notamment *GDAP1* (Ganglioside-induced Differentiation-Associated Protein-1).

Tableau 4 : Classification des CMT (Tazir et al. 2014)

Type	Gene or cytogenetic location	Age of onset	Evocative phenotypes
<i>Autosomal dominant CMT1 (AD-CMT1)</i>			
CMT1A	PMP22 (duplication)	All ages	Classic form. Hypertrophy of nerves
HNPP	PMP22 (deletion)	2 to 64 years	Recurrent entrapment neuropathies. Multifocal neuropathies
CMT1B	MPZ	1st-2nd decade	Clinically more severe than CMT1A
CMT1C	LITAF	Childhood	Abnormal gait. Occasional nerve hypertrophy. Rarely deafness
CMT1D	EGR2	1st decade	DSS/CHN. Possible cranial nerve involvement. Scoliosis
CMT1E	PMP22	Childhood	Associated with deafness
CMT1F	NEFL	1-13 years	CMT1 with early onset. Severe disease
CMT 'plus'	FBLN5	4th-5th decade	Skin hyperelasticity. Age-related macular degeneration
<i>Autosomal dominant CMT2 (AD-CMT2)</i>			
CMT2A	MFN2	6 months to 50 years	Prominent distal weakness. Late proximal weakness. Optic atrophy. CNS involvement
CMT2B	RAB7	2nd decade	Severe sensory loss. Foot ulcers. Arthropathy and amputations
CMT2C	TRPV4	Birth to 60 years	Younger more severe. Motor predominance. Vocal cord, diaphragm, respiratory involvement/dHMN
CMT2D	GARS	16 to 30 years	Distal upper limb predominance dHMN
CMT2E	NEFL	1st-5th decade	Hearing loss. Hyperkeratosis
CMT2F	HSPB1	Adult	Classic/dHMN
CMT2G	12q12-q13.2	2nd decade	Classic
CMT2I	MPZ	Late	Classic
CMT2J	MPZ	Late	Deafness and pupillary abnormalities
CMT2K	GDAPI	Variable	vocal paralysis and pyramidal features
CMT2L	HSPB8	15 to 33 years	Classic/dHMN
CMT2M	DNM2	1st-2nd decade	Tremor
CMT2N	AARS	15 to 50 years	Classic
CMT2O	DYNC1H1	Early childhood	Sometimes learning difficulties
CMT2P	LRSAM1	27 to 40 years	Mild. Sometimes asymmetry
CMT2Q	DHTKD1	13 to 25 years	Classic CMT
HMSN-P	TFG	17 to 55 years	Proximal involvement. Tremor. Diabetes mellitus
CMT2	HARS	Late onset	Sensory predominant
CMT2	MARS	Late onset	Motor-sensory
CMT2	MT-ATP6	1st-2nd decade	Motor predominant. Pyramidal signs
<i>Dominant and recessive X linked CMT</i>			
CMTX1	CJB1	1st-2nd decade	Classic. Occasional deafness
CMTX4	AIFM1	Early childhood	Mental retardation. Deafness
CMTX5	PRPS1	Childhood	Mild-moderate neuropathy
CMTX6	PDK3	Childhood	Deafness. Late optic atrophy
CMTX6			Classic CMT
<i>Dominant intermediate CMT</i>			
DI-CMTA	10q24.1-q25.1	7 to 72 years	Classic CMT
DI-CMTB (CMT2M)	DNM2	1st-2nd decade	Classic CMT with neutropenia and early onset cataract
DI-CMTC	YARS	7-59 years	Classic CMT
DI-CMTD	MPZ	30-50 years	Sensory loss and weakness. Deafness/pupil disorders
DI-CMTE	INF2	5 to 28 years	Glomerulosclerosis and proteinuria
DI-CMTF	GNB4	5 to 45 years	Classic CMT
<i>Autosomal recessive CMT1 AR-CMT1 (CMT4)</i>			
AR-CMT1A	GDAPI	<2 years	Severe and progressive. Vocal cord and diaphragm paralysis in some cases
AR-CMT1B1	MTMR2	3 years	Severe CMT1. Facial/bulbar weakness. Scoliosis
AR-CMT1B2	MTMR13 (SBF2)	4-13 years	Severe CMT1. Glaucoma. Kyphoscoliosis
AR-CMT1B3	MTMR5 (SBF1)	5-11 years	Pes planus. Scoliosis
AR-CMT1C	SH3TC2	Early onset 1st-2nd decade	Severe to moderate CMT1
AR-CMT1D	NDRG1	<10 years	Scoliosis. Deafness
AR-CMT1E	EGR2	Birth	Severe CMT1. Deafness. Tongue atrophy
AR-CMT1F	PRX	Birth to first decade	Congenital hypotonia. Respiratory failure. Arthrogryposis
AR-CMT1G (HMSN-Russe)	HK1	8-16 years	CMT1. Prominent sensory involvement
AR-CMT1H	FGD4	<2 years	Severe to moderate CMT1
AR-CMT1J	FIG4	Congenital, childhood or adult	Delayed milestones. Scoliosis. Severe course
AR-CMT1J			Severe disorder
AR-CMT1	SURF1	Childhood	Similarities to motor neuron disease
AR-CMT1			Severe. Associated to cerebellar ataxia, brain MRI abnormalities and lactic acidosis
<i>Autosomal recessive CMT2 AR-CMT2 (CMT2)</i>			
AR-CMT2A (CMT2B1)	LMNA	2nd decade	Severe course. Distal and proximal weakness
AR-CMT2B (CMT2B2)	MED25	28 to 42 years	Classic CMT2
AR-CMT2C (CMT2B5)	NEFL	1st decade	Severe form
AR-CMT2F/dHMN	HSPB1	Variable	Sometimes proximal leg weakness
AR-CMT2H	GDAPI	1st decade	Pyramidal involvement. Vocal cord involvement
AR-CMT2K (rarely AD)	GDAPI	Early-onset form	Severe form. Vocal cord paralysis. Skeletal deformities.
AR-CMT2P (HMSN VI)	LRSAM1	3rd-4th decade	Milder dominant form
ARAN-NM	MFN2	Early onset	Cramps. Erectile dysfunction
GAN	HINT1	1st decade	Optic atrophy
GAN	GAN	Childhood	Neuromyotonia
GAN			Severe axonal neuropathy with early onset CNS involvement.
GAN			Milder form CMT-like

4.3 Recherche récente sur les CMT, exemple de GDAP1

4.3.1 CMT et GDAP1

En 2002 Baxter et collègues. ont identifié 3 mutations différentes dans 4 familles tunisiennes, dont deux non-sens (W31X et S194X) et une faux-sens (R161H) pour le gène GDAP1 conduisant à une CMT4A (Baxter et al. 2002). Par la suite, des formes axonales autosomique récessive et autosomique dominante ont été rapportées. Comme mentionné plus haut, des études controversées montrent que GDAP1 serait exprimé à la fois dans les motoneurones et les cellules de Schwann (Niemann et al. 2005) ce qui expliquerait que les CMT puissent toucher soit les cellules de Schwann (AR-CMT4A (Baxter et al. 2002)), soit les neurones (AR ou AD CMT2H/K (Cuesta et al. 2002)), soit les deux à la fois (intermédiaire (Senderek 2003)). Mais une autre étude montre que GDAP1 serait exprimé principalement au niveau des axones, et très peu au niveau des cellules de Schwann (Pedrola et al. 2005). Les aspects cliniques des différentes formes de CMT-GDAP1 sont répertoriés dans le tableau ci-dessous (Tableau 5).

Tableau 5 : Aspects cliniques des CMT-GDAP1

	CMT4A récessif	CMT2K récessif	CMT2K dominant	RI-CMT
Pathologie	Démyélinisante	Axonale	Axonale	Axonale + démyélinisante
Fréquence	Importante	Importante	Rare	Rare
Age d'apparition	Avant 2 ans	Avant 2 ans	Après la 2 ^{ème} ou la 3 ^{ème} décennie	Dès la petite enfance
Symptômes	<ul style="list-style-type: none"> - Progression rapide - Touche les mains et les pieds mais de façon plus importante les jambes que les bras - Faiblesse musculaire - Paralysie des cordes vocales - Difficultés respiratoires - Perte sensorielle distale 	<ul style="list-style-type: none"> - Progression handicap sévère dès la fin de la première décennie, nécessité d'une chaise roulante dès l'âge de 4 ans - Hypothonie - Touche les mains et les pieds mais de façon plus importante les jambes que les bras - Faiblesse musculaire - Paralysie des cordes vocales - Réflexes osteo-tendineux absents 	<ul style="list-style-type: none"> - Progression très lente - Démarche difficile - Faiblesse musculaire au niveau distal des membres - Perte de sensibilité distale - Réflexes ostéo tendineux réduit au niveau des chevilles et des genoux 	<ul style="list-style-type: none"> - Démarche difficile - Cheville et pied déformés - Faiblesse musculaire au niveau distal des membres - Perte de sensibilité distale

VCN	ralentie (25 à 35 m/s)	normale ou légèrement réduite (40 à 50 m/s)	normale	ralentie (25 à 35 m/s)
-----	------------------------	---	---------	------------------------

Dans une série de biopsies nerveuses provenant de patients atteints de formes récessives de CMT causées par des mutations de GDAP1 (CMT4A ou CMT2K), des anomalies très particulières des mitochondries axonales ont pu être constatées : chez tous les patients, on constate la présence d'accumulations de mitochondries anormales, d'aspect sphéroïde, le long de la membrane de l'axone. Des aspects similaires ont également été observés sur des biopsies nerveuses de patients présentant des mutations de MFN2 (Calvo *et al.* 2009) (Fig. 34). Ces photos de ME nous proviennent de la collection du Pr J.M. Vallat (Centre National de Référence des neuropathies périphériques rares, CHU de Limoges).

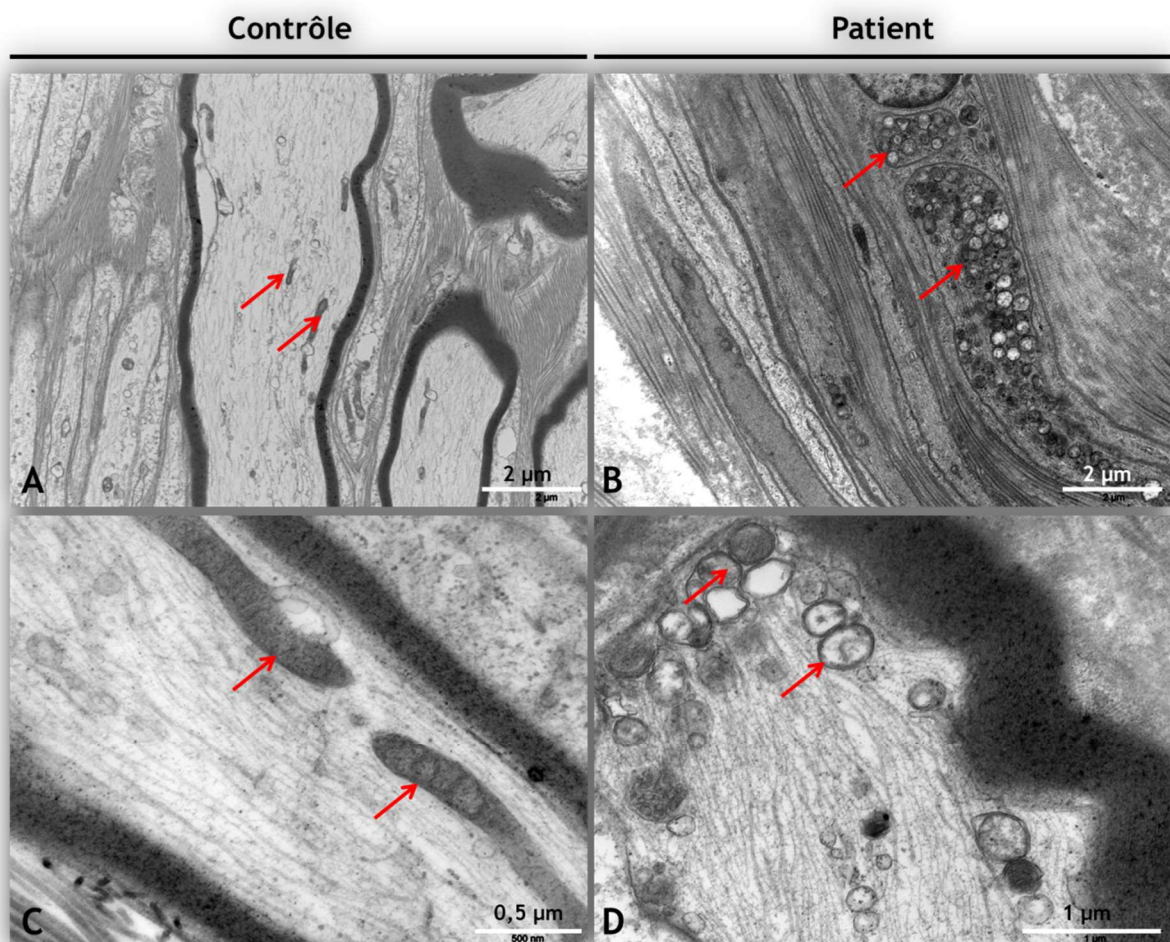


Figure 34 : Coupes longitudinales de biopsies de nerf humain (contrôle et patient GDAP1) observées en microscopie électronique à différents grossissements

(A, C) correspondent aux coupes contrôles et (B, D) aux patients CMT GDAP1. Les flèches rouges indiquent les mitochondries avec une morphologie normale (A, B) ou accumulées et rondes le long de la gaine de myéline (C, D). Collection Pr J.M. Vallat ; Centre National de Référence des neuropathies périphériques rares.

Les cellules touchées par les CMT (motoneurons ou cellules de Schwann) sont difficilement prélevables chez les patients. C'est pourquoi de nombreux modèles ont été développés, de façon à comprendre et identifier les mécanismes moléculaires impliqués dans la pathologie et de pouvoir le cas échéant, proposer une approche thérapeutique.

4.3.2 Les modèles animaux

Différents modèles animaux peuvent être utilisés : le zebrafish, modèle pour l'étude de la perte de fonction de MFN2 conduisant à une CMT2 (Chapman et al. 2013) ; la drosophile, modèle pour une mutation non-sens de Rab7 conduisant à une CMT2B (Janssens et al. 2014) ; les rats PMP22-transgéniques, pour l'augmentation du nombre de copies conduisant à une CMT1A (Sereda et al. 1996) ; ou encore les souris pour l'étude de neuropathies à petites fibres dans la peau (Danigo et al. 2014). La création de souris transgéniques CMT peut être utilisée pour la compréhension des mécanismes impliqués dans la pathologie ainsi que pour le développement et le test de différentes drogues (Fledrich et al. 2012).

A. Niemann et collègues ont développé un modèle de souris KO-*Gdap1*^{-/-} (Knock-Out pour *Gdap1*) mimant l'altération génétique de patients souffrant de formes sévères de la maladie de Charcot-Marie-Tooth. Ils ont constaté que les mitochondries des axones des nerfs périphériques étaient de plus grande taille et qu'il existait une altération du transport mitochondrial dans les neurones sensoriels chez les souris KO comparées aux souris contrôles. Dans cette étude, il est montré que *GDAP1* et son paralogue *GDAP1-L1* (décrit dans le paragraphe 2.6 *GDAP1*, un rôle controversé) sont sensibles au stress et ont donc un rôle protecteur pour les neurones vis-à-vis de ce stress (Niemann *et al.* 2014).

Une équipe espagnole a récemment généré un modèle indépendant de souris KO-*Gdap1*^{-/-}. Les animaux atteints présentaient une motricité anormale à partir de l'âge de 3 mois. Les études électrophysiologiques et biochimiques ont permis de confirmer la nature axonale de la neuropathie alors que les études histopathologiques ont montré une perte progressive des motoneurons (MN) dans la corne antérieure de la moelle épinière et des anomalies dans les jonctions neuromusculaires. Des MN embryonnaires et des ganglions dorsaux adultes de souris atteintes ont été cultivés. Il a été observé en microscopie électronique dans les MN de souris atteintes des mitochondries rondes ou sphéroïdes avec les citernes du RE dilatées, ou des mitochondries grandes, grosses et tubulaires avec des crêtes enflées orientées le long de l'axe longitudinal avec une réduction des citernes du RE (lumière réduite). De plus, les neurites étaient moins nombreuses avec une longueur d'axone des MN nettement diminuée (250 µm)

par rapport aux souris contrôles (600 μm), ce qui est imputable à une diminution de l'acétylation de l' α -tubuline. Enfin ces cellules présentaient une augmentation des vésicules autophagiques, et une faible inter-connectivité avec les autres organites, notamment le RE ; entraînant une homéostasie calcique anormale (Barneo-Muñoz et al. 2015).

Les mêmes observations ont été faites chez *Drosophila* par Lopez et collègues (López Del Amo *et al.* 2015), montrant des altérations dans la taille, la morphologie, la distribution des mitochondries, ainsi qu'une dégénérescence neuromusculaire. Il a été aussi observé que le stress oxydatif n'était pas la cause de la dégénérescence neuromusculaire mais une conséquence à long terme soulignant un dysfonctionnement mitochondrial.

F. Palau et son équipe ont étudié l'impact de la mutation p.R120W responsable d'un large éventail de sévérité clinique, chez la drosophile. Dans cette étude, ils relatent l'interaction entre GDAP1 et Junctophiline-1 (JPH1). Ce cluster joue un rôle important dans l'homéostasie calcique (non publié à ce jour). Cette étude fait suite aux travaux de Pla-Martin et collègues sur une lignée cellulaire humaine (travail développé dans le chapitre suivant 4.3.3 les modèles cellulaires).

Enfin, il a été démontré chez les levures (*Saccharomyces cerevisiae*), l'existence d'une interaction entre GDAP1 et les tubulines (Estela *et al.* 2011). En présence de ces mutations (R120Q, R120W, T157P, R161H, and R282C), les interactions entre les mitochondries et le cytosquelette sont moindres, ce qui explique le faible déplacement axonal des mitochondries et donc la physiopathologie des CMT2K

Mais ces modèles ne sont que des modèles animaux, et ne permettent pas de transposer l'ensemble des observations sur des patients humains.

4.3.3 Les modèles cellulaires

Les cultures utilisées peuvent être de deux natures différentes.

Soit des cultures primaires de cellules ont été utilisées, comme les cellules des racines ganglionnaires dorsales de rat pour étudier les interactions entre neurones sensitifs et cellules de Schwann (Adama Ouedraogo, article en préparation). Cassereau et collègues ont étudié les fibroblastes dermiques de trois patients présentant une mutation dominante de GDAP1, C240Y. Ils ont montré que l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale était de 40% inférieure aux témoins alors que les mitochondries présentaient un diamètre 33% plus grand et une masse de 20% supérieure à celle des contrôles. GDAP1 serait donc impliqué dans la production d'énergie et dans le contrôle du volume mitochondrial (Cassereau *et al.* 2009).

Même si le problème inter-espèce semble être résolu, il existe toujours le problème de l'identité cellulaire. Dans les CMT axonales, les MN avec un axone long présentent une atteinte plus sévère que les MN avec un axone plus court, laissant penser que l'atteinte est longueur dépendante.

Pour essayer de répondre à cette problématique, des lignées cellulaires ont été développées. Elles ont été traitées avec du RA ou du NGF de manière à obtenir de longs prolongements (type MN like). Les lignées peuvent avoir différentes provenance comme le rat avec les PC-12, la souris avec les NSC-34, le singe avec les COS-7 ou encore humaine avec les SH-SY5Y.

Niemann et collègues utilisent de nombreuses lignées cellulaires comme les COS-7 (cellules rénales de singe), les cellules HeLa (cellules épithéliale humaine), les Neuro2a et les N1E-115 (cellules de neuroblastome de souris), pour caractériser les CMT. L'expression dans ces cellules de *GDAP1* induit la fragmentation des mitochondries sans induire l'apoptose. La répression de *GDAP1* par des shRNA favorise la formation d'un réseau tubulaire. Les mutations récessives de *GDAP1* montrent une réduction de l'activité de fission, alors que les mutations dominantes interfèrent avec la fusion mitochondriale et conduisent à la production de ROS (Niemann *et al.* 2009).

Pla-Martin et collègues ont débuté leurs travaux sur les cellules SH-SY5Y issues de neuroblastomes humain. Ces cellules ont été transfectées par un plasmide contenant un sh-RNA dirigé contre *GDAP1*. L'observation de ces cellules a montré une augmentation du nombre de mitochondrie ainsi qu'une diminution de la connectivité inter-mitochondriale, ce qui semblerait favoriser leur mobilité. De plus, il a été montré que la protéine GDAP1 interagissait avec RAB6 et la caytaxine, deux protéines impliquées dans le transport, respectivement, rétrograde et antérograde. GDAP1 et RAB6 interagissent à l'interface entre les mitochondries et le RE, et une déplétion de GDAP1 provoque une diminution de la co-localisation de ces deux organites. Ceci laisse penser que GDAP1 aurait un rôle dans l'adressage des mitochondries au RE. Les mitochondries sont aussi impliquées dans la régulation de l'homéostasie du calcium. En effet, elles sont capables de capter le calcium suite à un signal cellulaire et de se déplacer jusqu'à la source de calcium, comme le RE. Ainsi, une mutation non-sens affecterait le réseau mitochondriale, sa liaison avec le RE et indirectement la régulation du stockage du calcium (Pla-Martín *et al.* 2013).

Par la suite, Pla-Martin et collègues se sont récemment intéressés à l'interaction de GDAP1 avec la Junctophilin-1 (JPH1) lors de mutation dominante de GDAP1 p.R120W. Les Junctophilines contribuent à la formation de complexes membranaires jonctionnels qui relie

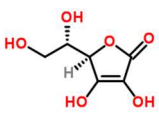
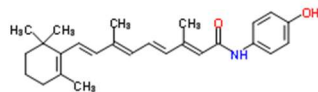
la membrane plasmique avec le réticulum endoplasmique ou sarcoplasmique dans les cellules excitables, en jouant un rôle important dans l'homéostasie calcique. Ils ont montré avec les cellules SH-SY5Y lors de la mutation $GDAP1^{p.R120W}$, que la présence de JPH1 était capable de restaurer partiellement l'homéostasie calcique. Lorsque ces deux protéines présentaient une mutation, l'atteinte était beaucoup plus sévère. Cette atteinte était comparable à celle retrouvait pour les cellules KO-Gdap1. Ils en concluent que JPH1 et GDAP1 partagent une voie de signalisation commune dépendant l'une de l'autre et que JPH1 peut contribuer aux atteintes phénotypiques des mutations de *GDAP1* (Pla-Martín *et al.* 2015).

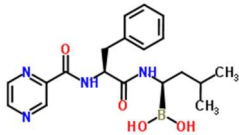
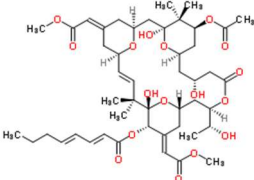
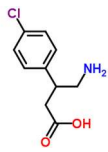
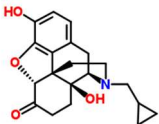
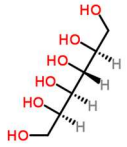

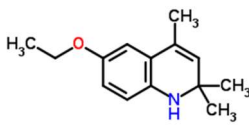
Les cellules souches induites à la pluripotence permettent d'obtenir une quantité illimitée de motoneurons après reprogrammation et différenciation des propres cellules de peau du patient en conservant l'anomalie génétique. Ce point sera développé dans le chapitre (5.3 cellules souches pluripotentes induites, iPS) avec la mise en place d'un modèle CMT par Saporta et collègues.

4.3.4 Perspectives cliniques

De récentes études très encourageantes ont permis l'identification de molécules actives contre les CMT1A ciblant pour la plus part PMP22 (Tableau 6). L'avancé la plus aboutie reste celle de Pharnext avec le PXT3003 (Attarian *et al.* 2014b; Chumakov *et al.* 2014), combinant 3 drogues, le Baclofène, la Naltrexone et le Sorbitol, utilisées à faible concentration. Cette combinaison permet de diminuer l'expression des ARNm de PMP22 dans les cellules de Schwann. Le PXT3003 améliore la myélinisation des petites fibres, augmente la conduction nerveuse, améliore la régénération axonale, la remyélinisation chez le nerf murin justifiant de futurs tests cliniques.

Tableau 6 : Drogues testées contre les CMT1A

Composé	Cible, Indications et Statu	Source	Référence
Vitamine C 	Adénosine cyclique monophosphate Indications multiples A échoué lors des essais cliniques	INSERM	(Kaya <i>et al.</i> 2008)
Fenretinide 	Interagit avec le récepteur à l'acide rétinoïque et le récepteur X rétinoïque Cancer ovarien / pulmonaire Préclinique	NCATS	(Jang <i>et al.</i> 2012)

Composé	Cible, Indications et Statu	Source	Référence
Bortézomib 	Inhibiteur de l'activité chymotrypsine-like du protéasomes 26S Myélome Préclinique	NCATS	(Jang <i>et al.</i> 2012)
Bryostatine 	Protéine kinase C Cancer du pancréas / rein et mélanome Préclinique	NCATS	(Inglese <i>et al.</i> 2014)
Baclofène (1) 	PXT3003 (combinaison de 3 drogues utilisées à faible concentration) (1) cible le récepteur de l'acide- γ -aminobutyrique (GABA(B)) (2) cible les récepteurs opioïdes (3) se lie à des récepteurs muscariniques acétylcholine RCPG (1) traitements antispastiques (2) aide au maintien de l'abstinence chez les patients alcoolodépendants (3) Constipation / Dyspepsies Achèvement de la phase 2 de l'essai clinique	Pharnext	(Attarian <i>et al.</i> 2014b; Chumakov <i>et al.</i> 2014)
Naltrexone (2) 			
Sorbitol (3) 			
ADX71441 	Cible le GABA (B) et réduit l'expression de PMP22 ? Préclinique	Addex Therapeutics	www.addextherapeutics.com
Ethoxyquine 	Modulateur de HSP90 Non Pharmaceutique (utilisé comme conservateur alimentaire et comme pesticide) Préclinique	Johns Hopkins University	(Zhu <i>et al.</i> 2013)

D'après (Ekins et al. 2015)

A l'heure actuelle il n'existe pas d'essai clinique ciblé pour les CMT-GDAP1, mais seulement des tests à « spectre large », tentant d'apporter un léger bénéfice pour les CMT. Selon

« clinicaltrials.gov », une étude demandée par la Food and Drug Administration aux Etats-Unis en septembre 2007, suggère l'utilité du co-enzyme Q10 (CoEQ10) dans les CMT. Dans cette étude, 600 mg /jour de CoEQ10 est administré en deux prises de comprimés à croquer de 300 mg, pendant 60 semaines. Au cours de ce test, différents paramètres sont contrôlés pour vérifier l'innocuité du traitement (test sanguin, fonction hépatique...). Cette étude a pris fin en janvier 2013 sans aucune communication de résultat depuis, laissant penser à l'échec du traitement. Cependant la CoEQ10 a fait l'objet de nombreux espoirs, comme par exemple dans la pathologie de parkinson. Une étude fait référence de l'innocuité et de la bonne tolérance du traitement mais aucun bénéfice clinique n'a été démontré (Beal *et al.* 2014).

Il semble important de comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la maladie de manière à pouvoir cibler une classe thérapeutique spécifique pour répondre à la bonne problématique.

5 Cellules souches pluripotentes induites

Les cellules souches induites à la pluripotence ou iPSc représentent une alternative confortable à l'utilisation des cellules souches embryonnaires d'un point de vue législatif mais elles permettent aussi de pouvoir générer un grand nombre de cellules spécialisées à partir de simples biopsies de peau (cellules somatiques) de patients porteurs d'une anomalie génétique.

5.1 Définition cellules souches

A l'heure actuelle, le concept de cellule souche est très vaste. Les cellules souches possèdent deux propriétés principales qui sont :

- l'auto-renouveaulement, c'est-à-dire qu'elles sont capables de se diviser de manière identique (avec les mêmes caractéristiques que la cellule mère) indéfiniment et de façon physiologique, contrairement aux cellules cancéreuses ;
- capacité à générer n'importe quel type de cellules spécialisées après un processus de reprogrammation.

Il n'existe donc pas un type de cellules souches mais de plusieurs catégories de cellules souches, classées selon leur capacité de différenciation (Fig. 35).

Les cellules souches totipotentes sont capables de donner l'ensemble des cellules spécialisées (cellules du cœur, du poumon, de la peau, du nerf...) ainsi que les annexes embryonnaires, comme le placenta ou le cordon embryonnaire. Elles ne sont présentes que lors de la fusion des gamètes, formation de l'œuf ou zygote, jusqu'au stade morula, soit quelques jours seulement.

Les cellules souches pluripotentes sont capables de donner tous les types cellulaires excepté les annexes embryonnaires. A j4, la morula prend le nom de blastocyste et à ce stade les cellules ont déjà perdu une partie de leur capacité de différenciation. Ce sont les cellules, issues de la masse interne du blastocyste, qui vont particulièrement nous intéresser par la suite.

Les cellules souches multipotentes sont déjà orientées selon les trois feuillet embryonnaires (ectoderme, mésoderme, endoderme), elles vont alors s'engager dans une voie déterminée et donneront uniquement des cellules spécialisées que de ce feuillet embryonnaire. Ces cellules sont trouvées chez le fœtus comme chez l'adulte mais leur potentiel de différenciation est déjà nettement plus faible que les cellules souches totipotentes ou pluripotentes. Chez le fœtus, la fonction de ces cellules est de permettre l'organogenèse, c'est à dire la mise en place coordonnée des différents tissus ; c'est par exemple le cas des cellules souches des crêtes neurales ou de la gelée de Wharton du cordon ombilical. Chez l'adulte, elles vont proliférer de manière limitée, ne pouvant donner naissance qu'à un nombre restreint de cellules différenciées, et par opposition aux cellules souches embryonnaires, il en existe de nombreux types. Leur fonction est de réparer les tissus d'un organisme pour maintenir son intégrité fonctionnel. Différents types de cellules multipotentes peuvent être décrits comme les cellules souches mésenchymateuses ou les cellules souches hématopoïétiques. Les cellules souches mésenchymateuses sont des cellules souches d'origine mésodermique présentes dans divers types de tissus de l'organisme, tels que la moelle osseuse ou le tissu adipeux. Leur nombre décline avec l'âge et elles peuvent se différencier en de nombreux types cellulaires tels que des ostéoblastes, des chondrocytes ou encore des adipocytes. Les cellules souches hématopoïétiques sont issues de la moelle osseuse, en particulier du pelvis du fémur et du sternum. Elles donneront après différenciation des cellules myéloïdes (monocytes, macrophages, neutrophiles, éosinophiles...) ainsi que les cellules de la lignée lymphoïde (cellules T, cellules B...). De façon plus intéressante dans notre domaine d'application, nous pouvons citer les cellules souches neurales de la zone sous ventriculaire (Kriegstein and Alvarez-Buylla 2009). Cette zone serait un centre de neurogenèse où des cellules astrocytaires de type B pourraient donner des neurones, des oligodendrocytes et astrocytes, suite à un traumatisme.

Les cellules souches dites unipotentes sont capables de donner uniquement un type de cellule spécialisée. Ce terme est utilisé pour des cellules présentant des capacités de différenciation extrêmement restreintes, comme les cellules satellites du muscle squelettique.

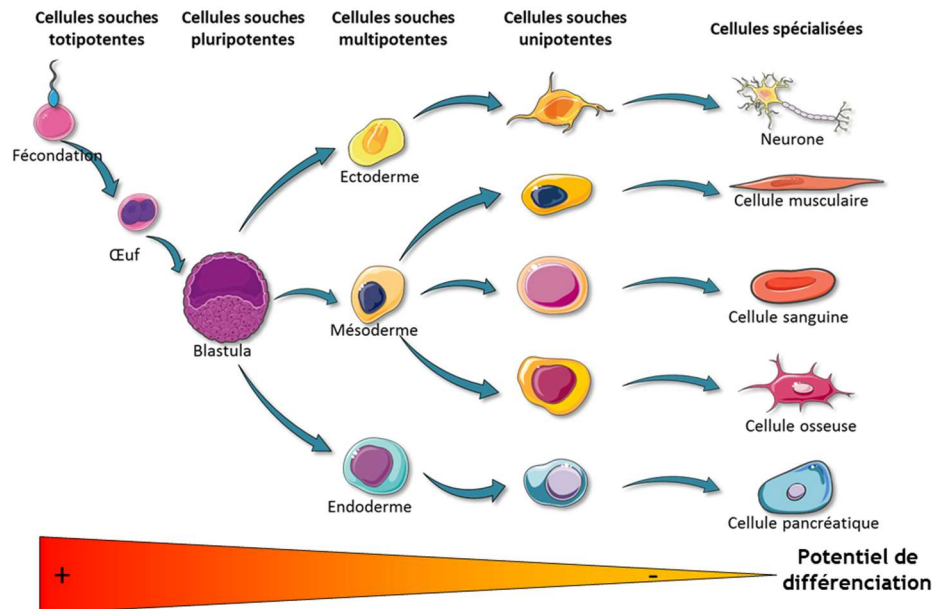


Figure 35 : Les différents types de cellules souches

Les cellules souches totipotentes possèdent la capacité de différenciation la plus importante, contrairement aux cellules souches unipotentes capables simplement de donner la cellule spécialisée pour laquelle elle a été programmée.

5.2 Cellules souches embryonnaires (cellules ES)

Les cellules ES sont définies par certains critères comme la pluripotentiaité, et la capacité de se différencier.

5.2.1 Historique et Législation

L'utilisation de cellules souches en médecine fait suite aux 1^{ères} fécondations *in-vitro* (FIV) réalisées en 1978 en Grande Bretagne avec la naissance de Louise Brown et d'Amandine en France en 1982. A partir de ce moment-là, les gouvernements ont commencé à réfléchir sur le statut de l'utilisation des cellules souches embryonnaires. Les premières lignées de cellules ES ont été établies chez la souris à partir de cellules issues de la masse interne du blastocyste en 1981 par Evans, Kaufman et Martin (Evans and Kaufman 1981; Martin 1981).

Ce n'est que bien plus tard, en 1994, que va naître la 1^{ère} loi de bioéthique française. Il faut noter que la France fut une des premières nations à s'être doté d'une législation complète et bien définie sur les problèmes bioéthiques. Toutes recherches sur l'embryon étaient prohibées en France, à une exception, la recherche sur l'embryon dans le but de le guérir lui-même. Dans un même temps, la recherche sur l'embryon est autorisée en Grande Bretagne.

C'est dans ce climat de balbutiement de recherche sur les cellules ES, que vers la fin des années 1990 aux Etats Unis, Thomson établit la 1^{ère} lignée humaine de cellules ES, laissant place à de nombreux espoirs en termes d'applications médicales (Thomson 1998). Ce travail engendre de nouvelles questions, comme les suivantes : doit-on considérer une cellule ES comme un embryon et doit-on lui appliquer la même loi bioéthique ?

Ce n'est que quelques années plus tard, en 2004, que la loi de bioéthique française s'assouplit mais néanmoins reste ferme. Elle maintient l'interdiction de toutes recherches sur l'embryon humain, mais crée une agence de réglementation, l'Agence de Biomédecine, pouvant délivrer ou non des dérogations à cette interdiction. Ces conditions restent strictes. Cette recherche doit avoir pour objectif un progrès thérapeutique majeur et ne peut se pratiquer que sur des embryons surnuméraires de FIV ne faisant plus l'objet de projet parental, parents qui ont signé un consentement éclairé et ont été informés de la finalité du projet. C'est dans ce contexte particulièrement drastique que débute la recherche sur les ES en France.

La loi de bioéthique du 7 juillet 2011, reste proche de celle de 2004 mais l'objectif n'est plus un progrès thérapeutique majeur mais bien un progrès médical majeur, laissant un champ d'action plus large pour les équipes de recherche voulant une dérogation. Parallèlement, il y a un renforcement du contrôle des dérogations puisque ces recherches sur les cellules ES ne seront réalisées qu'à « condition que ces recherches ne puissent être poursuivies par une méthode alternative d'efficacité comparable, en l'état des connaissances scientifiques »

Cette loi est revue le 7 août 2013 (Annexe V), puis le 11 février 2015 encadrant un peu plus la recherche propre sur les cellules ES, mais aussi structurant les moyens de prélèvements (consentement des parents, récupération des embryons, cryo-préservations...), les procédures de demande de dérogation (demande de dérogation pour 5 ans renouvelable...), les équipes de recherche et leurs conditions de travail (locaux, matériel, sécurité, traçabilité et rapports...).

Le climat mondial est très complexe sur ce sujet et la politique de recherche sur les cellules ES varie considérablement d'un pays à l'autre. En revanche, la quasi-totalité des pays réglemente cette recherche. On peut distinguer trois catégories de pays en fonction de la position qu'ils adoptent, soit une politique de recherche permissive, comme le Japon, le Royaume-Uni, Israël ou encore la Chine, soit une politique flexible comme aux États-Unis

depuis la présidence d'Obama, la Norvège, le Brésil, ou le Canada, soit une politique restrictive comme l'Allemagne, l'Autriche, l'Irlande, l'Italie ou la Pologne.

5.2.2 Comparaison des cellules ES murines et humaines

Les cellules ES murines (mES) et humaines (hES) partagent de nombreuses caractéristiques mais aussi se différencient par d'autres (Koestenbauer *et al.* 2006), comme sur le plan fonctionnel, avec la composition des marqueurs de surface, ou encore avec l'expression de certains des facteurs de transcription.

D'un point de vue fonctionnel, l'ensemble de ces cellules a la capacité de donner l'intégralité des cellules de l'organisme. Elles peuvent former les 3 feuillets embryonnaires ectoderme, mésoderme et endoderme. *In vitro*, un stade de sphère ou corps embryonnaire (EB : Embryoid Bodies) est nécessaire pour l'obtention de ces trois feuillets. Par définition, un EB est un amas de cellules ES flottantes, de nature sphérique et qui dans des conditions standards va perdre la caractéristique de pluripotence des cellules souches qui le composent. Ces cellules vont pouvoir se différencier spontanément vers les 3 voies embryonnaires. La formation d'EB puis la différenciation spontanée vers les trois feuillets constitue un des contrôles pour vérifier la pluripotence de ces cellules (Hoffman and Carpenter 2005). Parallèlement, des cellules ES peuvent être greffées à des modèles murins de façon à obtenir les trois types de feuillets embryonnaires *in vivo* par l'intermédiaire de tératomes. Mais depuis le décret 2013-118 et les 5 arrêtés du 1er février 2013 sur l'expérimentation animale, l'expérience sur animaux n'est permise que si elle est nécessaire et irremplaçable. De plus, une méthode ne nécessitant pas d'animaux ou une réduction de ce nombre au strict minimum doit être fortement encouragée.

De nombreux marqueurs de surface, membranaires et nucléaires ont pu être mis en évidence. Ainsi certains apparaissent spécifiques aux cellules mES, comme le marqueur membranaire SSEA-1 (Stage-Specific Embryonic Antigen-1) qui est un glycolipide jouant un rôle dans l'adhésion cellule-cellule, alors qu'il serait absent chez les cellules hES. En revanche les hES présenteraient d'autres marqueurs membranaires qui seraient spécifiques comme SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 (Tumor Rejection Antigen 1-60) ou encore TRA-1-81. Les TRA sont des kératanes sulfates exprimées par les cellules internes du blastocyste, dont la fonction reste encore mal connue (Badcock *et al.* 1999).

De nombreux facteurs de transcription sont exprimés par les cellules ES et jouent un rôle crucial dans le maintien de la pluripotentialité ainsi que l'auto-renouvellement. Ils sont aussi utilisés pour les caractériser. Aucune différence majeure de facteurs de transcription n'est à

noter entre les hES et les mES. Parmi les principaux, nous pouvons citer Oct4, Sox 2 ou Nanog qui seront développés dans le chapitre 5.3.2 Reprogrammation. Ces facteurs de transcription sont utilisés pour caractériser la pluripotence de ces cellules soit lors de marquages immunocytologiques soit lors de RT-PCR temps réel (Friel *et al.* 2005).

Enfin, l'une des différences majeures est mise en exergue par le facteur permettant d'établir et de maintenir ces différentes cellules souches. Des études ont permis d'établir des lignées de cellules souches pluripotentes à partir de l'épiblaste murin (juste après l'implantation), ces cellules portent le nom d'EpiSC pour Epiblast Stem Cell. De manière étrange, après caractérisation par l'équipe de Brons, ces cellules présentaient des caractéristiques similaires aux hES et non aux mES (Brons *et al.* 2007). Chez la souris, ce facteur est le facteur LIF (Leukemia Inhibitor Factor), qui a été redécouvert par Smith et Williams en 1988 pour sa capacité à inhiber la différenciation des mES (Smith *et al.* 1988; Williams *et al.* 1988) puis Nichols en 1990 (Nichols *et al.* 1990). Lorsque les facteurs LIF ou BMP4 sont utilisés sur les cellules EpiSC la pérennité de ces cellules échoue. Par contre, comme pour les cellules ES ou iPS humaines développées plus loin, les voies de signalisation du FGF₂ et de l'Activine / Nodal sont nécessaires pour leur maintien. Toujours selon Brons et collègues, les cellules EpiSC pousseront en colonies plates et compactes ce qui est le cas pour les hES, mais très différent des cellules mES, qui elles poussent en petites colonies rondes (Brons *et al.* 2007). Ces ressemblances entre les cellules hES et EpiSC suggèrent l'hypothèse que les cellules hES seraient en réalité issues de l'épiblaste, ce qui expliquerait les nombreuses différences observées entre les cellules hES et les cellules mES (Kieffer *et al.* 2010).

5.2.3 Intérêts en recherche des cellules ES humaines

L'un des intérêts majeurs des hES est leur capacité de différenciation selon tous les types cellulaires de l'organisme. Hoffman et Carpenter listent les différentes avancées scientifiques sur la différenciation des hES *in vitro* en 2005 (Hoffman and Carpenter 2005). Ces cellules peuvent être engagées dans la voie mésodermique et des cardiomyocytes ou des leucocytes pourront être étudiés, mais aussi suivant la voie ectodermique ou cette fois des neurones ainsi que la glie sera obtenu, ou encore selon la voie endodermique où des hépatocytes pourront être obtenus (Annexe VI). Depuis 2005, de nombreux protocoles sur la capacité à entretenir et orienter les hES ont vu le jour. L'espoir thérapeutique a pris le dessus sur l'ensemble des problèmes soulevés par la recherche sur les cellules hES, et très vite est venu l'idée de modéliser des pathologies génétiques humaines. Le but est de comprendre les mécanismes impliqués dans

ces maladies afin de pouvoir proposer une nouvelle approche thérapeutique pour ne plus seulement soulager les symptômes de la maladie mais en traiter la cause.

En conclusion, les cellules hES présentent un potentiel énorme pour étudier le développement embryonnaire mais aussi pour créer des modèles de pathologies génétiques. Néanmoins il ne suffit pas qu'un laboratoire veuille travailler sur les cellules hES mais il faut qu'il en ait les moyens tant sur le plan financier, car c'est une activité extrêmement chronophage nécessitant du personnel qualifié mais aussi des locaux adaptés et une grande quantité de matériel spécifique, que sur le plan juridique. Les problèmes éthiques que soulève la question de la recherche sur les hES restent le principal frein. C'est pour toutes ces raisons que des méthodes alternatives ont tenté de voir le jour comme le transfert de noyaux, la fusion d'une cellule somatique avec une cellule souche embryonnaire ou les cellules souches pluripotentes induites.

5.3 Les cellules souches pluripotentes induites, iPS

5.3.1 Origine des iPS

Les cellules souches pluripotentes induites ou iPS ont été générées pour la 1^{ère} fois en 2006 par l'équipe du Pr Shinya Yamanaka, à partir de fibroblastes murins embryonnaires et adultes (Takahashi and Yamanaka 2006; Takahashi *et al.* 2007a). Ils ont réussi « un retour en arrière » des cellules somatiques au stade de cellules souches pluripotentes. Pour ce faire, ils ont étudié les gènes impliqués dans l'auto-renouvellement et le maintien de la pluripotence et ils ont retenu 24 gènes candidats. Ces 24 gènes devaient être exprimés simultanément pour garantir la reprogrammation des fibroblastes de souris en cellules iPS, mais seulement 4 de ces gènes étaient suffisants pour induire cette reprogrammation qui sont Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc. Les iPS obtenues présentaient exactement les mêmes caractéristiques que les cellules mES en terme de marqueur de surface, expression génique, capacité d'auto-renouvellement et capacité de différenciation (Takahashi and Yamanaka 2006).

Après reproduction de ces travaux par différents groupes, des cellules somatiques humaines furent utilisées pour générer des iPS avec succès (Takahashi *et al.* 2007b). Elles présentaient les mêmes caractéristiques que les cellules hES (marqueurs de surface, facteurs de transcription, capacité de différenciation, facteurs favorisant la pluripotentialité...)

A partir de 2007, la lourdeur administrative et législative d'utilisation des hES était levée au profit de cellules somatiques provenant du patient lui-même, et donc ayant conservé le patrimoine génétique originel. Ce fut une véritable révolution dans le monde scientifique, car cette technique a permis d'avancer à pas de géant sur l'établissement de modèle de pathologies génétiques et donc sur la compréhension et la proposition d'éventuelle thérapeutique. Pour ces travaux innovants Shinya Yamanaka s'est vu attribué avec John Gurdon le prix Nobel en 2012.

5.3.2 Reprogrammation

L'obtention d'iPS va dépendre de multiples paramètres qu'il faudra bien choisir au préalable, afin d'augmenter l'efficacité de la reprogrammation. En effet le type cellulaire utilisé, mais aussi le cocktail de facteurs de croissance nécessaire, et enfin la méthode de reprogrammation seront des étapes cruciales pour l'obtention la plus efficace possible de cellules iPS.

5.3.2.1 Choix du type cellulaire

Théoriquement, toutes les cellules de patient jeune ou âgé peuvent être reprogrammées afin d'obtenir des iPS. Mais le choix de ces cellules somatiques doit être le moins contraignant et le moins invasif possible pour le patient. De plus, ces cellules doivent garantir une prolifération facile lors de la remise en culture après le prélèvement et avoir une forte efficacité de reprogrammation (Kiskinis and Eggan 2010). Les fibroblastes dermiques répondent à tous ces critères puisque l'on peut les prélever par simple biopsie de peau, ils présentent une très grande prolifération en culture et une forte efficacité de reprogrammation. S. Yamanaka a utilisé des fibroblastes murins puis humains lors des premières reprogrammations en iPS. Depuis beaucoup de types cellulaires ont été reprogrammés chez la souris comme des cellules hépatocytaires (Aoi *et al.* 2008), des progéniteurs neuraux (Kim *et al.* 2009), ou encore des lymphocytes B (Hanna *et al.* 2008), chez l'humain des kératinocytes (Aasen *et al.* 2008), des adipocytes (Sun *et al.* 2009), ou encore des cellules sanguines (Loh *et al.* 2009). L'efficacité de la reprogrammation est aussi un facteur à prendre en compte dans le choix du type de cellules (Yamanaka 2009) par exemple la reprogrammation de kératinocytes humains avec les quatre vecteurs rétroviraux a une efficacité de l'ordre de 1% contre 0,01 à 0,1% pour les fibroblastes (Aasen *et al.* 2008). Les kératinocytes apparaissent alors comme des cellules de choix puisque

le prélèvement peut se faire à partir d'un cheveu de patient, ce qui reste encore moins invasif qu'une biopsie de peau.

De plus, l'équipe de Lapasset à Montpellier a reprogrammé des fibroblastes d'une personne centenaire avec succès (Lapasset *et al.* 2011). Les iPS produites possédaient les mêmes propriétés que les cellules hES, mais chose plus étonnante, la taille des télomères était réinitialisée comme l'activité mitochondriale et le stress oxydatif (comparable à ceux observés chez les hES) signifiant un « rajeunissement » de ces cellules. Cette « jeunesse » est conservée lors de la différenciation donnant de nouveaux espoirs pour la médecine régénérative des personnes âgées.

Une fois le type cellulaire choisi, le prélèvement réalisé, et la remise en culture faite, il ne faut pas attendre trop de passages pour reprogrammer les cellules. Le passage est le nombre de fois où les cellules sont décollées de leur support grâce à une enzyme. Selon Takahashi, il ne faudrait pas attendre plus de trois passages pour reprogrammer les cellules de manière à éviter la sénescence due à la réplication (Takahashi *et al.* 2007a).

5.3.2.2 Choix des facteurs de reprogrammation

Comme décrit précédemment Takahashi et Yamanaka utilisèrent 24 gènes différents dans des vecteurs viraux pour reprogrammer des fibroblastes dermiques en iPS (Takahashi and Yamanaka 2006). Après quoi, des tests ont été réalisés pour réduire au maximum le nombre de facteurs nécessaires pour la « réexpression » de la pluripotentialité, et sont Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc. Quelques années après cette découverte, des études ont montré que les facteurs Oct4 et Sox2 étaient les facteurs primordiaux, et les autres pouvait être remplacé par LIN-28 et Nanog (Yu *et al.* 2007; Nakagawa *et al.* 2008).

L'expression de **Oct4** (octamer-binding transcription factor 4) ou POU5F1 est essentielle pour le maintien de la pluripotence pour les cellules ES (Amabile and Meissner 2009). Il faut savoir que la suppression ou l'augmentation d'Oct4 d'un facteur 2 conduit à la différenciation cellulaire.

Sox2 (sex-determining region Y-box 2) joue un rôle dans l'auto-renouveau des cellules ES et forme un complexe hétérodimérique avec Oct4 (Amabile and Meissner 2009). A eux deux ils constituent une sorte de boucle d'auto-amplification, c'est-à-dire qu'ils régulent l'expression de plusieurs facteurs de transcription relatifs à la pluripotence, y compris la leur (Do and Schöler 2009). De plus selon cette même publication, Sox2 et Oct4 auraient une action

indirecte sur la transcription génique en agissant sur la structure de la chromatine, la méthylation de l'ADN, les miARN et l'activation du chromosome X.

Klf4 (Krüppel-like factor 4) est un facteur de transcription très répandu avec un double rôle. Il agirait en tant que protéine oncogène et comme suppresseur de tumeurs, et il peut à la fois activer la transcription comme la réprimer selon les gènes cibles (Amabile and Meissner 2009). Par exemple P53, inhibiteur de Nanog, serait inhibé par Klf4, mais il pourrait activer p21, inhibiteur de la prolifération. Cependant, p21 est inhibé par c-Myc, indiquant que la balance entre Klf4 et c-Myc est importante pour l'induction de la pluripotence. Selon Do, il stimulerait l'expression Nanog, c-Myc et d'autres facteurs de transcriptions (Do and Schöler 2009).

c-Myc joue un rôle dans la régulation du cycle cellulaire, la prolifération, la croissance, la différenciation et le métabolisme (Amabile and Meissner 2009). Il induit l'acétylation des histones (Takahashi and Yamanaka 2006), ce qui rend l'ADN plus accessible aux facteurs de transcription. Les iPS peuvent être obtenues sans c-Myc comme nous l'avons dit précédemment, mais l'efficacité est considérablement diminuée. Cependant, c-Myc est un oncogène et son utilisation pour reprogrammer des cellules somatiques lors de l'utilisation en thérapeutique doit être limitée (pour la greffe notamment).

Nanog est l'un des premiers facteurs décrit dans l'auto-renouveau et la pluripotence des cellules ES, et donc sa diminution va pousser les cellules à se différencier. Nanog ne fait pas parti des deux facteurs essentiels pour la reprogrammation. Ceci peut en partie être expliqué par sa stimulation par Klf4 décrit précédemment.

LIN28 est une protéine se liant à l'ARN impliqué dans le timing du développement, et agissant en augmentant la stabilité des ARNm (Amabile and Meissner 2009).

Le choix des facteurs de reprogrammation dépend de chaque équipe mais aussi de l'utilité des iPS par la suite. Les facteurs Oct4 et Sox2 sont présents quel que soit le cocktail utilisé. Certains utilisent le cocktail Yamanaka composé de Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc (Takahashi and Yamanaka 2006), certains préfèrent un autre cocktail composé de Oct4, Sox2, Lin 28 et Nanog (Nakagawa *et al.* 2008), ou encore les six facteurs à la fois afin d'augmenter l'efficacité de la reprogrammation (Liao *et al.* 2008). Dans ce travail, le cocktail de Yamanaka a été utilisé.

5.3.2.3 Méthodes de reprogrammation

Au cours des dernières années, de multiples techniques de reprogrammation ont été décrites et elles ont évolué pour proposer des méthodes efficaces et sûres pour les applications thérapeutiques (Fig. 36).

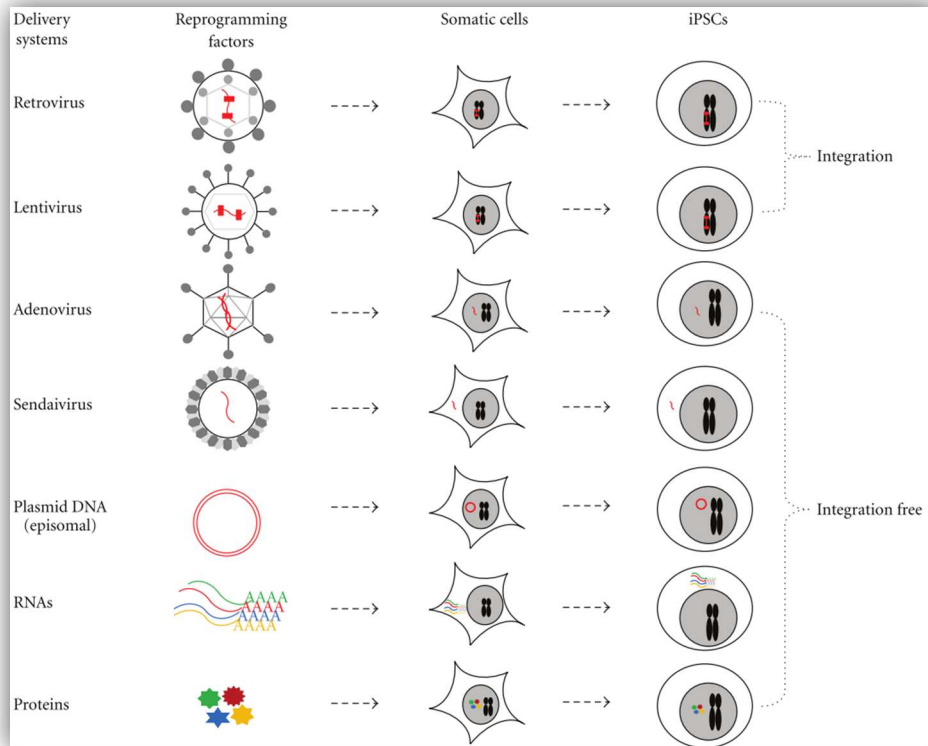


Figure 36 : Différentes méthodes de reprogrammation de cellules somatiques en cellule iPSC

D'après (Oh et al. 2012)

▫ Les vecteurs viraux intégratifs

Les toutes 1^{ère} reprogrammations (Takahashi and Yamanaka 2006) ont utilisé les vecteurs lentiviraux ou rétroviraux. Ces méthodes de reprogrammation sont certes très efficaces mais elles restent intégratives (s'intègrent au génome) et donc posent de nombreux problèmes. En s'intégrant au génome, ils peuvent par exemple interrompre la fonction de certains gènes, entraînant des effets indésirables comme la perte ou le gain de fonction voir l'apparition de tumeurs (Clarke and van der Kooy 2009). Les facteurs de transcription doivent être exprimés pendant la phase de reprogrammation, mais doivent être réprimés par la suite. Avec des vecteurs intégratifs, ils sont exprimés en permanence et cette expression prolongée peut conduire à des défauts de différenciation. Prenons l'exemple des oncogènes c-Myc et Klf4. Leur expression perpétuelle pendant la différenciation peut entraîner la formation de tumeurs (Okita et al. 2007).

Les rétrovirus de type MMLV (murine Maloney Leukemia virus) ont été utilisés pour produire les premières iPS. L'efficacité est très élevée, la viabilité cellulaire reste indemne, et l'expression des gènes intégrés pourrait devenir silencieuse au cours des processus épigénétiques. En revanche le nombre d'insertion dans le génome reste aléatoire. L'équipe de Zhang a développé en 2011 l'utilisation d'un vecteur rétroviral polycistronique comprenant les 4 facteurs de transcription dans un seul cadre de lecture combiné à de petites molécules nécessaires à l'établissement de lignées iPS (Zhang *et al.* 2011). Cette reprogrammation est rapide avec une grande efficacité.

Les lentivirus sont généralement dérivés du HIV et vont également intégrer le génome. Contrairement aux rétrovirus, ils peuvent s'intégrer dans le génome d'une cellule en division ou quiescente. Comme pour les vecteurs rétroviraux, il existe un vecteur lentiviral polycistronique ne permettant qu'une seule intégration du transgène (Sommer *et al.* 2009).

▫ Les vecteurs viraux non intégratifs

A cause de ces problèmes avec les vecteurs intégratifs, d'autres méthodes ont été développées, comme l'utilisation d'adénovirus, non intégratifs. Par exemple, Stadtfeld a utilisé des fibroblastes ainsi que des cellules hépatiques de souris pour obtenir des iPS par l'intermédiaire d'un adénovirus. Bien que l'efficacité soit inférieure aux vecteurs rétroviraux et lentiviraux, la réexpression des facteurs de transcription reste un problème (Stadtfeld *et al.* 2008).

Un autre système de vecteur viral sans intégration au génome a été développé, le vecteur Sendaivirus. C'est un virus à ARN qui réplique son génome exclusivement dans le cytoplasme. Il permet de générer de manière efficace des cellules iPS humaines (Fusaki *et al.* 2009), et il a été montré que l'expression du virus diminuait de manière progressive dans le temps, soit par des systèmes de sélection basés sur une variation de température (Ban *et al.* 2011), soit par des siARN spécifiques des vecteurs (Nishimura *et al.* 2011).

Une équipe a utilisé le système Cre/LoxP pour reprogrammer des cellules de patients dans la maladie de Parkinson (Soldner *et al.* 2009). Ce système est composé d'un vecteur lentiviral qui serait excisé après son intégration par la « Cre-recombinase ». Le promoteur de l'ubiquitine humaine du lentivirus FUGW-loxP, contenant un site loxP en 3' LTR a été remplacé par un promoteur « DOX-inductible » qui est suivi par les ADNc humains Oct4, Klf4, ou Sox2. Cependant il a été montré que ces systèmes peuvent laisser des traces insertionnelles lors de leur excision (Kaji *et al.* 2009).

Dans l'étude de Kaji, un transposon dit « piggy Bac » a été utilisé pour fournir les facteurs de transcription à la cellule somatique. Les transposons sont des séquences d'ADN qui ont la capacité de se déplacer sur des brins d'ADN à l'aide de protéines, les transposases. Ces protéines sont responsables du clivage et de la réinsertion des transposons dans le génome. Avec cette méthode, le transposon est d'abord intégré dans le génome, ce qui permet la transcription des facteurs de reprogrammation et l'induction de la pluripotence. Lors de la différenciation, une autre transposase peut être ajoutée pour cliver le transposon ne laissant aucun ADN exogène. Il est donc évident que le principal inconvénient de cette méthode est que la transposase peut à la fois cliver le transposon mais aussi le réinsérer à l'endroit voulu comme dans une autre partie du génome.

Néanmoins, les vecteurs viraux demeurent controversés en raison du nombre aléatoire de copies virales intégrées, ce qui peut provoquer à la fois la réactivation d'oncogènes, tels que Klf4 et c-Myc et, ce qui augmente le risque de cancer, laisser des « traces » insertionnelles ou encore s'intégrer à de multiples endroits du génome. De plus, toutes ces méthodes ne sont pas applicables en clinique du fait de l'utilisation de virus.

▫ Les autres vecteurs non intégratifs

▪ Plasmides

Les plasmides épisomiques furent utilisés pour la première fois par l'équipe d'Okita sur des cellules somatiques de souris (Okita *et al.* 2008). Des cellules iPS ont été obtenues sans intégration apparente de matériel exogène en les transfectant ou en les électroporant. L'efficacité de reprogrammation est faible mais tous les contrôles de pluripotence sont valides. Si-Tayeb réalisa des transfections en séries indépendantes pour les 4 facteurs de transcription (Oct4, Sox2, Nanog et LIN28) afin d'obtenir des cellules iPS humaines à partir de fibroblastes de prépuce (Si-Tayeb *et al.* 2010). L'équipe de Yu a montré que des cellules iPS humaines peuvent être produites avec une seule nucléofection de 3 plasmides codant les 6 facteurs de transcriptions et la protéine SV40LT (SV40 large antigen) possédant un effet positif sur la prolifération cellulaire (Yu *et al.* 2009).

Des petites molécules augmentant significativement l'efficacité de reprogrammation pouvant même être utilisées pour diminuer le nombre de facteurs de reprogrammation nécessaires. Elles agissent sur le remodelage de la chromatine, qui est une étape extrêmement importante pour la génération de cellules iPS (Yuan *et al.* 2011). Ce sont les inhibiteurs des histones déacétylases, comme l'acide valproïque, des histones déméthylase ou des histones

méthyltransférase. Il est également possible d'agir sur la méthylation de l'ADN en associant des inhibiteurs d'ADN méthyltransférase. Il peut s'agir aussi d'inhibiteurs des diverses voies métaboliques impliquées dans la reprogrammation comme des inhibiteurs du BMP. Leur effet est souvent rapide et réversible, permettant une bonne régulation temporelle. Les voies de signalisations sont rappelées dans la Fig. 37. Parmi ces molécules, seront utilisées dans ce travail, le PD0325901 qui est un inhibiteur de la voie de signalisation MEK/ERK (Lin *et al.* 2009), mais aussi le SB431542, et l'acide valproïque, inhibiteurs des histones déacétylases.

Cependant cette technique présente quelques inconvénients. L'efficacité de reprogrammation reste très faible (0.001%), et les plasmides comportent le SV40 dans leur séquence. SV40LT est un oncogène capable d'inactiver la voie p53 et donc de produire des cellules iPS avec un fort potentiel tumorigène. En revanche, l'utilisation de plasmides, y compris les plasmides non épisomiques, sont facilement disponibles à tout laboratoire avec des connaissances fondamentales en biologie moléculaire. Le grand intérêt de cette technique de vectorisation est son faible coût de reviens.

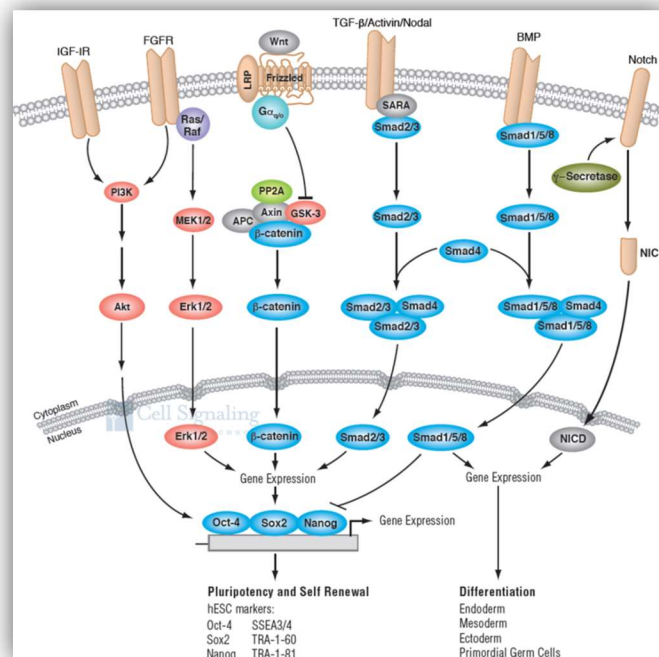


Figure 37 : Voie de signalisation impliquée dans l'établissement de la pluripotentiaité

Cell Signaling

Les deux principales caractéristiques des cellules ES ou iPS sont l'auto-renouvellement et la pluripotentiaité dont la voie de signalisation principale chez l'Homme est celle du TGF-β via la voie des Smad. L'ajout de FGF2, va permettre le renforcement de l'expression des gènes de pluripotence, ainsi que le blocage spécifique de la voie du BMP.

- ARN

Des études récentes indiquent un grand potentiel de reprogrammation des miARN. Ce sont des ARN régulateurs qui répriment l'expression post-transcriptionnelle de nombreux gènes cibles. D'après une étude de Anokye-Danso, la reprogrammation peut être réalisée avec le cluster miARN302/367, qui est connu pour être augmenté dans les cellules ES. La reprogrammation avec ces miARN est plus rapide et est environ 100 fois plus efficace que les vecteurs viraux mais cette étude utilise des vecteurs viraux pour délivrer les miARN dans la cellule (Anokye-Danso *et al.* 2011). Ce problème peut être levé en réalisant une transfection directe du miARN-200c double brin, en combinaison avec le miARN-320s et 369s. La durée de la reprogrammation est identique au protocole des vecteurs viraux, bien que l'efficacité soit très faible (Miyoshi *et al.* 2011). Une autre stratégie concernant l'ARN est l'administration répétée journalière d'ARNm. Cette technique garantit une efficacité très élevée (1 à 2 %). Selon Yoshioka, une seule transfection d'un ARN synthétique polycistronique permettrait une forte expression des facteurs de transcription Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc (Yoshioka *et al.* 2013).

Avec les ARN tout risque d'intégration est exclu, et les cellules iPS présenteraient une signature globale se rapprochant plus de celle des cellules ES.

- Protéines

Les protéines Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc peuvent être délivrées directement dans la cellule en les fusionnant avec un petit peptide pouvant traverser les membranes et portant le nom de « Cell-penetrating reprogramming proteins ». Cette méthode nécessite de multiples additions de protéines pour être sûr qu'elles restent suffisamment longtemps de manière à induire la pluripotence. L'avantage de cette méthode est que les protéines sont dégradées par la cellule elle-même et qu'aucun facteur de reprogrammation ne persiste dans la cellule (Zhou *et al.* 2009).

- Bactérie

Le tractus gastro-intestinal humain est colonisé par une flore symbiotique et commensale. Les bactéries à acides lactiques (LAB) forment un groupe de probiotiques dont les caractéristiques sont bénéfiques pour la santé. Ohta et collègues ont démontré que des cellules multipotentes induites à partir de fibroblastes dermiques humains adultes par des LAB ont les mêmes caractéristiques que les cellules hES issues des EB (auto-renouvellement et différenciation selon les 3 feuillets embryonnaires) (Ohta *et al.* 2012; Ito and Ohta 2015).

Dans ce travail, les fibroblastes dermiques de patients après biopsie ont été nucléofectés par trois plasmides comprenant Oct4, Sox2, Klf4 et l-Myc, garantissant une efficacité accrue ainsi qu'une non intégration de ces plasmides (Okita *et al.* 2011) (Annexe VII). Cette étape de reprogrammation s'est déroulée au sein du laboratoire I-Stem, Génopole Evry (directeur : Professeur Marc Peschanski), sous la direction du Docteur Lina El Kassar.

5.3.3 Entretien et caractéristiques

5.3.3.1 Entretien

Une fois les cellules somatiques reprogrammées, les plus belles colonies seront sélectionnées et amplifiées jusqu'à leur utilisation pour une différenciation déterminée. Les colonies d'iPS sont généralement cultivées sur une couche de cellules nourricières de fibroblastes embryonnaires de souris ou MEF (prélèvement à environ 13 jours de gestation) inactivées (Fig. 38). Pour inactiver les MEF deux méthodes sont possibles, soit la mitomycine C soit l'irradiation, mais le but final reste le même, à savoir l'arrêt du cycle cellulaire, pour qu'elles ne prennent pas le dessus sur les cellules reprogrammées. Leur seule fonction est de compléter les cellules iPS. Un autre type cellulaire est couramment employé par les équipes d'I-Stem, les BJ-1. Ce sont des fibroblastes humains modifiés génétiquement pour synthétiser un facteur essentiel au maintien de la pluripotence, le FGF₂. Ces cellules nourricières permettent aux différentes équipes de ne traiter les cellules iPS que tous les deux jours avec du FGF₂ contrairement aux MEF qui nécessitent une dose journalière. De plus elles évitent une quelconque contamination inter-espèces.

A l'heure actuelle des cultures sans cellules nourricières voient le jour afin de s'affranchir du problème de contamination entre deux types cellulaires différents. Les colonies de cellules iPS sont alors cultivées dans un milieu défini mais qui reste extrêmement coûteux en comparaison de la culture sur cellules nourricières. De plus, les boîtes de cultures nécessitent un support particulier mimant la matrice extracellulaire, le Matrigel®. Il s'agit d'un extrait protéique sécrété par les cellules Engelbreth-Holm-Swarm d'un sarcome murin, contenant principalement de la laminine, du collagène IV et de protéoglycanes mais également des facteurs de croissance et d'autres composés non définis. Le Matrigel® est coûteux, et il existe le plus souvent une variabilité inter-lots. Des alternatives à ce produit sont proposées comme la vitronectine, la fibronectine ou la laminine en utilisation unique ou combinée.

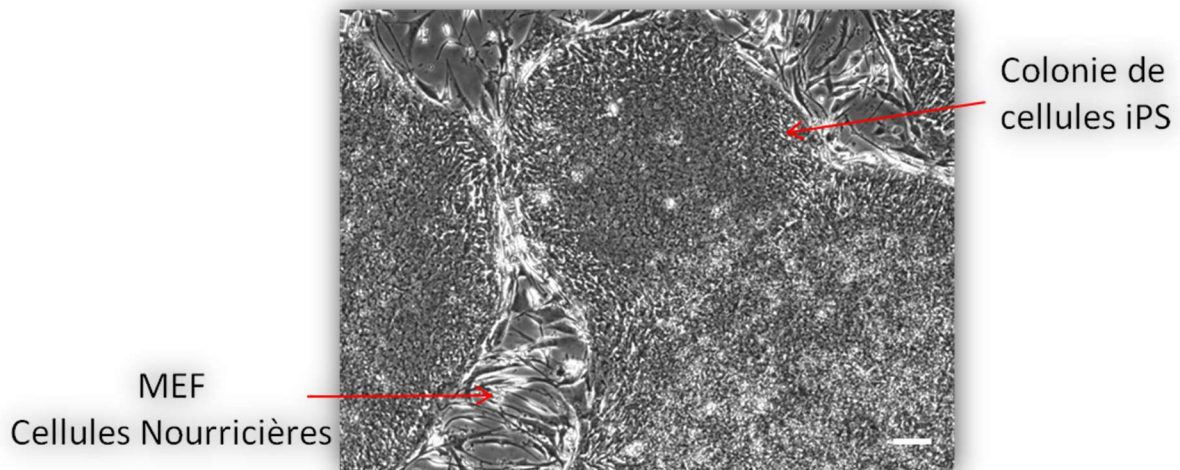


Figure 38 : Colonies de cellules iPS humaines cultivées sur un tapis de cellules nourricières
Microscopie optique, barre d'échelle 50 μm .

5.3.3.2 Caractéristiques et contrôles

Les caractéristiques des iPS sont similaires à celles des hES ou des mES. Elles permettent de confirmer la pluripotence des iPS mais aussi leur auto-renouveaulement, et donc serviront à valider les clones d'iPS à la suite de la reprogrammation (Fig. 39).

- Les cellules iPS humaines forment des colonies rondes, à bordure nette, et plus aplaties que les colonies de cellules ES. Le rapport noyau cytoplasme est de 1 avec un noyau volumineux, avec un nucléole important et un cytoplasme peu abondant.
- Au niveau moléculaire, elles expriment les marqueurs de surface spécifiques de la pluripotence qui sont SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 et TRA-1-81, mais aussi au niveau nucléaire, les facteurs de transcription Oct4, Sox2, Nanog.
- Ces cellules expriment fortement la phosphatase alcaline et la télomérase.
- Enfin, les cellules iPS humaines sont capables de former des EB qui lors de différenciation par défaut seront capables de former l'ensemble des types cellulaires des trois feuillettes embryonnaires (ectoderme, mésoderme, endoderme) de l'organisme *in vitro* comme *in vivo*.
- Enfin un caryotype sera réalisé régulièrement de manière à s'assurer qu'aucune anomalie génétique n'a été entraînée par la reprogrammation des cellules somatiques, mais aussi, qu'aucune anomalie n'apparaît suite à l'entretien cellulaire.

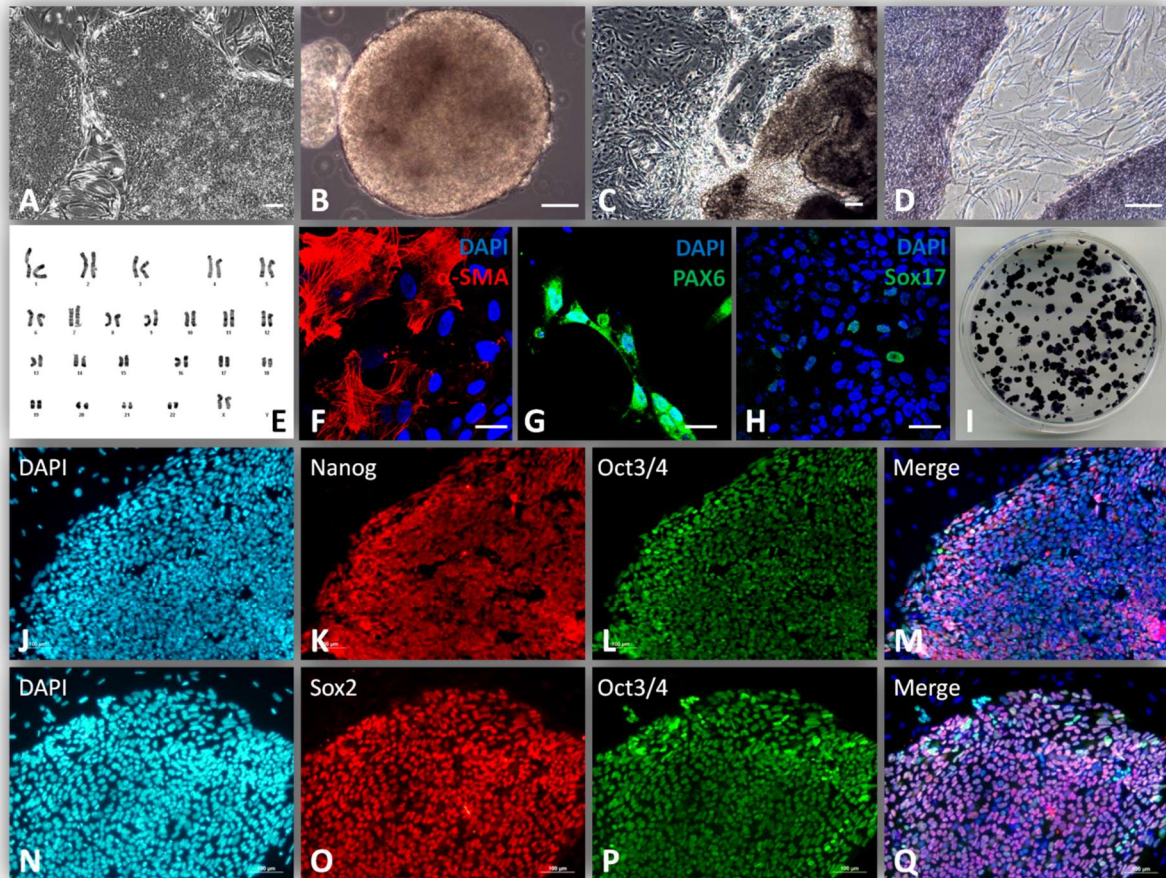


Figure 39 : Caractéristiques des cellules iPS humaines

Les fibroblastes dermiques humains sont reprogrammés avec le cocktail de Yamanaka en cellules iPS (A), ces cellules peuvent former des corps embryoïdes (EB) (B), qui vont être par la suiteensemencés (C), et dont les cellules forment après une différenciation spontanée les trois feuilletsembryonnaires, le mésoderme (F) caractérisé par l'actine α musculaire lisse, l'ectoderme (G) caractérisé par PAX6, et l'endoderme (H) caractérisé par Sox17. Les colonies de cellules iPS sont positives pour la phosphatase alcaline contrairement aux cellules nourricières qui les entourent (D et I) et présentent un caryotype normal (E). Barre d'échelle 50 μ m.

5.3.4 Différenciation des iPS et espoirs thérapeutiques

5.3.4.1 Mémoire épigénétique

Lors de la reprogrammation des cellules iPS, le profil épigénétique des cellules somatiques est théoriquement effacé avec l'établissement de nouvelles marques (nouveau profil de méthylation, modification de des histones...) nécessaires à l'obtention du profil « souche » des cellules (Liang and Zhang 2013). Mais selon l'équipe de Polo, les clones d'iPS présentent des marques de mémoire épigénétique des cellules somatiques avant leur reprogrammation et ces marques peuvent affecter une future différenciation (Polo *et al.* 2010). Son équipe a comparé des cellules iPS obtenues à partir de fibroblastes des souris, des cellules

hématopoïétiques et des fibres musculaires, exprimant des profils transcriptionnels et épigénétique différents. Il démontre ainsi que la différenciation des cellules iPS en EB peut être influencée par l'origine cellulaire. Les cellules iPS avec un faible nombre de passages conservent une mémoire épigénétique se manifestant par une difficulté à répondre aux stimulations d'une voie de différenciation. Ce problème est atténué par un nombre plus important de passage. Ces variations de l'état de méthylation des différents gènes vont orienter la différenciation en faveur du lignage d'origine (Bar-Nur *et al.* 2011).

5.3.4.2 Etat des lieux des différentes applications

La découverte de S. Yamanaka a permis une avancée considérable dans le domaine scientifique et a ouvert de nouvelles perspectives quant à la modélisation de maladies d'origine génétique. De ces travaux sont nés de fabuleux espoirs thérapeutiques, tant sur la compréhension de mécanismes physiopathologiques que sur la greffe autologue de cellules différenciées, ou encore le test de drogues (Fig. 40).

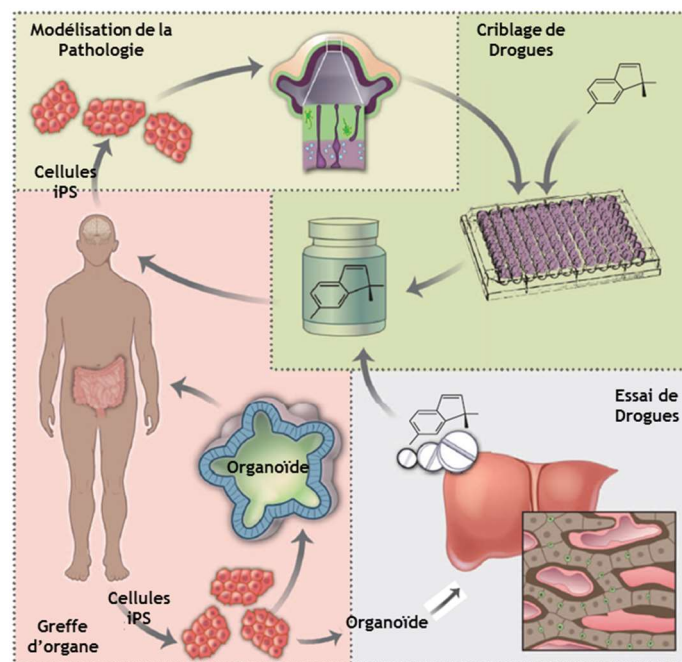


Figure 40 : Potentiel thérapeutique des cellules iPS et des organoïdes

D'après (Lancaster and Knoblich 2014)

Certaines pathologies peuvent être modélisées à partir de cellules iPS. Ce type de modèle peut ensuite être utilisé pour tester l'efficacité de drogues (criblage haut débit) *in vitro* avant de passer à des modèles animaux (carré vert). Des organoïdes peuvent être développés à partir de cellules iPS de patient pour tester la toxicité de drogues, par exemple lors de la différenciation des organoïdes vers la voie hépatique de façon à modéliser un foie (carré gris) ou ces organoïdes peuvent fournir des possibilités de greffes autologues (carré rose).

Théoriquement, les cellules iPS peuvent se différencier en n'importe quelles autres cellules de l'organisme. La réalité est plus complexe, mais certains protocoles de différenciation sont bien établis (Fig. 41). Par exemple, elles ont pu être différenciées en cellules neurales (Lancaster and Knoblich 2014), en cellules cardiaques (Fuerstenau-Sharp *et al.* 2015), en adipocytes bruns (Nishio and Saeki 2014), en cellules de l'épithélium pigmentaire de la rétine (Reichman *et al.* 2014)... Des pathologies dont les cellules touchées étaient imprélevables ont pu être étudiées alors qu'avant cette technique il n'existait que des modèles animaux, ou l'établissement de corrélation plus ou moins chanceuses avec soit des lignées cellulaires soit des cultures primaires d'un autre tissu, et pour les équipes les mieux loties de réelles possibilités de progression avec l'utilisation de cellules ES.

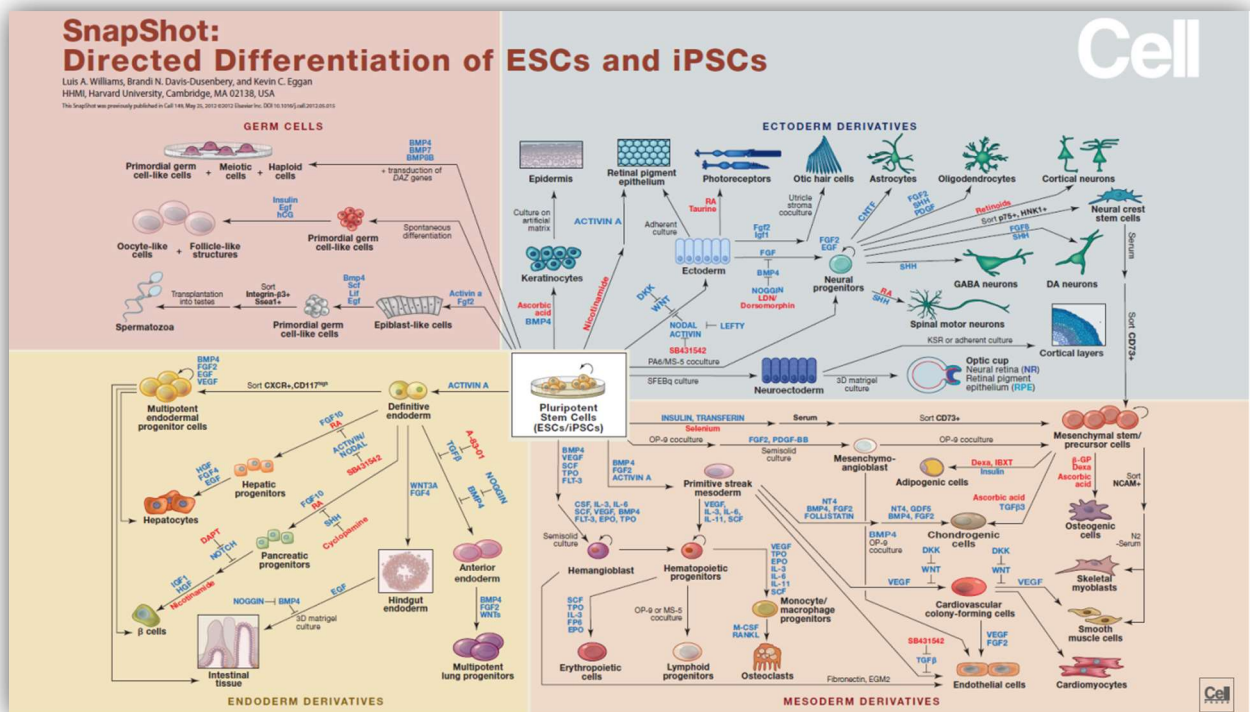


Figure 41 : Voies de différenciation des ESCs et des iPSCs et leurs principaux facteurs selon Stem cell technology

Certaines maladies génétiques ont pu être mieux appréhendées, comme la maladie de Parkinson qui est une maladie neurodégénérative pouvant être d'origine génétique résultant de l'épuisement des neurones dopaminergiques dans le SNC et reste actuellement incurable. Dans une étude de Rakovic et collègues (Rakovic *et al.* 2015), une mutation du gène *PINK1*, codant une protéine kinase mitochondriale, est étudiée. En utilisant des cellules iPS différenciées en

neurones dopaminergiques, ils ont pu répertorier des anomalies mitochondriales et l'homéostasie dopaminergique, dans la stabilité des microtubules et la croissance axonale.

Dans la maladie d'Alzheimer, pathologie neurodégénérative la plus répandue, une des caractéristiques est l'oligomérisation, l'agrégation et l'accumulation du peptide amyloïde- β , formant des plaques amyloïdes dans le cerveau. Kondo et collègues ont généré des cellules iPS de patients atteints de forme sporadique ou familiale de la maladie et les ont différenciées en neurones et en astrocytes. Ils ont par la suite traité ces cellules par de l'acide docosahexaénoïque. Les résultats suggèrent que l'acide docosahexaénoïque pourrait être efficace dans certaines forme de maladie d'Alzheimer (Kondo *et al.* 2013).

Les cellules iPS sont aussi utilisées pour reconstituer des organoïdes pouvant être implantés par la suite. L'équipe de Takebe et collègues développe en 2013 un foie vascularisé et fonctionnel à partir d'iPS humaines. Cet « organe » est transplanté chez une souris défaillante hépatique et une amélioration de son état est constaté (Takebe *et al.* 2013). Plus récemment, Madeline Lancaster modélise un cortex structuré en boîte de Petri ou organoïde afin d'étudier la microencéphalie (Lancaster *et al.* 2013). Ces organoïdes sont en train de prendre de plus en plus d'importance comme l'indique M. Lancaser dans une revue en 2014 (Lancaster and Knoblich 2014), car différents organoïdes (foie, rein, cortex cérébral) ont pu être synthétisés à partir d'iPS. Ces organoïdes intéressent fortement l'industrie pharmaceutique qui y voit un moyen de tester des drogues en minimisant les tests sur les animaux.

En septembre 2014, le ministère japonais de la Santé a donné son accord pour débiter les premiers essais cliniques mondiaux de médecine régénérative sur l'Homme à l'aide des cellules iPS. Pour la 1ère fois une femme de 70 ans atteinte de dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), a subi une intervention chirurgicale d'implantation d'iPS par l'équipe médicale de la Fondation pour la Recherche Biomédicale et l'Innovation de Kobe associée à Masayo Takahashi. Les chirurgiens ont implanté une mince couche de cellules rétinienne de quelques millimètres d'épaisseur dans l'œil de la patiente. Néanmoins, les cliniciens admettent que la patiente a peu de chances de recouvrer totalement la vue. Cependant, l'objectif pour eux sera de constater des améliorations et surtout de vérifier que les cellules implantées ne déclenchent pas d'effet secondaire sur le long terme type rejet ou cancer.

Les cellules iPS présentent également un autre intérêt : elles permettent de réaliser un criblage de drogues directement sur des cellules d'intérêt dérivées de patients, ce criblage pouvant se faire à plusieurs échelles. Dans le cas du syndrome myéloprolifératif chronique qui est causé par une activation constitutive du récepteur du FGF₁, quatre inhibiteurs de tyrosine kinase (CHIR258, PKC 412, ponatinib, et imatinib) ont été testés, sur des cellules

hématopoïétiques induites. L'équipe de Yamamoto a constaté que 3 de ces molécules inhibaient la formation de manière dose dépendante (Yamamoto *et al.* 2015). Ce criblage peut aussi être un criblage à haut débit ou High Throughput Screening comme récemment décrit (Kaufmann *et al.* 2015). Dans ce travail, Kaufmann et collègues utilisent des cellules iPS issues de patients atteints du syndrome de l'X fragile (forme la plus fréquente de retard mental héréditaire), qu'ils différencient en neurones. Par un test d'imagerie très sensible assisté par des algorithmes, 50 000 composés différents sont testés. Quelques composés ont pu être éligibles, permettant de trouver de potentiels candidats thérapeutiques. Néanmoins, pour pouvoir mettre en place ce type d'analyse, il est nécessaire de disposer de cellules différenciées homogènes, en grande quantité et qui présentent un phénotype caractéristique de la maladie. Pour les sous types de neurones par exemple, une grande hétérogénéité est observée dans les boîtes de cultures, des méthodes de tri cellulaire mais aussi de purification seront nécessaires.

5.3.4.3 Différenciation en Motoneurone

Depuis la première génération de cellules iPS humaines, de nombreuses maladies ont été modélisées. Dans ce travail, nous nous intéressons à la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type axonal, et donc aux motoneurones spinaux.

En 2002, Hynek Wichterle a différencié pour la première fois des cellules mES en MN en traitant ces cellules avec du RA et des agonistes de la voie de signalisation du Shh (Wichterle *et al.* 2002). Il a réalisé des cultures flottantes de cellules mES (qui flottaient en amas), qu'il a qualifié d'EB, pendant 2 jours avant d'ajouter RA et l'agoniste du Shh. Cinq jours plus tard, les EB expriment plusieurs facteurs de transcription spécifiques des motoneurones comme NeuN, LHX3, Islet1, et HB9. Par la suite, Hynek Wichterle a voulu savoir si les MN obtenu présentaient un comportement typique de MN en les implantant dans la moelle épinière d'embryons de poulet au moment de la neurogénèse. Il observa que les MN greffés émettaient de nombreux axones hors de la MO par la racine ventrale et qu'ils se prolongeaient jusque vers les muscles périphériques. De plus, ces axones contenaient à leurs extrémités des vésicules synaptiques appropriées pour la neurotransmission, induisant le regroupement post-synaptique (clustering) des récepteurs à l'acétylcholine sur des cellules musculaires de poulet. Cette étude a permis de montrer que les cellules mES pouvaient être différenciées en MN (20 à 40 % des cellules totales) grâce au traitement par deux morphogènes (RA et Shh), et ces MN possédaient les mêmes caractéristiques moléculaires notamment que les MN embryonnaires. De nombreux travaux de différenciation en MN sont basés sur cette étude. La proportion de MN est

augmentée de 20 – 40 % à 60 – 80 % par Miles en 2004 (Miles *et al.* 2004), en détectant l'activité fluorescente des MN exprimant la GFP.

Ce n'est que quelques années plus tard, en 2005 que les hES furent différenciées en MN par les équipes de Li et de Singh Roy (Li *et al.* 2005; Singh Roy *et al.* 2005). Ces trois années peuvent s'expliquer par le fait qu'obtenir des MN à partir de hES est plus fastidieux, nécessite plus de temps et l'ajout d'autres facteurs de croissance. Par exemple, l'apparition de rosettes est plus longue et les progéniteurs obtenus nécessitent l'ajout d'un cocktail de facteurs trophiques, BDNF, IGF-1 et GDNF particulier connu pour potentialiser la différenciation en MN ainsi que leurs survies (Zurn *et al.* 1996). Les MN obtenues avec les hES présentaient les mêmes caractéristiques que ceux obtenus avec les mES (capacité de produire des neuromédiateurs...).

En partant du modèle de cellules iPS développé par Takahashi et Yamanaka en 2006 (Takahashi and Yamanaka 2006), où des cellules somatiques pouvaient être reprogrammées en cellules iPS, des MN peuvent être obtenus. Ce n'est qu'en 2008, en utilisant le même protocole de différenciation que pour les hES, que Dimos a réussi à différencier les cellules iPS de patient atteint de sclérose latérale amyotrophique en MN. Cependant l'expression des facteurs de transcription de ces MN était restreinte (Dimos *et al.* 2008). Un an plus tard, Ebert améliora ce protocole en utilisant des cellules iPS de patient atteint d'amyotrophie spinale (SMA). Cette pathologie est caractérisée par une absence de la protéine SMN (Survival of Motor Neuron). Durant cette étude, l'acide valproïque et la tobramycine ont été utilisés pour augmenter la proportion de protéines SMN avec succès (Ebert *et al.* 2009). Durant cette année, les protocoles pour améliorer la proportion de MN se multiplient. En août 2009 Hu propose un protocole complet de différenciation en MN (Hu and Zhang 2009). Dans cet article, les cellules iPS vont passer successivement par les stades EB, rosettes, progéniteurs neuraux puis MN. Afin d'augmenter la proportion de MN obtenu (supérieure à 80%), ainsi que de réduire le temps de différenciation (19 jours contre 30 à 50 jours), Chambers propose d'utiliser deux inhibiteurs de la voie Smad, le SB431542 et le noggin (Chambers *et al.* 2009). Le SB4315 est un inhibiteur sélectif puissant de la voie du TGF- β , en inhibant les récepteurs ALK4 et ALK5, mais ne bloquant pas les récepteurs du BMP (ALK2, ALK3 et ALK6). Le noggin quand à lui est une protéine diffusible qui se lie à des ligands de la famille du TGF- β , empêchant leurs actions. De plus, il propose d'augmenter la densité d'ensemencement des cellules pour les traiter par le SB et le noggin de manière à avoir une proportion de progéniteurs neuraux plus élevée. En 2010, l'utilisation d'un inhibiteur de la voie des BMP, la dorsomorphine, est utilisé en association

avec le SB431542 dans l'article de Kim (Kim *et al.* 2010). La dorsomorphine est un inhibiteur de l'AMPK et de la voie du BMP ciblant les récepteurs ALK2, ALK3 et ALK6.

Les rosettes sont délicatement découpées et dissociées, puis les cellules (progéniteurs neuraux) sont ensemencées sur une boîte traitée à la poly-L-ornithine, laminine à une forte densité, ce qui permet de maintenir les cultures de progéniteurs neuraux à un stade indifférencié (Koch *et al.* 2009), ou à une faible densité pour obtenir des MN. Ces progéniteurs nécessitent l'ajout d'un cocktail de facteurs trophiques, BDNF, IGF-1 et GDNF particulier connu pour potentialiser la différenciation en MN ainsi que leurs survies (Zurn *et al.* 1996), mais aussi de Y27632 ou « Rock inhibitor » permettant la survie des hES dissociées (Watanabe *et al.* 2007). Les progéniteurs neuronaux expriment nestin, Sox1 et Pax6, et les MN expriment Islet1, Islet2 et HB9.

Depuis les publications se multiplient, faisant des cellules iPS un passage incontournable dans l'établissement de modèles de pathologies neurodégénératives. Saporta et collègues, par exemple, développent des cellules iPS de patients atteints de CMT axonal (Saporta *et al.* 2015). Dans cette étude, ils montrent des anomalies du cytosquelette, du trafic mitochondriale et des anomalies électrophysiologiques (réduction du seuil des potentiels d'action) des MN dérivés de cellules iPS CMT2E (*NEFL* N98S) et CMT2A (*MFN2* R364W). Cette étude a permis d'obtenir un modèle fiable et reproductible d'une CMT2E, permettant d'envisager un criblage haut débit de molécules actives.

De façon synthétique, les différentes molécules utilisées pour obtenir une différenciation en MN optimale sont répertoriées dans la Fig. 42.

Le principal problème de la plupart des différenciations est l'obtention de cultures hétérogènes de cellules spécialisées, rendant difficile l'obtention de résultats fiables et reproductibles lors d'essai thérapeutique par exemple (Maury *et al.* 2012a).

6 Description de quelques techniques

6.1 Sédimentation par couplage flux force

La SdFFF (Sedimentation field flow fractionation) est une technique de Fractionnement par Couplage Flux Force de Sédimentation basée sur les propriétés biophysiques intrinsèques des cellules telles que la rigidité, la déformabilité, la taille et la densité. C'est une méthode préparative, douce et passive en comparaison des méthodes utilisant un pré-marquage fluorescent ou magnétique et qui peut être particulièrement intéressante dans les applications pour lesquelles le marquage peut interférer avec l'utilisation des cellules (culture, transplantation), ou pour lesquelles aucun marqueur n'est disponible, ou dans le cas où celui-ci induit une différenciation cellulaire (cellules souches) (Battu *et al.* 2002).

6.1.1 Principes généraux de la technique de SdFFF : mode d'élution inertiel

Le concept des méthodes de FFF a été inventé à la fin des années 1960 par JC Giddings. Elles représentent une famille de techniques apparentées à la chromatographie liquide où la colonne est remplacée par un canal en forme de ruban de très faible épaisseur (80-250 μm) au regard de sa largeur (1-2 cm) et de sa longueur (50-90 cm) (Giddings 1993) (Fig. 43).

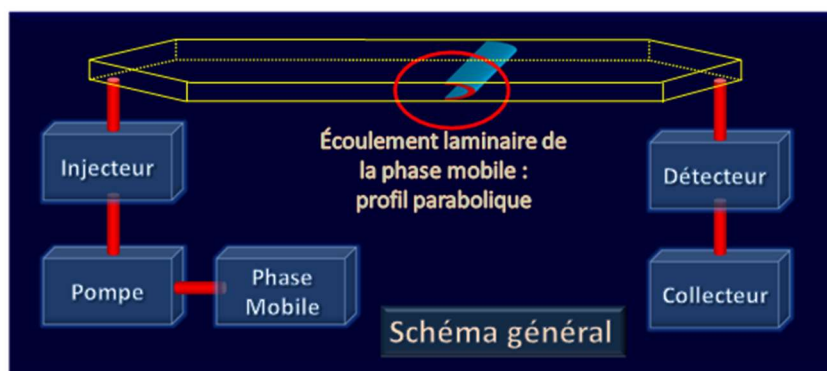


Figure 43 : Schéma général d'un canal de séparation de FFF

La séparation des espèces microniques (cellules, amidon) dépend de leur sensibilité à deux forces antagonistes. Une force associée à l'application d'un champ externe multigravitationnel (mise en rotation du canal) appliqué perpendiculairement à la grande surface du canal, conduisant les particules vers la paroi d'accumulation (vitesses d'élution faibles) et une force d'élévation d'origine hydrodynamique liée au déplacement des particules dans la phase mobile, les conduisant vers le centre du canal (vitesses d'élution élevées). La balance de ces deux forces définit une position d'équilibre pour chaque population de particules séparées. Les particules sont alors focalisées dans de fines couches situées au-dessus de la paroi d'accumulation. Ces monocouches seront éluées à la vitesse de la ligne de flux passant par leur centre de gravité (Fig. 44).

Les forces hydrodynamiques sont décrites par les équations suivantes (Williams *et al.* 1994) :

$$F_L = F_I + F_{asc} \approx C \frac{a^3 \eta S_o}{\delta} \quad \text{avec} \quad F_I = C \frac{a^3 \eta 6 \langle V \rangle}{\delta w} \quad \text{et} \quad F_{asc} = 13.5 \pi \frac{\langle V \rangle^2 a^4 \rho}{w^2} g \left(\frac{x}{w} \right)$$

où F_L : forces hydrodynamiques, F_I : forces inertielles, F_{asc} : forces ascensionnelles, C : coefficient adimensionnel dépendant du flux de phase mobile ($\approx 7.10^{-3}$), a : rayon des particules, η : viscosité, ρ : densité de la phase mobile, S_o : coefficient de Soret, δ : distance entre le centre de gravité de la monocouche et la paroi d'accumulation, $\langle V \rangle$: vitesse moyenne de la phase mobile / w : épaisseur du canal, x : distance entre le centre de gravité de la particule et la paroi.

Il est intéressant de noter que les forces hydrodynamiques dépendent des caractéristiques de l'appareillage, des espèces microniques à séparer mais aussi des caractéristiques du fluide (phase mobile) dans lequel elles se trouvent. Les facteurs influençant ces forces, et sur lesquels il est possible d'agir pour améliorer la séparation sont essentiellement la vitesse de la phase mobile (débit) et l'épaisseur du canal. Concernant les particules, les deux principaux paramètres régissant la séparation et l'ordre d'élution sont la densité et la taille. A densité égale, les particules les plus grandes génèrent le plus de forces hydrodynamiques ; ainsi situées plus haut dans le canal, elles seront éluées avant les particules de plus faible diamètre (Fig. 44).

En SdFFF, la force de gravité s'exerçant sur une particule est de la forme :

$$F = m \left(1 - \frac{\rho_{mob}}{\rho_{part}} \right) \omega^2 r$$

où, m : masse de la particule, ρ : densité de phase mobile et de la particule, ω : fréquence de rotation angulaire, r : rayon du rotor.

La force de gravité dépend essentiellement des caractéristiques des particules et de l'appareillage. A taille égale, les particules les plus denses sont plus sensibles au champ de gravité et sont éluées en dernier. Dans une population de forte polydispersité en taille et densité comme les cellules, les particules les plus grandes et les moins denses seront éluées en premier, alors que les plus petites et les plus denses le seront en dernier. L'intérêt du mode d'éluion inertiel est évident pour l'éluion des cellules dont on connaît la fragilité et la capacité d'interaction ou d'adhésion aux surfaces. Ces interactions conduisent à des effets néfastes en termes d'intégrité fonctionnelle. Dans une stratégie de séparation cellulaire ou de particules microniques, du fait de l'importante sélectivité de ce mode en fonction de la taille (a^3) et du faible risque d'interaction particules / paroi qu'il offre, le mode inertiel est un modèle de choix, dont on doit assurer la mise en œuvre (Battu *et al.* 2002).

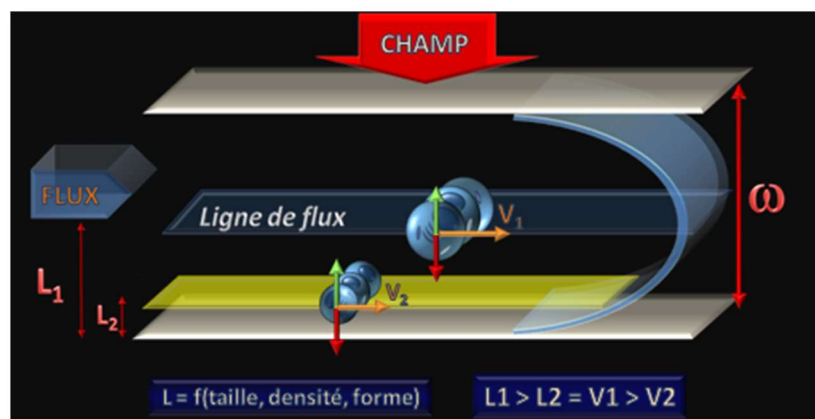


Figure 44 : Principe général de séparation cellulaire par SdFFF en mode inertiel

Le profil d'éluion (fractogramme) de SdFFF est un signal de type absorbance = f (temps) (Fig. 45). Dans le cadre de la séparation d'espèces biologiques, afin de déterminer quelle fraction correspond à la sous-population d'intérêt, selon un critère biologique donné, il est nécessaire de réaliser un couplage avec les techniques de caractérisation biologique : cytométrie en flux, immunofluorescence, biologie moléculaire... Ceci permet un calibrage multidimensionnel des fractogrammes obtenus en fonction de la taille, de la densité et des propriétés biologiques : état de différenciation (cellules souches), expression de marqueurs biologiques, sensibilité à l'apoptose, etc., ceci pouvant être défini sous le vocable général de "cellulomique" (Battu *et al.* 2002).

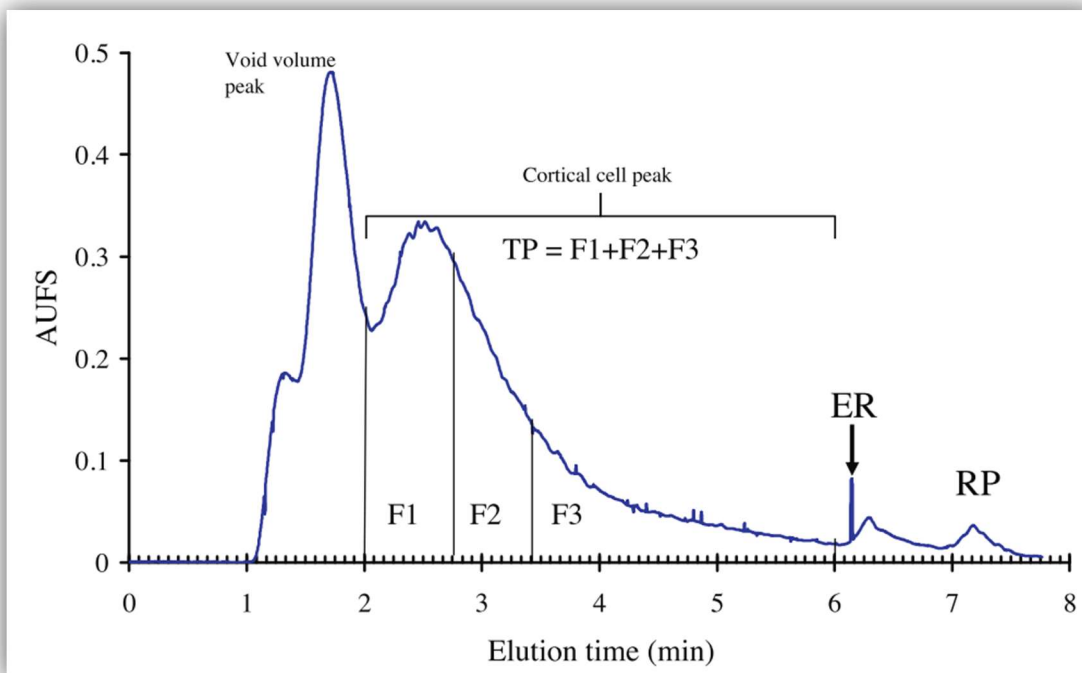


Figure 45 : Profil d'élution (fractogramme) d'astrocytes à partir de cerveaux de rats nouveaux nés

D'après (Sarrazy *et al.* 2013)

6.1.2 Mise au point du matériel

La SdFFF est reconnue comme l'une des méthodes de FFF des plus efficaces et polyvalentes (Giddings 1993). Cependant, sa diffusion a été jusqu'à présent limitée par le manque récurrent de matériels fiables disponibles à la commercialisation. Le développement de prototypes de phase-1 à -3 (Fig. 46) a porté sur l'ensemble des pièces maîtresses de l'appareillage : statif, bol de centrifugation, contrôle et pilotage du moteur, joints tournants, afin de les fiabiliser, et de permettre leur adaptation au tri cellulaire aseptique. Une étape fondamentale de ce travail a été la mise en place du système de contre-canal (Cardot *et al.* 2006). Ainsi, l'équipe EA 3842 Homéostasie Cellulaire et Pathologies de l'Université de Limoges est à même de proposer un outil analytique fiable et performant, mais aussi de proposer des applications associées, démontrant la polyvalence de la technique et d'en assurer la diffusion. Le développement instrumental de prototypes s'est accompagné d'une adaptation méthodologique pour l'analyse biologique dont l'efficacité est démontrée par le respect des exigences minimales en terme de séparation cellulaire telles que le maintien 1/ de l'intégrité fonctionnelle; 2/ d'un haut pourcentage de viabilité à court et long terme (culture et transplantation); 3/ de l'état de maturation et de différenciation (Battu *et al.* 1998)

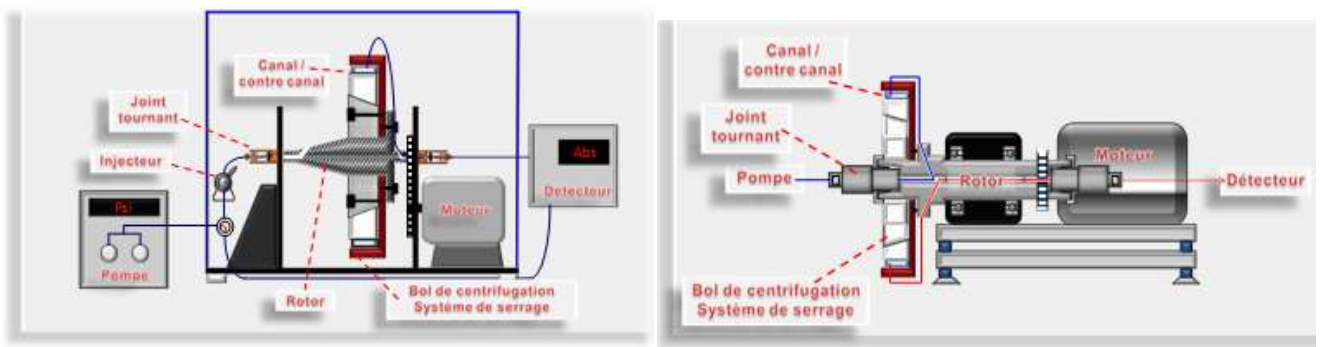


Figure 46 : Prototype de phase 1 (gauche) et de phase 2 (droite)

6.1.3 Tri cellulaire par SdFFF

La SdFFF est devenue depuis quelques années un outil performant pour le suivi de processus biologiques tels que l'apoptose ou la différenciation cellulaire (Cailleteau et al., 2008), ainsi que pour l'isolement de sous-populations d'intérêt d'origine cancéreuse (Bégaud-Grimaud *et al.* 2007).

De nombreux travaux ont montré qu'il était possible d'isoler des cellules souches cancéreuses (Sarrazy *et al.* 2013; Mélin *et al.* 2014). Cette technique a permis d'aller isoler dans la tumeur cancéreuse, les cellules présentant une résistance au traitement et donc de pouvoir tester de nouvelles drogues sur les différentes sous populations.

L'épithélium olfactif d'embryon de poulet, riche en cellules souches neurales, constitue un excellent modèle de la capacité de la SdFFF à isoler ces populations. Un tri réalisé sous faible champ gravitationnel permet la purification d'une fraction cellulaire stérile, viable et fonctionnelle ayant les caractéristiques de cellules souches décrites précédemment, ainsi que l'obtention des différents types cellulaires de cet épithélium : progéniteurs, cellules de soutien et neurones olfactifs (Comte *et al.* 2006).

L'ensemble de ces travaux nous montre que la SdFFF est un précieux outil de tri, d'enrichissement et de purification cellulaire. Néanmoins, des expérimentations biologiques doivent être associées à cette technique de manière à confirmer les résultats obtenus en SdFFF.

6.2 Observation des cellules

Pour comprendre les interactions cellule / cellule ou la dynamique mitochondriale, il est nécessaire de pouvoir observer ces cellules. Le principe de la microscopie est de former une

image de l'objet grâce à des photons ou à des électrons. On distingue généralement deux types de microscopie, la microscopie optique ou photonique et la microscopie électronique.

6.2.1 La microscopie optique

Le premier microscope optique fut fabriquer par Kepler en 1611 mais ce n'est qu'en 1968 que Petran et ses collaborateurs fabriquent le premier microscope confocal. Des perfectionnements tels que la coloration des cellules, le phénomène de diffraction, l'élaboration de lentille, la vidéo et la fluorescence, ont permis à la microscopie optique de devenir incontournable pour la biologie cellulaire.

Les bactéries et les mitochondries, dont la largeur est d'environ $0,5 \mu\text{m}$, représentent généralement le plus petit objet dont la forme peut être clairement discernée en microscopie optique. On distingue la microscopie à transmission et la microscopie à fluorescence.

6.2.1.1 La microscopie à transmission

Lorsque l'onde lumineuse rencontre un obstacle qui ne lui est pas transparent, elle est diffractée. C'est le cas lorsqu'elle rencontre les lentilles convergentes, les bords des diaphragmes ou les composants cellulaires (Fig. 47). La nature ondulatoire de la lumière ainsi que la diffraction expliquent que l'image d'un point concentrique n'est pas un point, mais une tache composée d'un ensemble de cercles concentriques : c'est la tache de Airy (Fig. 48). Une image dite en contraste de phase sera obtenue. En routine, cette technique qui permet d'observer des cellules vivantes en culture sera employée pour contrôler le bon déroulement des expérimentations.

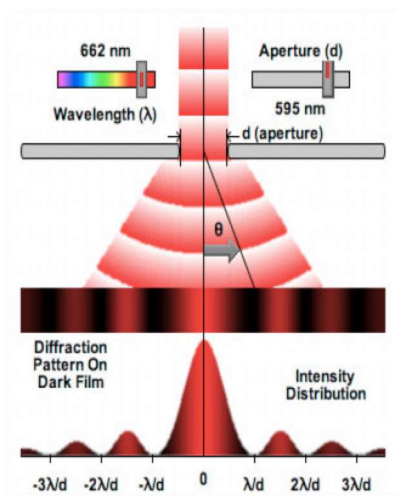


Figure 47 : Diffraction d'un rayon lumineux

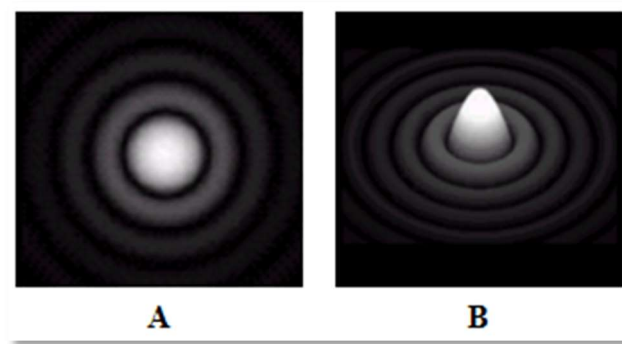


Figure 48 : Tache de Airy

(<http://www.glafreniere.com/optique/airy.htm>)

(A) image en 2 dimensions (X, Y) ; (B) image en 3 dimensions (X, Y, Z)

6.2.1.2 La microscopie à fluorescence

Le microscope confocal à balayage laser, utilisé dans cette étude, est un microscope à fluorescence où l'échantillon observé est éclairé point par point par un faisceau laser balayant le plan (X, Y). Lors du passage du faisceau en un point, les molécules fluorescentes présentes à cette position dans toute l'épaisseur Z de l'échantillon sont excitées. La fluorescence émise est ensuite filtrée par un diaphragme (pinhole) situé au point de focalisation de la lumière avant le détecteur (photomultiplicateur). Par ce biais, on détecte uniquement la fluorescence provenant du plan de focalisation (X, Y). Les déplacements dans l'épaisseur de l'échantillon sont effectués à l'aide d'une platine motorisée. Ceci permet d'avoir des déplacements reproductibles, et par conséquent de faire des coupes optiques adjacentes. Les images faites en microscopie confocale étant numérisées, le traitement des coupes optiques adjacentes permet de visualiser et d'extraire des informations 2D et 3D. Les images ne sont composées que de la fluorescence émise au plan focal. Les images apparaissent donc nettes sans traitement. Cela fait de cette technique une méthode très sensible. Cependant, bien sûr, des inconvénients existent notamment de nombreux paramètres à régler pour optimiser la qualité des images obtenues, la possibilité de photodestruction et de photobleaching, et le choix des fluorochromes est limité par les caractéristiques des lasers présents.

6.2.2 La microscopie électronique

On distingue généralement deux types de microscopie électronique, la microscopie électronique à balayage et la microscopie électronique à transmission (MET), seule technique développée dans ce travail.

La MET est une technique permettant d'observer des organites intracellulaires sur les échantillons coupés ou de localiser des molécules avec des marqueurs. Elle est utilisée également pour visualiser des structures moléculaires (protéines ou acides nucléiques) et des microorganismes entiers par les techniques de coloration positive. Un microscope électronique à transmission utilise un faisceau d'électrons pour illuminer l'échantillon. Les électrons sont déviés par les molécules gazeuses qu'ils rencontrent, et il est donc nécessaire de réaliser un vide élevé dans la colonne du microscope.

Les cellules ont été fixées, surfixées au tétroxyde d'osmium à 1% (qui rend les structures denses aux électrons), déshydratées puis incluses dans de la résine. Après polymérisation de la résine, des coupes ultrafines sont réalisées à l'aide d'un couteau de diamant et disposées sur des grilles Cuivre-Rhodium (200 mesh). Les coupes sont colorées avec des solutions d'acétate d'uranyl 0,5% et de citrate de plomb qui se fixent sur différentes structures et les contrastent. Elles permettent de visualiser les nucléoprotéines pour la première et les membranes pour la deuxième. Lorsque les électrons traversent l'échantillon, ils sont détectés par un ordinateur et l'image est formée. Les électrons incidents provenant de la source sont soit totalement arrêtés, soit déviés et ralentis, soit transmis. Le diaphragme objectif élimine les électrons déviés. Les électrons arrêtés se traduisent à l'observation par des zones sombres alors que les électrons transmis correspondent à des zones claires.

Les échantillons ainsi préparés sont observés par le Docteur Laurence Richard, dans le service d'Anatomie Pathologique, au CHU de Limoges (JEOL JEM 101, JEOL).

6.3 Electrophysiologie et patch clamp

Un neurone est une cellule spécialisée dans la transmission de l'influx nerveux, et cette propagation se fait de manière saltatoire due à la gaine de myéline, de nœud de Ranvier en nœud de Ranvier. Dans notre modèle, les MN ne sont pas myélinisés donc la propagation se fait de proche en proche grâce aux différents canaux ioniques. Cette membrane est relativement imperméable aux espèces électriques chargées, et elle possède des protéines de transport actif comme les pompes Na^+ / K^+ , ainsi que différents canaux ioniques. Généralement cette notion

de résistance membranaire R_m est exprimée en $M\Omega$ et se traduit par l'opposition de la membrane au passage des ions. Lorsque le neurone est au repos, les ions Na^+ et K^+ sont distribués de part et d'autre de la membrane, les ions Na^+ étant majoritairement extracellulaires et les ions K^+ principalement intracellulaires ; ces gradients de concentrations sont maintenus par des pompes Na^+ / K^+ (Tableau 7). La membrane est dite polarisée, car l'intérieur est chargé négativement par rapport à l'extérieur créant ainsi le potentiel de repos.

Tableau 7 : Concentration ionique [Ion], des milieux intracellulaires et extracellulaires d'une cellule musculaire squelettique de mammifère

Ion	[Ion] _{ext} (mM)	[Ion] _{int} (mM)
Na^+	140	14
K^+	3	160
Ca^{2+}	1	10^{-4}
Cl^-	150	14

Il est important de définir quelques notions élémentaires sur le modèle électrique des membranes avant d'aller plus loin.

Le courant ionique tout d'abord, correspond au flux des ions de part et d'autre de la membrane. Généralement, le courant ionique est exprimé en nA ou pA. Par définition, les cations entrant dans la cellule constituent le courant négatif, et les cations sortant le courant positif, et inversement pour les anions.

La membrane forme donc une sorte de dipôle électrique permettant d'appliquer la Loi de Nernst. Cette loi permet d'attribuer un potentiel électrique (V) représentant le bilan des charges positives et négatives, à chaque compartiment et dont la différence est le potentiel transmembranaire E_m exprimée en mV.

Le potentiel de repos est variable selon les types cellulaires, par exemple il est de -95 mV dans les cellules musculaires squelettiques, entre -80 et -90 mV dans les astrocytes et dans nos cellules d'intérêt, les neurones, d'environ -70 mV (Fig. 49).

Lorsque la membrane est stimulée, les canaux Na^+ s'ouvrent, les ions Na^+ entrent massivement dans le neurone et si le seuil est atteint, tous les autres canaux Na^+ s'ouvrent. Cette phase correspond à la dépolarisation. Cette dépolarisation atteint un maximum vers +30 mV (2). Lors de la fermeture des canaux Na^+ , les canaux K^+ s'ouvrent et permettent de rééquilibrer le potentiel électrique jusqu'au potentiel de repos (3) et (4). La phase (4) est appelée phase de repolarisation. Toutefois les canaux K^+ restent ouvert et la phase (5) d'hyperpolarisation est observée (-90 mV) : un « excès » d'ions K^+ sortant de la cellule, le potentiel électrique va

descendre plus bas que le potentiel de repos. Le retour à l'équilibre est permis grâce aux pompes Na^+ / K^+ (6). Le potentiel d'action est donc un évènement de courte durée au cours duquel le potentiel électrique de la cellule augmente puis chute rapidement, passant d'état de repos à une dépolarisation, suivie d'une repolarisation puis d'une hyperpolarisation avant de revenir à l'état initial de repos.

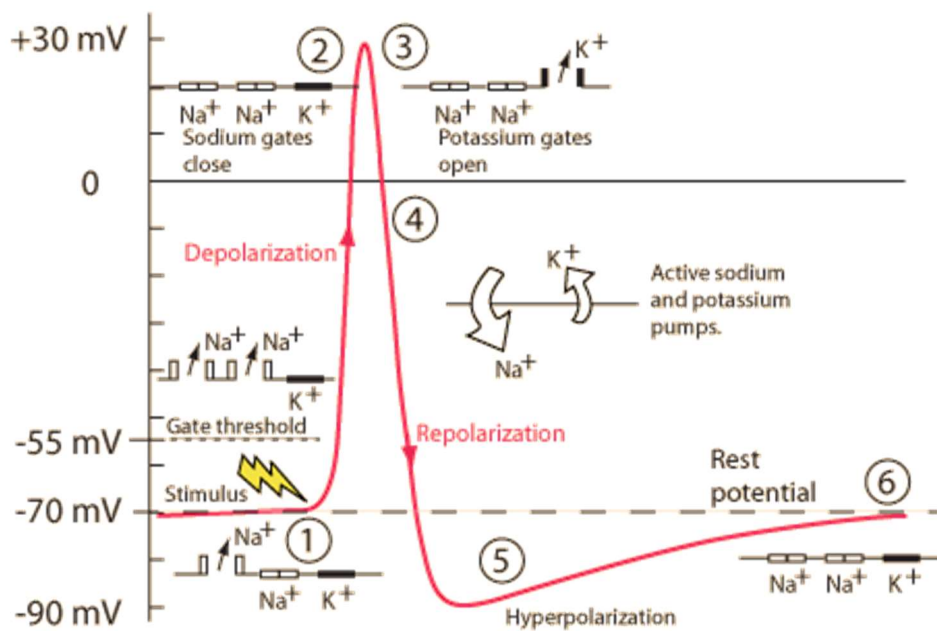


Figure 49 : Potentiel d'action comprenant les phases de dépolarisation, repolarisation et hyperpolarisation

Le patch clamp, est une technique permettant d'imposer un potentiel à une membrane biologique grâce à des microélectrodes de verre (Fig. 50). Pour la mise au point de cette technique, Edwin Neher et Bertil Sakmann ont obtenu le prix Nobel en 1981. Le principe, plutôt simple, est d'accoler une pipette de verre aux membranes biologiques formant une zone que l'on appelle « gigaseal », c'est-à-dire de très forte résistance, isolant électriquement cette portion de membrane. En pratique, cela reste très compliqué, et l'obtention d'une zone « gigaseal » nécessite une certaine expertise. Elle est obtenue grâce à une platine motorisée mais aussi par de légères inspirations de l'expérimentateur.

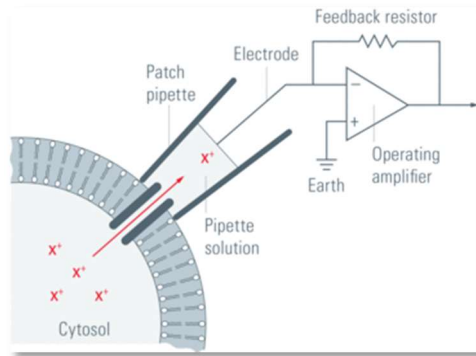


Figure 50 : Principe général du patch-clamp

Une pipette de verre contenant la solution d'électrolyte est fermement scellée sur la membrane cellulaire et ainsi isole une « pièce » (un patch) de membrane. Le courant ionique (flèche rouge) passe par le canal, se retrouve à l'intérieur de la pipette où il peut être enregistré par l'électrode. Cette électrode est connectée à un amplificateur très sensible.

Il existe 4 configurations possibles de patch clamp et chacune comporte des avantages et ces inconvénients. Elles sont répertoriées dans le tableau ci-dessous (Tableau 8), et la Fig. 51 schématise ces configurations.

Tableau 8 : Patch clamp, avantages et inconvénients des différentes configurations

Configuration	Définition	Avantages	Inconvénients
Cellule attachée « cell-attached »	- La pipette est collée à la membrane (reste entière) - Reste au plus proche des conditions physiologiques	- Milieu interne de la cellule conservé - Mesure de courant unitaire (d'un seul canal)	- Potentiel transmembranaire inconnu - Milieu interne non contrôlé
Cellule entière « whole-cell »	- Rupture de la membrane - L'activité macroscopique de l'ensemble des courants cellulaires est mesurée.	- Milieu externe parfaitement contrôlé - Milieu interne relativement bien contrôlé - Mesure d'un courant global (tous les canaux)	- Perte facteurs de régulation du canal
Membrane détachée « inside-out »	- Membrane plasmique arrachée à la cellule. - Face interne dans milieu extracellulaire.	- Milieu interne et externe parfaitement contrôlé - Mesure de courant unitaire (d'un seul canal)	- Perte facteurs de régulation du canal
Membrane inversée « outside-out »	- dérive de la technique de la cellule entière : en éloignant la pipette la membrane se reforme	- Milieu interne et externe parfaitement contrôlé - Mesure de courant unitaire (d'un seul canal)	- Perte facteurs de régulation du canal

D'après *Electrophysiologie : Principes et techniques*, Fabrice DUPRAT (Duprat)

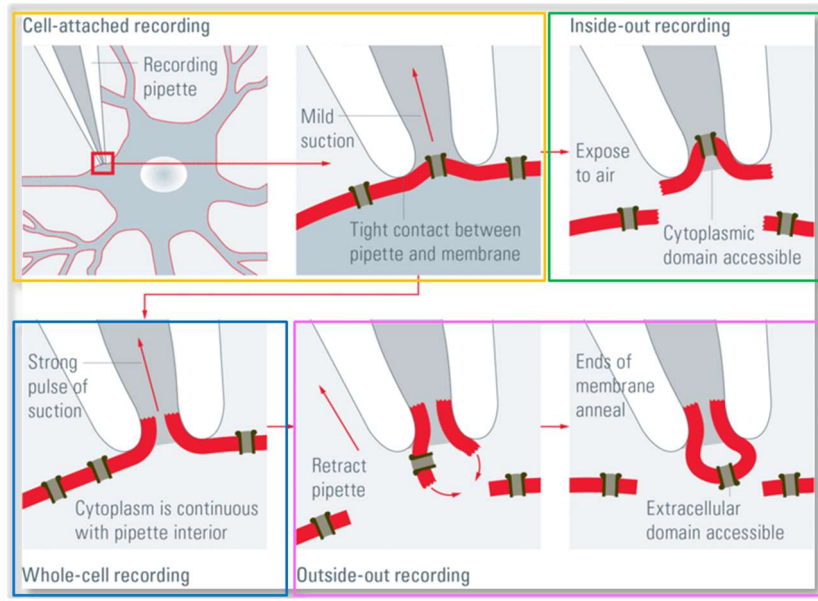


Figure 51 : Schématisation des différentes configurations de patch clamp

<http://www.leica-microsystems.com/science-lab/the-patch-clamp-technique/>

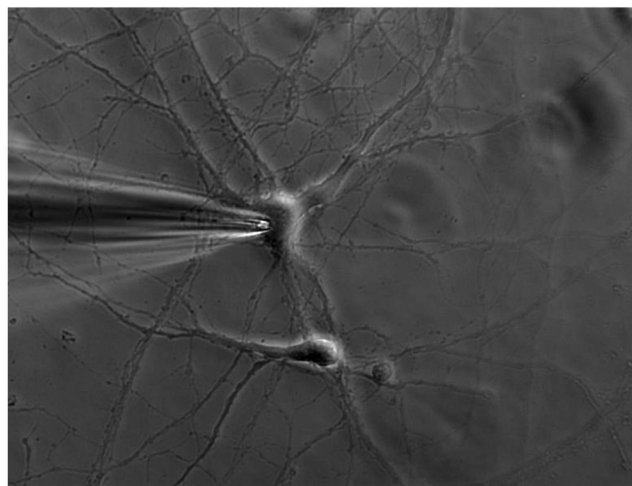


Figure 52 : Photographie en microscopie optique de patch clamp de neurone

<http://www.leica-microsystems.com/science-lab/the-patch-clamp-technique/>

Le patch clamp permet donc d'enregistrer l'activité électrique de cellules uniques, et dans notre cas il sera utilisé pour étudier les cellules de phénotype neuronal dérivées des cellules iPS.

Dans ce travail nous utiliserons uniquement la technique de la cellule entière ou « **whole-cell** ». Les différents protocoles ne seront pas décrits dans ce mémoire.

Partie II – Objectifs

L'objectif principal de cette thèse était de pouvoir permettre une meilleure étude des phénomènes physiopathologiques de certains patients CMT par des modèles cellulaires qui soient aussi proches que possible de la réalité médicale. Les cellules iPS nous ont paru une bonne voie pour répondre à cet objectif. Nos efforts ont porté sur le gène *GDAPI* dont certaines mutations sont responsables de la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 4A ou 2K. L'objectif principal s'est alors décliné en plusieurs objectifs secondaires : (i) tout d'abord obtenir des cellules de patients et de personnes saines, (ii) les reprogrammer en cellules iPSc, (iii) puis les différencier en cellules neuronales (si possible en motoneurones) et, enfin, (iv) caractériser les anomalies morphométaboliques de ces cellules afin de préciser les mécanismes physiopathologiques induits par l'altération du gène *GDAPI*. L'objectif, secondaire, mais primordial, de pouvoir envisager des pistes thérapeutiques, bien que toujours visé, n'a pas pu être traité dans le temps imparti.

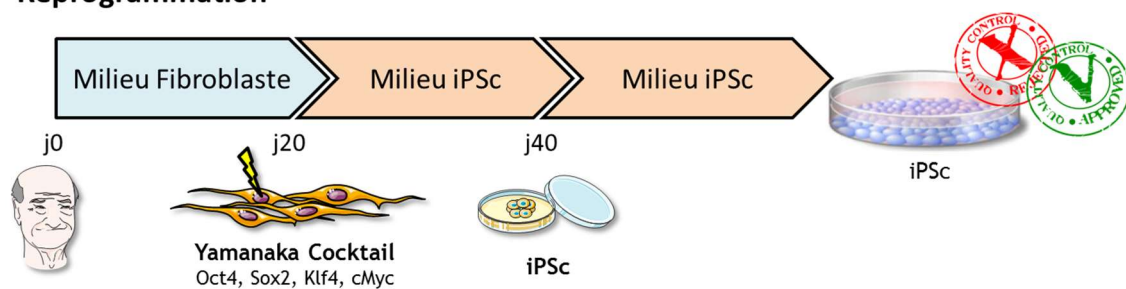
Pour répondre à la problématique exposée ci-dessus, des fibroblastes dermiques d'un témoin sain et d'un patient porteur d'une mutation récessive non-sens (p.Q163X) de *GDAPI* à l'état homozygote ont été prélevés et mis en culture grâce à l'aide des personnes du Centre National de Référence des neuropathies périphériques rares, CHU Limoges, Pr L. Magy et Pr JM Vallat). Ces fibroblastes dermiques ont pu être reprogrammés en cellules iPSc, puis différenciés en cellules ayant des caractéristiques immunohistochimiques de motoneurones spinaux. Ces résultats sont présentés ci-après dans **l'Article 1**.

Mais au cours des expériences précédentes, de nouveaux objectifs secondaires se sont présentés à nous. En effet, nous nous sommes rendus compte que le principal problème de la technique d'obtention des cellules iPS était l'hétérogénéité des cellules de la culture obtenue après différenciation. Il nous a donc paru nécessaire d'utiliser une méthode de tri ou d'enrichissement afin d'étudier la population d'intérêt. Pour ce faire, une méthode tri et d'enrichissement, disponible à Limoges et appelée SdFFF (Sedimentation Field Flow Fractionation) a été utilisée. Cette méthode peut être utilisée de manière précoce dans la différenciation, c'est-à-dire lors de la différenciation spontanée des EB suivant les trois feuillets embryonnaires. Ainsi nous espérons pouvoir trier ces feuillets en isolant le feuillet ectodermique. Ceci présente deux avantages significatifs qui sont : l'économie de temps et l'économie financière d'argent (**Article 2**). Puis dans un deuxième temps, la SdFFF a été utilisée, non plus pour trier différentes populations, mais pour enrichir une fraction de cellules en motoneurones et ainsi pouvoir travailler sur une population cellulaire la plus pure possible (résultats préliminaires).

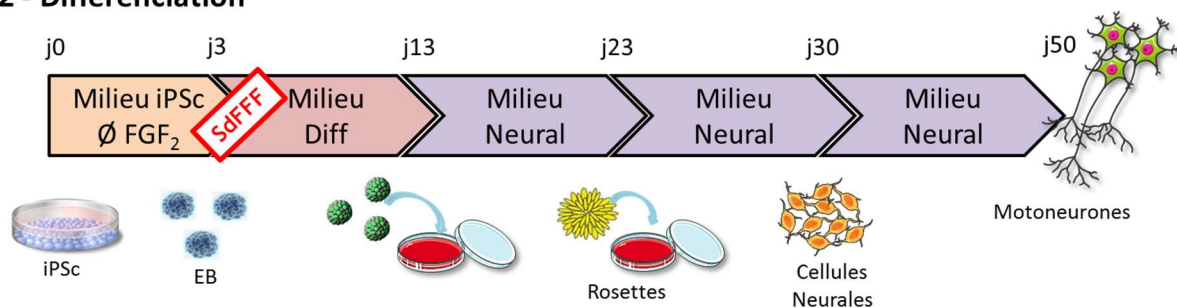
Durant la différenciation, et plus précisément lors de l'étape d'obtention des rosettes, étape intermédiaire à l'obtention de MN, les premières différences entre les cellules contrôles et les cellules de patient ont pu être observées. Cet objectif, énoncé plus haut, de caractérisation des anomalies morphométaboliques est donc présenté dans l'**Article 3**. Il a été précisé dans l'**Article 4** où des différences de comportements des mitochondries et, plus généralement, du réseau mitochondrial ont pu être observées.

Afin de permettre une meilleure vue d'ensemble du travail effectué, les différents objectifs et étapes, et leur déclinaison temporelle, sont résumés dans le schéma suivant.

1 - Reprogrammation



2 - Différenciation



Article 1 : Protocole d'obtention de Motoneurones

Article 2 : Tri de progéniteurs par SdFFF

Article 3 : Gouttelettes Lipidiques

Article 4 : Motoneurones Contrôles et GDAP1

Figure 53 : Chronologies générales de ce travail et articles en relation

Chronologie de l'obtention de fibroblastes dermiques de patient et de contrôle jusqu'à l'obtention de MN en passant par les iPSc.

Partie III – Partie expérimentale

Dans cette Partie Expérimentale, nous allons tenter de présenter aussi clairement que possible la démarche que nous avons suivie lors de ce travail de Thèse ainsi que les résultats que nous avons obtenus durant ces trois ans. Pour cela, nous avons choisi d'intercaler des paragraphes introductifs et conclusifs avec les articles que nous avons soumis à publication. Cette partie contient ainsi 4 chapitres : (i) Obtention de cellules dermiques humaines, reprogrammation en cellules iPSc et différenciation en motoneurones, (ii) Amélioration de la pureté cellulaire par SdFFF, (iii) Différences morphométriques des cellules de patients vs. cellules de témoin: apparition de gouttelettes lipidiques et (iv) Différences morphométriques des cellules de patients vs. cellules de témoin: altération des mitochondries et du réseau mitochondrial.

1 Obtention de cellules dermiques humaines, reprogrammation en cellules iPSc et différenciation en motoneurones

1.1 Présentation d'ensemble

Comme nous l'avons indiqué dans le Chapitre « Objectifs », notre but initial était d'obtenir des cellules iPSc de patients CMT et de personnes normales qui devaient être ensuite différenciées en motoneurones. C'est ce que nous avons pu réaliser grâce à la collaboration très active des personnes du « Centre national de référence des neuropathies périphériques rares » (Service de Neurologie du CHU de Limoges, France) que nous tenons à remercier (Pr JM Vallat, Pr L. Magy, Pr B. Funalot, Dr AM Milor, Dr L. Richard). Nous avons ainsi pu obtenir des prélèvements de peau qui nous ont permis de réaliser des cultures primaires de fibroblastes dermiques (dans l'UF8855 du Service de Cytogénétique au CHU de Limoges, Pr C. Yardin).

Dans un second temps, nous avons réalisé l'étape de reprogrammation de ces FDs en iPSc au sein du laboratoire I-Stem, INSERM/UEVE UMR 861, AFM-Téléthon, Genopole (directeur : Marc Peschanski), lors d'un séjour de 3 mois à Evry, sous la direction du Docteur Lina El Kassar. Cette reprogrammation a été effectuée avec des plasmides non intégratifs portant les gènes Oct4, Sox2, Klf4 et l-Myc et communément appelés « cocktail de Yamanaka ». Après une phase de culture (20 passages), les contrôles de qualité ont aussi été effectués sur les cellules iPSc à Evry.

Enfin, nous avons réalisé les étapes ultérieures de différenciation en motoneurones et de caractérisation immunohistochimique au sein de l'EA6309 à l'Université de Limoges. Cette étape est l'objet de l'Article 1.

1.2 Obtention de fibroblastes dermiques et reprogrammation en iPSc

Les fibroblastes dermiques (FD) d'un témoin et d'un patient porteur d'une mutation hétérozygote GDAP1 ont été obtenus après une biopsie de peau située 10 cm en dessus de la malléole externe après une anesthésie locale par xylcoïne.

Ces FDs ont été par la suite reprogrammés en cellules hiPSc par nucléofection de plasmides non intégratifs (Oct4, Sox2, Klf4 et l-Myc). Une fois le passage 20 obtenu et tous les contrôles réalisés, les iPSc ont été différenciées en progéniteurs neuraux, puis en neurones et

enfin en motoneurones. Au vue des différents protocoles proposés et en accord avec le développement physiologique embryonnaire des motoneurones (cf. Partie I – Etude bibliographique), l’optimisation de la leur différenciation semblait importante pour augmenter leur quantité en diminuant le temps de différenciation et donc en réduisant les coûts de production. Les progéniteurs neuraux obtenus au 23^{ème} jour de différenciation, mûrent pour obtenir les premiers motoneurones dès le 33^{ème} jour. La proportion de motoneurones augmente les jours suivants pour être d’environ 60% au 50^{ème} jour. La mutation GDAP1 est conservée lors des processus de reprogrammation et de différenciation (Annexe VII).

1.2.1 Méthodes utilisées pour obtenir les FDs

Des explants de 1 mm³ ont été cultivés immédiatement après prélèvement en milieu de Chang D (Irvine Scientific, Santa Ana, USA) pendant 3 jours, puis la proportion de CHANG milieu D (Irvine Scientific) a été réduite et mélangé avec du RPMI-1640 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) à 1: 1 pour les deux jours suivants et à 1: 4 pour les autres jours. Tous les milieux ont été complétés avec 10% de sérum de veau foetal (SVF) (Life Technologies), 100 U / ml de pénicilline, 100 µg / ml de streptomycine (Life Technologies). Les flacons de culture ont été maintenus à 37°C dans une atmosphère saturée en CO₂ et 5% d’humidité. Après 2 semaines, les explants ont été retirés des flacons de culture. Le tapis de fibroblastes dermiques obtenus a été décollé du flacon de culture par traitement avec 0,05% de trypsine-EDTA (Life Technologies). La suspension cellulaire a été collectée et centrifugée pendant 10 minutes à 1500 tour par minute (500 g). Le surnageant a été éliminé et le culot de cellules a étéensemencé en flacon de culture avec du milieu complet. Les fibroblastes dermiques étaient prêts à être reprogrammés en cellules iPSc.

Avant la reprogrammation en iPSc, les fibroblastes dermiques ont été testés pour leurs négativité aux virus HVB, HVC et VIH (Service de Bactério-virologie du CHU de Limoges, France), ainsi que pour l’absence de contamination mycoplasmique (MycoAlert™, Lonza, Walkersville, MD, USA).

1.2.2 Méthode utilisée pour reprogrammer les FDs en iPSc

Conformément à la procédure d’iSTEM (INSERM / UEVE UMR 861, AFM-Téléthon, Genopole, Evry, France), 3 plasmides non intégratifs (plasmide # 6 pCXLE-hOCT3 / 4-F shp53 Addgene, plasmide # 7 pCXLE-hSK Addgene, plasmide # 8 pCXLE- Hul Addgene) à 1 pg /

ml ont été transfectés avec le Nucleofector II (Amaxa, Lonza) dans des fibroblastes dermiques (1.10^6) des 2 personnes. Directement après la nucléofection, 100 000 cellules ont été ensemencées dans chaque puits d'une plaque à six puits préalablement ensemencé avec des cellules nourricières BJ-1 mitomycinées C (construction génétique propre à ISTEM). Le milieu de culture est du DMEM GlutaMAX (Life Technologies), complété avec 10% de sérum de bovin fœtal (Life Technologies), 1X de MEM acides aminés non essentiels 100X (Life Technologies). Les plaques de culture ont été maintenues à 37°C dans une atmosphère saturée en CO₂ et 5% d'humidité. Au jour 1, le milieu a été changé supplémenté avec 10 UI / ml de gentamicine (Life Technologies) (Fig. 54). Au jour 4, le milieu iPSc a été ajouté : KO-DMEM (Life Technologies), supplémenté avec 20% KnockOut Serum Replacement (KSR) (Life Technologies), 1X MEM non-acides aminés essentiels 100X (Life Technologies), 2 mM Glutamax (Vie Technologies), 50 uM β-mercaptoéthanol (Life Technologies), 10 UI / ml gentamicine (Life Technologies). Le milieu a été supplémenté avec 10 ng / ml FGF₂ (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA), 2 μM SB431542 (Tocris Bioscience, Minneapolis, MN, USA), 0,5 μM PD0325901 (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Allemagne) et 500 μM valproate (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) pendant 10 jours. Du milieu frais a été apporté tous les deux jours. Les colonies iPSc ont été sélectionnées et ensemencées environ 2 à 5 semaines après nucléofection. Un minimum de 20 passages doit être atteint avant d'effectuer les contrôles nécessaires à l'établissement de cellules iPSc.

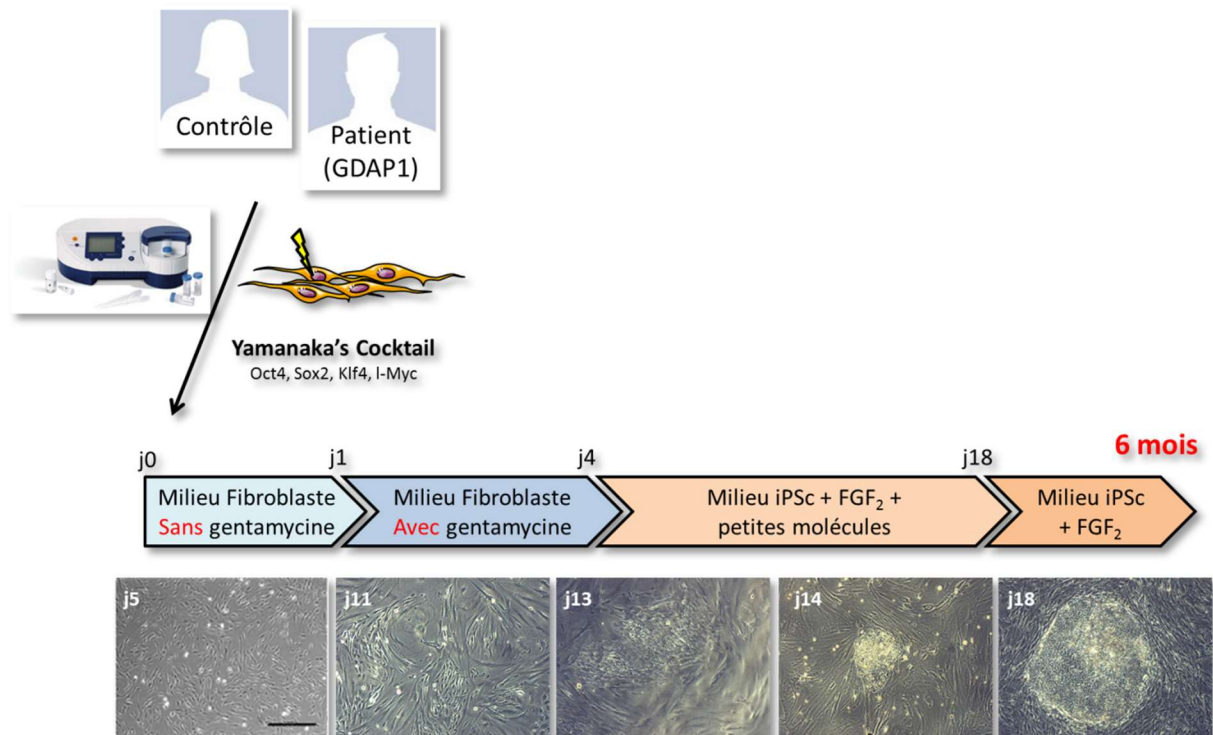


Figure 54 : Chronologie de la reprogrammation des fibroblastes dermiques en cellules iPSc

Les fibroblastes dermiques (FDs) ont été obtenus à partir de biopsies de la peau d'un contrôle sain et un patient porteur d'une mutation homozygote GDAP1. Par la suite, les FDs ont été reprogrammés en utilisant le cocktail de Yamanaka (des plasmides non intégratifs : Oct4, Sox2, Klf4 et l-Myc). A j5 aucune variation morphologique n'est observée. A j11, les FDs commencent à changer de morphologie. A j13, certaines cellules deviennent de plus en plus petites, et se regroupent. Ces cluster deviennent de plus en plus imposant (j14), jusqu'à l'apparition d'une colonie de morphologie caractéristique (bord franc, composée de cellules petites, rondes et homogènes).

Par la suite, les cellules iPSc ont été entretenues, amplifiées et stockées. Des contrôles (morphologie, différenciation, pluripotentialité...) ont été réalisés une fois le 20^{ème} passage atteint et la différenciation en motoneurones a été initialisée.

1.3 Différenciation des iPSc en motoneurones : Article 1

Les cellules iPSc ayant été obtenues pour les 2 personnes prélevées, nous avons cherché à les différencier en motoneurones. Ce travail fait l'objet de l'Article 1.

Title : Optimized protocol to generate spinal motor neurons starting from human induced pluripotent stem cells

En préparation

Optimized protocol to generate spinal motor neurons starting from human induced pluripotent stem cells

Authors: Pierre-Antoine Faye⁽¹⁾, Nicolas Vedrenne⁽²⁾, Laurence Richard^(1,3), Sylvie Bourthoumieu^(1,4), Franck Sturtz^(1,5), Benoît Funalot^(6,7), Anne-Sophie Lia^(1,5)

1- Univ. Limoges, Maintenance myélinique et neuropathies périphériques, EA6309, F-87000 Limoges, France,

2- Univ. Limoges. Homéostasie cellulaire et pathologies, laboratoire de bromatologie EA 3842, F-87000 Limoges, France,

3- CHU Limoges, Service de Neurologie, F-87000 Limoges, France,

4- CHU Limoges, Service de Cytogénétique, F-87000 Limoges, France,

5- CHU Limoges, Service de Biochimie et Génétique Moléculaire, F-87000 Limoges, France

6- CHU Henri-Mondor, Département de Génétique, F-94000 Créteil, France,

7- Univ. Paris-Est-Créteil, Inserm U955-E10, F-94000 Créteil, France,

Abstract:

Human induced pluripotent stem cells (hiPSc) are a great solution to obtain specialized cells from patient in order to better understand the physiopathology of diseases and to provide good models for drug screening. Today, many protocols are available to differentiate hiPSc in particular in neurosciences. They are based on the embryonic development observation but are quite different. We analysed them precisely and we optimized them to create a new protocol to obtain motor neurons from hiPSc “easily” and efficiently.

Introduction:

Be able to work with specialized human cells from a patient is an efficient way to understand the physiopathology of his disease and to test potential future therapies. To study peripheral neuropathies such as Charcot-Marie-Tooth disease, spinal motor neurons are necessary. Induced pluripotent stem cells (iPSc) are a highly interesting solution to create and observe the behavior of specific and unattainable cells from a patient (Takahashi and Yamanaka 2006; Takahashi et al. 2007). After human dermal fibroblasts reprogramming with non-integrative plasmids (Oct4, Sox2, Klf4 and l-Myc) (Okita et al. 2011), iPSc could be differentiated into a lot of cells types and in particular into motor neurons (MN). In the past

1

decade, various protocols have been developed to differentiate human embryonic stem cells (hESc) (Li et al. 2005; Singh Roy et al. 2005) or iPSc (Dimos *et al.* 2008; Ebert *et al.* 2009; Hu and Zhang 2009; Chambers *et al.* 2009; Kim *et al.* 2010) into spinal MN.

We describe here the optimized protocol we developed starting from these previous publications that we improved with our own background. In order to understand and to develop this new protocol to improve the MN differentiation, it is important to understand the key role of some factors during the embryonic development.

The successful embryonic development needs a lot of sophisticated and regulatory mechanisms. Here we report a simple view of the embryonic development with the most important morphogens. Bergmann, Gregor and Harfe described modulations of gene expression in a temporal variation and spatial endogenous signaling molecules diffusion gradients in drosophila and mouse (Harfe et al. 2004; Bergmann et al. 2007; Gregor et al. 2007). Therefore during neural development, the neural tube differentiation could be described according to 2 axes: antero-posterior and dorso-ventral. Depending on their position along these two axes, neural cells will have specific differentiation and thus specific functions.

The antero-posterior differentiation is based on morphogens signals as retinoic acid (RA), the Fibroblasts Growth Factors (FGF) or Wnt (Kudoh *et al.* 2002). They are produced by the axial and paraxial mesoderma and endoderma and they exhibit concentration gradient from the caudal to cranial part. They are responsible for the modification of hindbrain or the anterior section of spinal cord. But our interest in this study is to better understand and identify the keys factors in the dorso-ventral differentiation leading to MN.

The dorso-ventral differentiation involves the determination of cell identity. The neural development starts with the process of neural induction during and after gastrulation, which allows the formation of neuroectoderma, from the dorsal part of the ectoderma. The polarity of the neural tube is established by opposite morphogens gradients of the TGF- β family (Transforming Growth Factors- β family) more specifically Bone Morphogenetic Protein (BMP), dorsoline and activin) synthesized by the ectodermal cells and the neural tube roof plate and Sonic Hedgehog (SHH), a morphogen synthesized by the notochord and the neural tube floor plate. BMP inhibits the neural cells formation. But this morphogen is inhibiting by the chordin, the follistatin and the noggin, 3 morphogens synthesized by the notochord (Bier and De Robertis 2015). The gradients of SHH and of molecules of TGF- β family will organize the neural tube by stimulating specific transcription factors (Pax6, Irx3, Dbx2, Pax7, Nkx2.2, Nkx6.1), leading to future interneurons or motor neuron (Casarosa *et al.* 2013).

2

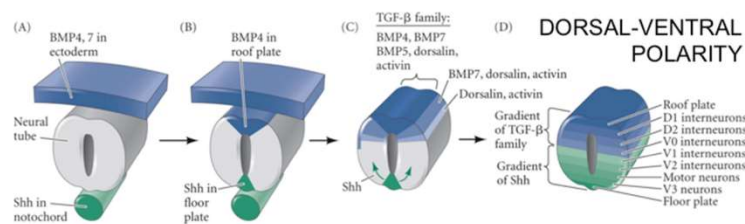


Figure 1: Factors involved in dorsal-ventral polarity during the cord differentiation

According to these knowledge in the embryonic development, Hynek Wichterle were the first to differentiate mouse embryonic stem cell (mESc) into MN using RA and SHH agonist (Wichterle et al. 2002). Twenty to 40 % of MN were obtained with this protocol and the proportion increased to 60 - 80% with Miles protocol in 2004 using N2 supplement in the media (Miles *et al.* 2004). In 2005 hESc were differentiated into MN (Li *et al.* 2008; Singh Roy *et al.* 2005). Human ES cell seems to be more difficult to differentiate than mESc. Indeed several factors must be added to obtain the same result. Human rosettes appeared later than mouse ones and neural progenitors need a specific cocktail (BDNF, IGF-1 and GDNF) in order to generate MN and to keep them in culture. The proportion of MN obtained with this protocol was around 10% after 4 weeks, 50% after 5 weeks of differentiation and 80% at the end. In this protocol, SHH was substituted by the Purmorphamine. In 2008, Dimos et al. used this “human ES cell protocol” but starting from human iPSc to differentiate successfully them into MN (Dimos et al. 2008). In this study, SHH, RA, ascorbic acid, BDNF, GDNF, and CNTF were used. In immunocytochemistry, 20% of all cells expressed HB9 (motor neuron marker) and more than 90% of these HB9-positive cells also expressed ISLET 1/2. In 2009, a specific protocol to differentiate human iPSc into MN was described by Hu et al in Nature Protocol (Hu and Zhang 2009). In this protocol, SHH could be replaced or not by the Purmorphamine, and after the progenitor formation, BDNF, IGF-1, GDNF, cAMP and ascorbic acid were added. At the spinal motor neurons generation step, the concentration of SHH and RA were reduced by half in order to prevent the inhibition of motor neuron differentiation. Post-mitotic motor neurons were obtained in 5 weeks and functional mature motor neurons were generated in 8–10 weeks to a final proportion > 50%. This protocol does not use feeder cells.. This protocol was improved by Chambers (Chambers et al. 2009). In this work hESc or hiPSC were cultured on Matrigel coverslip seeded beforehand with feeders. The initial differentiation media conditions included TGF-β inhibitor (SB431542) and Noggin. The Noggin binds on TGF family ligand and SB431542 inhibit a part of TGF-β

receptor. These factors inhibit the Smad pathway and help iPSc to gain easily the neural way. Motoneuron patterning was performed using BDNF, ascorbic acid, sonic hedgehog and retinoic acid in N2 media and the proportion of MN increased up to 80%. In 2010, Kim et al. suggested to use simultaneous SB431542 and dorsomorphin to inhibit both Activin/Nodal and BMP pathways, respectively (Kim *et al.* 2010). This protocol promoted significant neural differentiation from hESC and hiPSc.

Watanabe et al. described the Rho-associated kinase (ROCK) inhibitor (Y-27632) key role during differentiation (Watanabe *et al.* 2007). In this study, dissociated hESC treated with Y-27632 were protected from apoptosis. Y-27632 enabled hESC to survive, grow and differentiate into cortical and basal telencephalic progenitors.

In order to generate spinal motor neurons, we tested these protocols and then created our own optimized protocol enabling an efficient and “easy” production of MN.

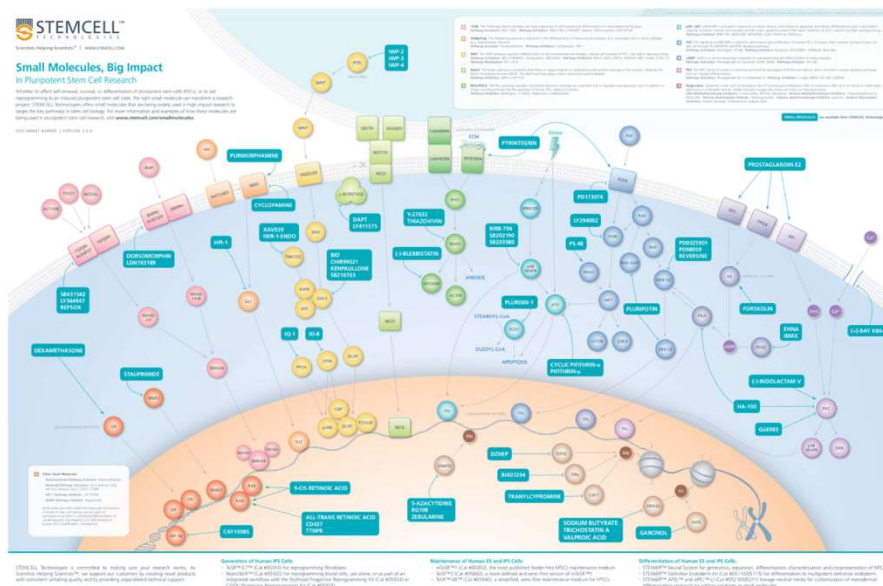


Figure 2: Small molecules used for differentiation

Experimental design

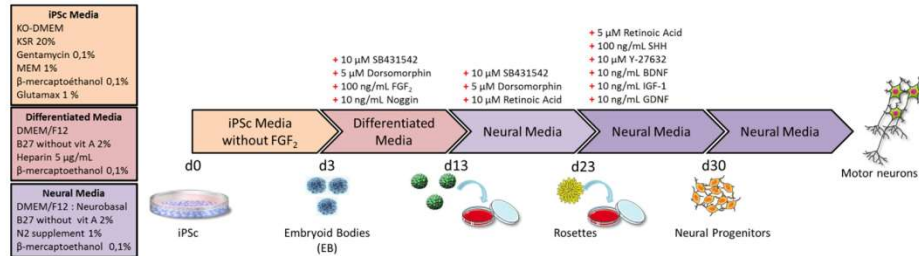


Figure 3: Schematic representation of motor neurons induction with all medium and factors

Medium

iPSc media: KO-DMEM (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), supplemented with 20% KnockOut Serum Replacement (Life Technologies), 1X MEM non-essential amino acids 100X (Life Technologies), 2mM Glutamax (Life Technologies), 50 μ M β -mercaptoethanol (Life Technologies), 10 UI/mL gentamycin (Life Technologies).

Differentiated media: DMEM/F12 (Life Technologies), 2% B27 without vit A (Life Technologies), 5 μ g/mL heparin (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), 100 μ M β -mercaptoethanol (Life Technologies)

Neural induction media: 1:1 DMEM/F12 (Life Technologies) and Neurobasal A (Life Technologies), 1% N2 supplement (Life Technologies), 2% B27 without vit A (Life Technologies), 100 μ M β -mercaptoethanol (Life Technologies)

Motor neurons differentiation

Human iPSc were obtained as previously described (Okita *et al.* 2011).

Step 1: at d0, after cleaning, iPSc colonies (Fig. 4 (A)) were cut in homogenous squares using a StemPro® EZPassage™ (Life Technologies). Clusters were collected and were resuspended in 60 mm ultra-low attachment dishes (Corning Incorporated, New York, USA), in 5 mL iPSc media without FGF₂.

Step 2: at d1, in order to remove the dead cells like the feeder (MEF), all the cells suspension was put in a falcon 15 mL, and the plate was rinsed twice using iPSc media to remove all the clusters and add them into the falcon. After 5 min of sedimentation, the supernatant was discarded and the clusters were put in a new 60 mm ultra-low attachment dishes with 5 mL iPSc media.

Step 3: on day 3, embryoid bodies (EBs) were totally round and differentiation media was used supplemented by 10 μ M SB431542 (Tocris Bioscience, Minneapolis, MN, USA), 5 μ M Dorsomorphin (Sigma-Aldrich), 100 ng/mL FGF₂ (PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, USA) and 10 ng/mL Noggin (PeproTech Inc.) extemporaneously. Every other day the media was changed per sedimentation as previously described and EB were fed with the supplemented differentiation media (Fig. 4(B)).

Step 4 specific coated plate: on day 10, and during all other days, cells need a specific coated plate. The plate (24 wells, 12 wells, 6 wells, 30 mm or 60 mm) was incubated with 20 μ g/mL poly-L-ornithine 4h at 37°C. The poly-L-ornithine was put in a large drop in the central area of the plate as to cover all the area. The next day, the poly-L-ornithine was aspirated and the plate dried for 30 min at room temperature. Then it was washed three times using 1 ml of sterile water or DPBS and then it was let open under the hood at room temperature until completely dry. The laminin was diluted with a fresh neural induction media (without supplement), to a final concentration of 30 μ g/mL and was put in a large drop in the central area of the plate as to cover all the area. The plate was incubated overnight at 37°C.

Step 5: on days 10 to 13, 30 to 35 EB were seeded on a 60 mm coated dishes in 4 mL volume of neural induction media supplemented by 10 μ M SB431542 (Tocris Bioscience), 5 μ M Dorsomorphin (Sigma-Aldrich), 10 μ M retinoic acid (RA) (Sigma-Aldrich). EB needed to be very round, very smooth, with a typical morphology, with brownish and not to black color and they needed to have approximatively the same size.

Step 6: one day latter, the aggregates were attached to the plate and 1 mL of the supplemented neural induction media was added up to 5 ml, until the rosettes apparition. The cells were fed every other day with the neural induction media supplemented as previously described.

Step 7: 1) on days 21 to 23, mature rosettes were observed (Fig. 4 (C)). We noticed that single cells (after the rosette step) were more able to generate MN, than aggregates cells. Thus, rosettes were manually separated to the others cells using a needle to make squares as small as possible, took off with a pipette, and grouped in the middle of the plate by gently circles movements. Then, rosettes were pipetted in a smallest media volume as possible and put in an 1.5 mL Eppendorf to be gently washed 2 times with 1 mL DPBS (Life Technologies) in order to remove all the media by sedimentation. 500 μ L of Accutase was then added to the rosette pellet and the suspension was put in a 30 mm dish which already contains 1 mL of Accutase in order to increase the contact area

6

between Accutase and rosettes. Rosettes squares must be smaller as possible in order to limit the enzyme damage during the dissociation. After 5 min of incubation at 37°C in a water-saturated atmosphere and 5% CO₂, mechanical dissociation, aggregates were gently mechanically dissociated with a pipette, and kept in the incubator. The dissociation was controlled under the microscope, and this step was repeated every five minutes in order to obtain single cells suspension. Accutase can be in contact with the cells no more than 20 min.

2) Then, 1 mL of fresh neural induction media without supplement was added and the suspension was added to 7 ml of neural induction media in a Falcon 15 in order to dilute the enzyme. The falcon was centrifuged at 400 g during 10 min. The supernatant was discarded, the single cells were computed and they were then seeded on a 24 wells plate at 100,000 cells per cm² in order to generate neuronal precursor (NP) (Fig. 4(D)).

3) The neural induction media was supplemented at day 23 by 100 ng/ml sonic hedgehog (SHH, PeproTech Inc.), 5 μM RA and 10 μM Y-27632 ROCK inhibitor (Calbiochem, Billerica, Massachusetts, USA) for a further 2–6 weeks supplemented with 10 ng/mL BDNF, 10 ng/mL GDNF, and 10 ng/mL IGF (PeproTech Inc.) to help neuronal survival.

Step 8: NP were fed every other day with the neural induction media and supplement as previously described except for the Y-27632 ROCK inhibitor, which was added every single day.

Step 9: After one week, NP grew up and were dissociated using Accutase as previously described. At this step, NP were either seeded at 10,000 cells per cm² in order to generate motor neurons with the same media, or conserved following the freezing protocol (Fig. 4 (E) (F)).

Step 10: At day 33, first MN were observed by immunocytochemistry (Fig. 5 (A to D)). All cells were expressed PGP9.5 and 10% were ISLET positives, which is specific to/for neuronal cells and MN respectively.

Step 11: At day 50, the proportion of MN increased up to 60% (Fig. 5 (E to H)).

Step 12: cryopreservation. Before the cryopreservation, NP were counted, the suspension was collected and centrifuged for 5 minutes at 170 g. The supernatant was discarded and 500 μL per cryovials of CryoStor CS10 (Stemcell Technologies, Grenoble, France) was added to the cell pellet. The cryovials were transported to a - 80 °C freezer using an isopropyl alcohol chamber overnight. The frozen vials were then preserved for long-term in standard liquid nitrogen storage containers.

7

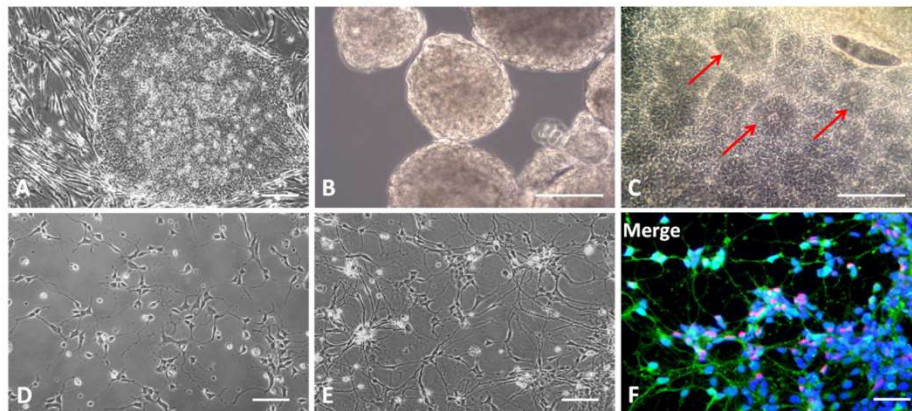


Figure 4: Induction of spinal motor neurons

Human iPSC colonies (A) were cut in large squares to generate EBs (B) and grew in classical media during 3 days. EBs evolved in a « Diff Media » during 10 days, and they were seeded on a poly-L-ornithin / laminin plate in neural induction media up to the apparition of rosettes (C, red arrows). Rosettes were gently manually removed and dissociated. Singles cells were seeded on poly-L-ornithin / laminin dish at 100,000 cells per cm^2 in order to generate neuronal precursors (D). In order to generate motor neurons, neuronal precursors were dissociated and seeded at 10,000 cells per cm^2 (E). The proportion of motor neurons increased up to 10 to 60% due to a maturation process at day 33 and day 50 (F). Scale bar = 50 μm

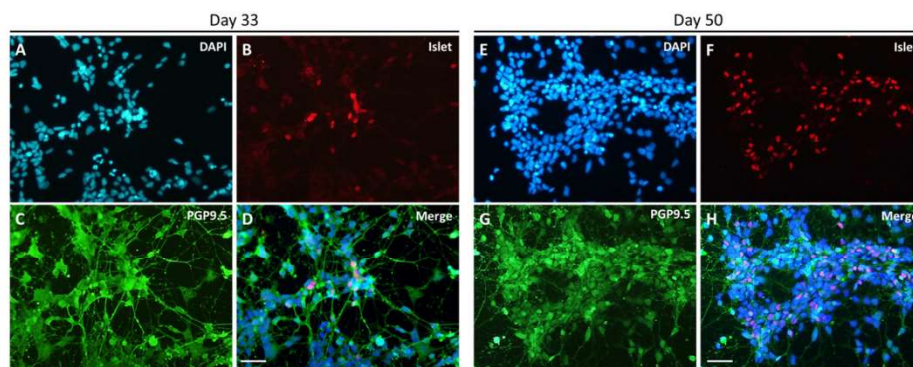


Figure 5: hiPSc differentiation into motor neurons at d33 and d50

Immunocytochemistry was performed at d33 and d50. Nuclei were stained with DAPI (blue), neurons with PGP9.5 (green) and motor neurons with an ISLET cocktail (red). At day 33, all cells were differentiated into neurons and 10% were ISLET positives (A to D). Two weeks later (day 50), the proportion of motor neurons increased up to 60% due to a maturation process (F to H). Scale bar = 50 μm

Conclusion

In summary, we showed that human iPSc could be easily differentiated into rosette, neurons and motor neurons with few factors in only 30 days for the first motor neurons. Although further study will be needed to increase the number of motor neurons like FACS as Toli et al described (Toli *et al.* 2015), MN derived from human iPSc would be a critical step to mimic neurological pathology as Charcot-Marie-Tooth disease, and are also expected to make drug-screening.

Bibliography

- Bergmann S., Sandler O., Sberro H., Shnider S., Schejter E., Shilo B.-Z., Barkai N. (2007) Pre-steady-state decoding of the Bicoid morphogen gradient. *PLoS Biol.* **5**, e46.
- Bier E., Robertis E. M. De (2015) BMP gradients: A paradigm for morphogen-mediated developmental patterning. *Science (80-.).* **348**, aaa5838–aaa5838.
- Casarosa S., Zasso J., Conti L. (2013) *Systems for ex-vivo Isolation and Culturing of Neural Stem Cells.*
- Chambers S. M., Fasano C. a, Papapetrou E. P., Tomishima M., Sadelain M., Studer L. (2009) Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat. Biotechnol.* **27**, 275–80.
- Dimos J. T., Rodolfa K. T., Niakan K. K., Weisenthal L. M., Mitsumoto H., Chung W., Croft G. F., et al. (2008) Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* **321**, 1218–21.
- Ebert A. D., Yu J., Rose F. F., Mattis V. B., Lorson C. L., Thomson J. A., Svendsen C. N. (2009) Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* **457**, 277–80.
- Gregor T., Tank D. W., Wieschaus E. F., Bialek W. (2007) Probing the limits to positional information. *Cell* **130**, 153–64.
- Harfe B. D., Scherz P. J., Nissim S., Tian H., McMahon A. P., Tabin C. J. (2004) Evidence for an expansion-based temporal Shh gradient in specifying vertebrate digit identities. *Cell* **118**, 517–28.
- Hu B.-Y., Zhang S.-C. (2009) Differentiation of spinal motor neurons from pluripotent human stem cells. *Nat. Protoc.* **4**, 1295–304.
- Kim D.-S., Lee J. S., Leem J. W., Huh Y. J., Kim J. Y., Kim H.-S., Park I.-H., Daley G. Q., Hwang D.-Y., Kim D.-W. (2010) Robust Enhancement of Neural Differentiation from Human ES and iPS Cells Regardless of their Innate Difference in Differentiation Propensity. *Stem Cell Rev. Reports* **6**, 270–281.

- Kudoh T., Wilson S. W., Dawid I. B. (2002) Distinct roles for Fgf, Wnt and retinoic acid in posteriorizing the neural ectoderm. *Development* **129**, 4335–4346.
- Li X.-J., Du Z.-W., Zarnowska E. D., Pankratz M., Hansen L. O., Pearce R. A., Zhang S.-C. (2005) Specification of motoneurons from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **23**, 215–21.
- Li X.-J., Hu B.-Y., Jones S. a, Zhang Y.-S., Lavaute T., Du Z.-W., Zhang S.-C. (2008) Directed differentiation of ventral spinal progenitors and motor neurons from human embryonic stem cells by small molecules. *Stem Cells* **26**, 886–93.
- Miles G. B., Yohn D. C., Wichterle H., Jessell T. M., Rafuse V. F., Brownstone R. M. (2004) Functional properties of motoneurons derived from mouse embryonic stem cells. *J. Neurosci.* **24**, 7848–58.
- Okita K., Matsumura Y., Sato Y., Okada A., Morizane A., Okamoto S., Hong H., et al. (2011) A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat. Methods* **8**, 409–12.
- Singh Roy N., Nakano T., Xuing L., Kang J., Nedergaard M., Goldman S. A. (2005) Enhancer-specified GFP-based FACS purification of human spinal motor neurons from embryonic stem cells. *Exp. Neurol.* **196**, 224–34.
- Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861–72.
- Takahashi K., Yamanaka S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663–76.
- Toli D., Buttigieg D., Blanchard S., Lemonnier T., Lamotte d’Incamps B., Bellouze S., Baillat G., Bohl D., Haase G. (2015) Modeling amyotrophic lateral sclerosis in pure human iPSc-derived motor neurons isolated by a novel FACS double selection technique. *Neurobiol. Dis.* **82**, 269–280.
- Watanabe K., Ueno M., Kamiya D., Nishiyama A., Matsumura M., Wataya T., Takahashi J. B., et al. (2007) A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **25**, 681–6.
- Wichterle H., Lieberam I., Porter J. A., Jessell T. M. (2002) Directed Differentiation of Embryonic Stem Cells into Motor Neurons. *Cell* **110**, 385–397.

1.4 Conclusion

La première étape d'obtention des cellules iPSc s'est déroulée de façon satisfaisante. En effet, nous avons pu obtenir des cellules iPSc de 2 personnes que nous avons prélevées.

Dans un 2^e temps, nous avons pu les différencier en cellules ayant des caractéristiques de motoneurones, et ceci dans une proportion d'environ 60%.

En revanche, ce travail s'est révélé très consommateur de milieux et facteurs de croissance (assez onéreux) et très chronophage pour l'expérimentateur ! De plus, nous avons dû faire face à quelques infections de nos cultures cellulaires d'origine bactérienne (expérimentateur indépendant).

2 Amélioration de la pureté cellulaire par SdFFF

2.1 Situation du problème

La proportion de cellules iPSc que nous avons pu différencier en motoneurones dans l'étape précédente n'excédait pas 60% et ceci malgré nos efforts pour augmenter ce taux de différenciation. En regard du cout financier et du temps passé à cette différenciation, nous nous sommes tournés vers la SdFFF qui est une méthode préparative dont le principe de séparation des cellules est basé uniquement sur des critères biophysiques telles que la taille, la densité, la forme et la rigidité. Après une différenciation spontanée selon les trois feuilletts embryonnaire des EB issus des hiPSc, nous émettons l'hypothèse de pouvoir trier ces feuilletts. A notre satisfaction, la SdFFF s'est avérée capable de trier non pas les feuilletts mais des progéniteurs neuraux et de les séparer des progéniteurs endothéliaux. Il a également été montré un gain de temps, passant de 30 jours avec une différenciation classique à 13 jours avec la méthode de tri SdFFF sans facteur ou milieu spécifiques.

2.2 Article 2

Title: A new fast method for endothelial and neural progenitor from Human Induced Pluripotent Stem Cell sorting by Sedimentation FFF.

En préparation (Analytical Chemistry)

A new fast method for endothelial and neural progenitors from Human
Induced Pluripotent Stem Cell sorting by Sedimentation Field Flow
Fractionation

Pierre-Antoine Faye⁽¹⁾, Nicolas Vedrenne⁽²⁾, Miguel A. De la Cruz-Morcillo⁽³⁾, Claire-Cécile Barrot^(1,4), Laurence Richard^(1,5), Sylvie Bourthoumieu^(1,6), Franck Sturtz^(1,4), Benoît Funalot^(7,8), Anne-Sophie Lia^(1,4) and Serge Battu^(2*)

1- Univ. Limoges, Maintenance myélinique et neuropathies périphériques, EA6309, F-87000 Limoges, France,

2- Univ. Limoges. Homéostasie cellulaire et pathologies, laboratoire de bromatologie EA 3842, F-87000 Limoges, France,

3- Univ. Limoges. Homéostasie cellulaire et pathologies, EA 3842, F-87000 Limoges, France,

4- CHU Limoges, Service de Biochimie et Génétique Moléculaire, F-87000 Limoges, France

5- CHU Limoges, Service de Neurologie, F-87000 Limoges, France,

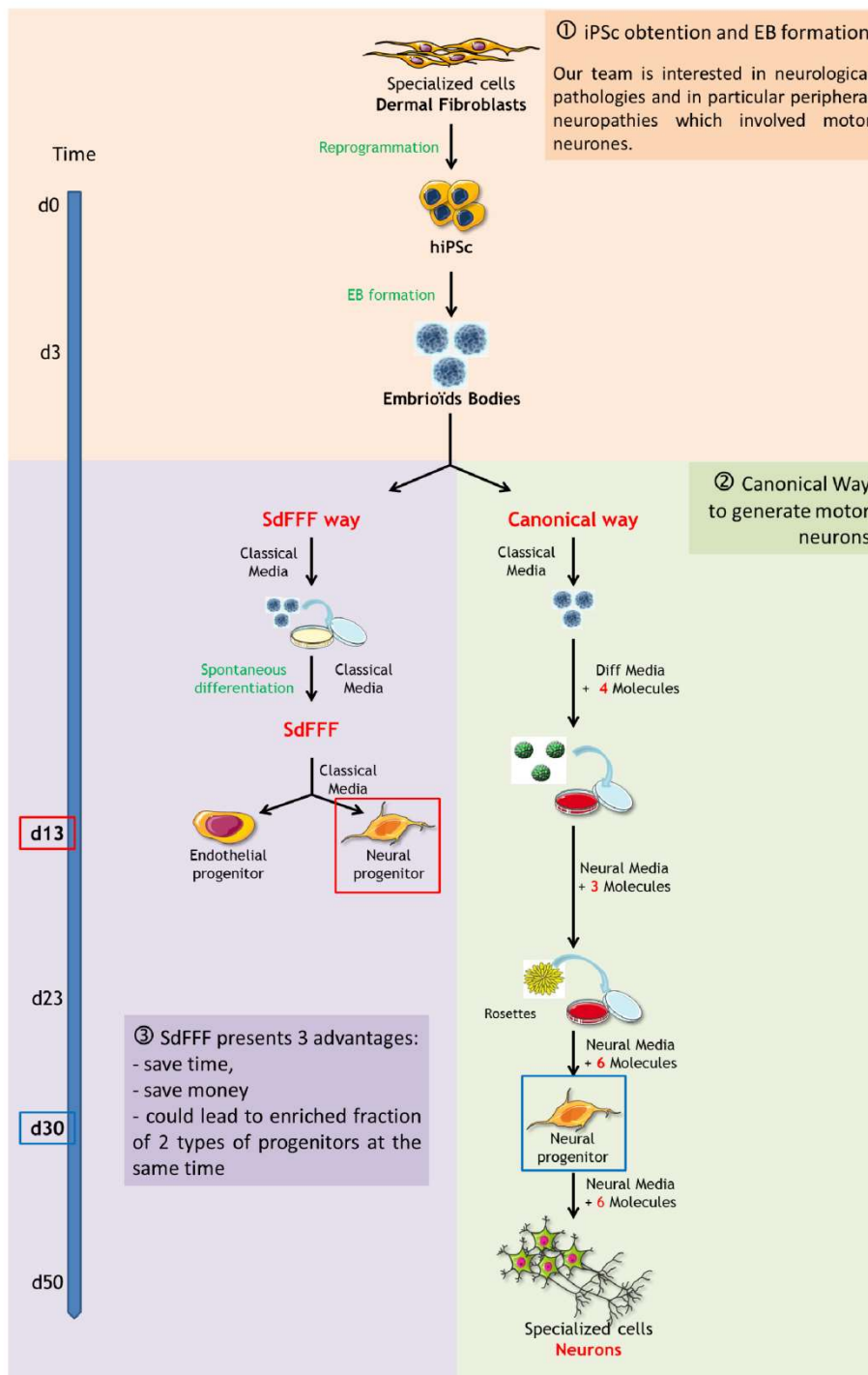
6- CHU Limoges, Service de Cytogénétique, F-87000 Limoges, France,

7- CHU Henri-Mondor, Département de Génétique, F-94000 Créteil, France,

8- Inserm U955-E10, Université Paris-Est-Créteil, F-94000 Créteil, France,

* Corresponding author: Pr Serge Battu, Tel: +33 5 55 43 59 79, Email: serge.battu@unilim.fr

Key words: Human induced pluripotent stem cells, cell sorting, sedimentation field flow fractionation, neural progenitors, endothelial progenitors.



Abstract

Human induced pluripotent stem cells (hiPSc) are a highly interesting solution to create and observe the behavior of specific and unattainable cells from a patient. Dermal fibroblasts (DF) from skin biopsies were obtained and were then reprogrammed into hiPSc using non-integrative plasmids (Oct4, Sox2, Klf4 and l-Myc). These hiPSc present the same properties than embryonic stem cell and can generate any cellular type after a few weeks of differentiation. Today, there is a flow of protocols which aim at controlling hiPSc differentiation. However, the main problem is to get as much as possible of a specific cell population, in order to use it to better understand the pathophysiology of a disease and provide a good model for further investigation and drug screening. The differentiation process is [highly] expensive and time-consuming because a lot of specific factors and different culture media have to be used. In this study, we used Sedimentation Field Flow Fractionation (SdFFF) to prepare enriched populations derived from hiPSc after only a few days of culture in a classical medium. Based on phenotypic and proteic characterizations, "hyperlayer" elution resulted in a second fraction expressing markers of endothelial progenitors while the third fraction expressed markers of neural progenitors. The isolation of subpopulation involved in different pathways constitutes a major interest for the production of specialized cells-enriched fraction or in the development of more complex models for development of new therapeutic tools.

Introduction

Human induced pluripotent stem cells have the same properties as human embryonic stem cell (hESC), that are self-renewal and ability to differentiate into all cell types that make up an adult organism ¹. In the absence of growth factor maintaining their stemness properties, hiPSc differentiate into the three embryonic germs layers: ectoderma, endoderma and mesoderma, similarly to hESC. HiPSc are obtained by genetic reprogramming of adult differentiated cells using non-integrative plasmid ². Skin dermal fibroblasts are the most commonly used cells for iPSc generation ³, but other cells such as keratinocytes ⁴ or blood cells ⁵ can also be used. HiPSc have been used to model various neurological disorders such as Parkinson disease ⁶, Alzheimer disease ⁷ or Charcot Marie Tooth disease ⁸, and also to test the efficiency of candidate drugs at various scales (targeted therapeutic with only a few drugs ⁹ or High-Throughput Screening with 50000 drugs ¹⁰). HiPSc could also become an excellent tool for cell therapy or for the regeneration and graft of whole organs ¹¹. Nevertheless, the immediate interest they generate is hampered by difficulties to obtain cell populations enriched in the cells of interest. Currently time, there are many different protocols to model most of the specialized cells, such as neurals cells ¹², cardiomyocytes ¹³, brown adipocytes ¹⁴ or retinal pigmentary epithelium ¹⁵. Obtaining reliable and reproducible results in pharmaceutical screening has been hampered by the heterogeneity of the final culture and it is still difficult to control the differentiation potential of these cells especially during formation of more complex cell models ¹⁶. Therefore, developing new methods to rapidly obtain pure and intact populations of hiPSc-derived progenitor is a crucial point to go on faster in the health field. Various techniques are available for cell separation and characterization such as fluorescent or magnetic-activated cell sorting (FACS or MACS) which take advantage of specific antigen expression. However, phenotypic characterization is controversial and the specific antibody labeling needed for these techniques can by itself induce cells modifications (among which

cell differentiation). Development of alternative methods to enrich hiPSc-derived progenitor without labeling is essential to avoid interference with further cell use (culture, graft, differentiation...). In this respect, methods based on intrinsic biophysical properties (size, density...) such as field flow fractionation (FFF) could be of great interest. Among FFF techniques, Sedimentation FFF (SdFFF) is described as gentle, non-invasive and tagless cell sorting method^{17 18}. These advantages are based on the drastic limitation of cell-solid phase interactions by the use of 1) an empty ribbon-like channel without stationary phase; and 2) the "hyperlayer" elution mode, a size/density driven separation mechanism¹⁸⁻²⁶. The principle of cell separation is based on physical criteria such as size, density, shape, rigidity^{17-19,21,22,27} and depends on the differential elution of species submitted to the combined action of 1) a parabolic profile generated by flowing a mobile phase through the channel; and 2) an external field applied perpendicularly to the flow direction²⁰. In SdFFF, a multigravitational external field is generated by rotation of the separation channel in a rotor basket, constituting one of the most complex devices used in FFF separation^{20,27}. Since our pioneering report concerning mouse embryonic stem cells²⁶, we demonstrated the interest of SdFFF to prepare enriched and sterile populations of normal and cancer stem cells²⁸⁻³⁰.

The aim of this study was to evaluate the capacity of SdFFF, to quickly isolate enriched populations of hiPSc-derived progenitors. Our results show that SdFFF was able to elute two distinct populations derived from hiPSc faster than by canonical differentiation. The obtained fractions were analyzed by mass spectroscopic method in order to study the difference in protein expression and the results were subsequently confirmed by western blotting. These experiments show that SdFFF is a good strategy to sort endothelial and neural cells progenitor from hiPSc only 10 days after Embryoïd Bodies (EB) spontaneous differentiation without specific factors and in a basic medium, as compared to the canonical way which needs 30 days and a lot of culture media and differentiation factors.

The isolation of subpopulation involved in a differentiation pathway constitutes a major interest in the production of specialized cells enriched fraction, to the development of more complex model and for further investigation and drug screening.

Experimental section

Human iPSc generation and culture conditions

Dermal fibroblasts

After obtaining patients' informed consent ("Centre de référence national des neuropathies périphériques rares", CHU service de neurologie, Limoges, France), skin biopsies were performed and used to obtain a primary culture of fibroblasts by the explant technique. Explants of 1mm³ were cultured in CHANG Medium D (Irvine Scientific, Santa Ana, USA) for 3 days, then the proportion of CHANG medium D (Irvine Scientific) was reduced and mixed with RPMI-1640 Medium (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) to (1:1) for the two next days and to (1:4) for the days after. All mediums were supplemented with 10% foetal calf serum (FCS) (Life Technologies), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (Life Technologies). Tissue culture flasks were kept at 37°C in a water-saturated atmosphere and 5% CO₂. After 2 weeks, explants were removed from culture flasks and dermal fibroblasts were ready for hiPSc reprogramming. Before hiPSc generation, human fibroblasts were tested for HVB, HVC and HIV (CHU Virology department, Limoges, France) and controlled to be mycoplasma-free (MycoAlert™, Lonza, Walkersville, MD, USA).

HiPSc generation

According to iStem procedure (INSERM/UEVE UMR 861, AFM, Genopole, Evry, France) 3 non integrative plasmids (Plasmid #6 pCXLE-hOCT3/4 shp53-F Addgene, Plasmid #7 pCXLE-hSK Addgene, Plasmid #8 pCXLE-hUL Addgene) at 1 µg/mL were used to reprogram fibroblasts into hiPSc by using Nucleofector II device (Amaxa, Lonza).

Immediately after nucleofection, 100,000 cells were seeded in each well of a six-well plate, which had previously been seeded with mitomycin C-treated BJ-1 cells (iStem construct). Cells were cultured in DMEM GlutaMAX (Life Technologies), supplemented with 10% fetal bovin serum (Life Technologies) and 1X MEM non-essential amino acids 100X (Life Technologies). Tissue culture plates were kept at 37 °C in a water-saturated atmosphere and 5% CO₂. At day 1, the medium was changed and supplemented with 10 UI/mL gentamycin (Life Technologies). At day 4, hiPSc medium was added: KO-DMEM (Life Technologies), supplemented with 20% KnockOut Serum Replacement (KSR) (Life Technologies), 1X MEM non-essential amino acids 100X (Life Technologies), 2 mM Glutamax (Life Technologies), 50 µM β-mercaptoethanol (Life Technologies), 10 UI/mL gentamycin (Life Technologies). The medium was supplemented with 10 ng/mL FGF₂ (Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA), 2 µM SB431542 (Tocris Bioscience, Minneapolis, MN, USA), 0.5µM PD0325901 (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany) and 500 µM valproate (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) during 10 days and changed every 2 days. The hiPSC colonies had to be picked about 2-5 weeks post nucleofection. They were cultured during 6 months as carefully as possible. The same supplemented hiPSC medium was used to feed cells every two days. Passage 20 must be waited at least in order to perform controls and the differentiation of hiPSc.

hiPSc culture, EB formation and spontaneous differentiation

Colonies were cultivated on 0.1% gelatin (Sigma-Aldrich) in dishes previously seeded with mitomycin C-treated Mouse Embryonic Fibroblast (MEF) (feeder layer; TebuBio, Le Perray-en-Yvelines, France). Every day, hiPSc were cleaned by removing the differentiated cells using a needle. The medium was replaced every day by fresh hiPSc medium supplemented with 10 ng/mL FGF₂. HiPS colonies were passaged weekly by cutting colonies in large squares using a needle. EB were plated on dishes coated by 0.1% gelatin (Sigma-Aldrich) and

cultured in hiPSc medium as previously described. After 10 days, cells were removed and isolated using Accutase (Sigma-Aldrich). Accutase was removed by centrifugation, and DPBS: hiPSc medium (40:60) was added to the pellet in order to have a suspension with no aggregate ready for the SdFFF.

SdFFF device and cell elution conditions

The SdFFF separation device used in this study derived from those previously described and schematized³¹. Channel dimensions were 781 mm × 10 mm × 0.125 mm with two 70 mm V-shaped ends with a measured total void volume of 1133 ± 0.70 μL (n > 6). The channel rotor axis distance was measured at r = 13.80 cm. Sedimentation fields were expressed in units of gravity, 1g = 980 cm/s², and calculated as previously described³². Cleaning and decontamination procedures, control of rotation speed, as well as chromatographic and acquisition devices have been previously described³³.

The optimal elution conditions were determined experimentally and were: flow injection through the accumulation wall of 100 μL hiPSc suspension (2 × 10⁶ cells/mL); flow rate: 0.60 mL/min; mobile phase: sterile PBS, pH = 7.4; external multi-gravitational field strength: 40.00 ± 0.02 g; spectrophotometric detection at 254 nm. Fractions were collected as follows: total population (TP): 2 min 45 s to 11 min 30 s; fraction 1 (F1): 2 min 45 s to 5 min 30 s; fraction 2 (F2): 5 min 30 s to 7 min 45 s; fraction 3 (F3): 7 min 45 s to 11 min 30 s. To obtain a sufficient quantity of cells for further biological and biophysical characterizations, successive SdFFF cumulative fraction collections were performed (6 to 9). Size measurement using Coulter Counter was performed as previously described³⁴.

Protein analysis, mass spectrometry (MS) and peptide identification

Chemical products were purchased from GE Healthcare for SDS-PAGE analysis and from Sigma-Aldrich for mass spectrometry analysis. After SdFFF cell sorting, cells were cultured during 1 week in 6 wells plates (1×10^5 cells per well). Cells of each fraction were lysed (5 minutes on ice) in the culture plate by RIPA lysis buffer (1% NP-40, 0.1% SDS, 0.5% desoxy-cholate sodium in PBS) supplemented with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF). The suspension was sonicated for 1 min (a pulsation of 40 Hz every 20 sec) to degrade chromosomal DNA and centrifuged at 14,000 g for 10 minutes. Supernatants were collected and protein concentration was determined using Bradford protein concentration assay. The proteins were resolved on a 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel and visualized by Colloidal CBB G250 staining. The gel profiles of the different fractions were compared, protein zones of interest were excised, and protein digestion was performed using sequencing grade modified trypsin (Promega, Charbonnières, France) as previously described³⁵. After gel digestion, peptides were analyzed by nano LC-MS/MS using a LC Packings system (Dionex, Amsterdam, The Nederland) coupled with a Triple TOF 5600+ (Sciex, Montréal, Canada). The Triple TOF was operated in information-dependent acquisition mode with Analyst 1.7 TF software (Sciex). For database searching, the MS/MS data were used to query Swissprot database using the Mascot software (version 2.2, Matrix Science, England) with the following criteria: human as taxonomy category, 0.5 Da for peptide and fragment mass tolerances, one missed trypsin cleavage site allowed, carbamidomethylation of cysteine residues (from iodoacetamide exposure) and methionine oxidation as variable modifications. The protein identification was established if one peptide matches of ion score above 50 or at least two peptides match of ion score above 25 at 95% confidence level.

Western blotting assay

Cells were collected in lysis buffer containing 25 mM HEPES, pH 7.5, 0.3 M NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 0.5% Deoxycholic Acid, 20 mM β-glycerolphosphate plus protease and phosphatase inhibitors (0.2mg/ml Leupeptin, 2 mg/ml Aprotinin, 1 mM PMSF and 0.1 mM Na₃VO₄). Protein quantification was performed using BCA Protein Assay Kit (Pierce #23235) following manufacturer's instructions. 50 μg of protein were loaded onto 4-15% mini protean precast gels (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), transferred to PVDF membranes (Millipore) and blotted against: CD31 (Dako, Goat IgG, 1:1000), Von Willebrand Factor (Abcam, Mouse IgG, 1:1000), NCAM-1 (Santa-Cruz Biotech, Rabbit IgG, 1:500) and Neuropilin-2 (Santa-Cruz Biotech, Mouse monoclonal IgG, 1:500). β-Actin (Sigma-Aldrich) was used as loading control. Antigen detection was achieved by enhanced chemiluminescence (Millipore, Darmstadt, Germany). All Western blots detection were performed using a GBox detector (Syngene, Cambridge, United Kingdom).

Statistical analyses

The bands of interest were analyzed for proteomic experiment, and proteins were classified according to their quality (Matches, Covert, Mass, pl, emPAI). Unicity score were given based on their number of occurrences in other migrations, how many migrations, and the coverage of these occurrences. Good quality proteins with high enough unicity score were selected. These proteins were annotated with R-project software, according to UniProt database. For Western blotting, images were quantified by using Image J software (NIH), and statistical analyses were performed using a t-test. Images show a representative western blot out of 3 with nearly identical results.

Results and discussion

hiPSc generation

Dermal fibroblasts (DFs) obtained from the skin biopsy of a healthy person were reprogrammed using episomal non-integrative plasmids bearing Oct4, Sox2, Klf4 and l-Myc, into hiPSc. Fifteen days after nucleofection, DFs changed their morphology to finally form some colonies with a typical morphology and they were selected for further expansion. After 6 months of amplification, all of these colonies (Figure S1A) were positive for alkaline phosphatase (Figure S1D, S1I), were able to form embryoïd bodies (Figure S1B) and to be differentiated into cell types from all three embryonic germ layers following a spontaneous differentiation protocol (Supp Fig. 1E to 1H). These cells also expressed pluripotency markers including Nanog, Oct3/4 and Sox2 (Figure S1J to S1Q), and had normal karyotypes (Figure S1C). According to these controls, reprogrammed dermal fibroblasts had acquired the properties of human embryonic stem cells, i.e. self-renewal, pluripotency and ability to spontaneously generate the three embryonic germ layers, and could therefore be classified as hiPSc.

SdFFF elution of hiPSc-Derived Progenitor

SdFFF is a method providing a gentle, non-invasive and label free cell sorting respecting cellular integrity, functionality and sterility³⁶. The major advantages of this method are to limit harmful cell to cell and cell-surface interactions by using an empty channel (no stationary phase and low shear force), and not to rely on any type of antibody-mediated cell sorting, which is of great importance when cell markers are not well defined (in particular for stem cells), when commercial labels do not exist or when labeling could interfere with further cell uses (culture, transplantation) or could even induce differentiation (stem cells). The cell separation mechanism, described as "hyperlayer" elution mode^{36,37}, is solely based on intrinsic biophysical properties of the studied cells, which are size, density,

11

shape and rigidity; it is a safe cell sorting method because it greatly limits cell-surface interactions and shear forces ¹⁸⁻²⁶³⁶. Under hyperlayer mode, subpopulations of same size, density..., are focused in thin layers away from the accumulation wall, corresponding to their equilibrium position where the external field is exactly balanced by hydrodynamic forces ^{18,20,21,23-25,27}. The "hyperlayer" elution order being size/density dependent, large and less dense cells are focused in the faster streamlines and are eluted in first. As previously described ^{26,38}, the experimental retention ratio $R_{obs} = \text{void time versus retention time} = t_0/t_R$ (measured by first moment method) ³⁹, was used to determine the different average velocity, retention order, and finally, the elution mode. Representative fractograms and fraction collections of hiPSc are displayed in Figure 1. The first fractogram peak corresponds to unretained species (void volume peak, $R_{obs} \approx 1$) and the second to the cell population with $R_{obs} = 0.258 \pm 0.008$. As previously described ^{18,19,23,27,33,40}, "Hyperlayer" mode was demonstrated by the means of field and flow rate dependence of R_{obs} . Then, R_{obs} for hiPSc cells varied from 0.236 ± 0.006 (50 g and 0.4 ml/min) to 0.316 ± 0.005 (30 g and 1.0 ml/min). In the "hyperlayer" elution mode samples were lifted away from the accumulation wall, limiting harmful cell surface interactions. By using the following equation ¹⁹.

$$s = \frac{R_{obs} \times \omega}{6} \quad 1$$

in which ω is the channel thickness (125 μm), we calculated the value of s , the average distance from the center of the cell to the channel wall ¹⁹. Under "hyperlayer" mode, s should be greater than particle radius r , calculated from the mean cell diameter. Here, the s value was 5.4 μm for a mean cell radius measured at 5.2 μm , which is closed, as it was previously observed for other cell lines ³³. This could be explained by the elution of a complex population presenting a broad dispersion either from phenotypical or biophysical point of view, needing elution conditions giving broader peak. According to "hyperlayer" mode, elution order should be size and density dependent ^{18-22,24,25} with a decrease in cell diameter

12

along elution profile. Here, the mean diameter varied from $13.45 \mu\text{m} \pm 0.26 \mu\text{m}$ for cell eluted in F1 to $9.67 \pm 0.03 \mu\text{m}$ for cell eluted in F3.

Then, as we described for different cell species, our results demonstrated that hiPSC cells were eluted under the "Hyperlayer" mode³⁶. Our main objective was to determine whether the selected conditions and collection times allowed to sort sub-populations with different biological properties, leading to specific lineage (hiPSC-Derived Progenitor), in particular on the basis of proteomic analyses.

Three fractions were collected, F1, F2 and F3 (Figure 1A). F1 contained few cells but a lot of cellular debris, whereas F2 and F3 were cell-rich. Our attention was therefore focused on the last two fractions, F2 and F3. Cells morphologies were very different between F2 and F3 after 7 days of culture F2-derived cells displayed an epithelial morphology (Figure 1B F2) whereas in F3, cells were smaller and they had long processes (Figure 1B F3), showing an hypothesized neural identity in contrast phase acquisition. In order to identify the two sub-population, proteomics analysis were performed.

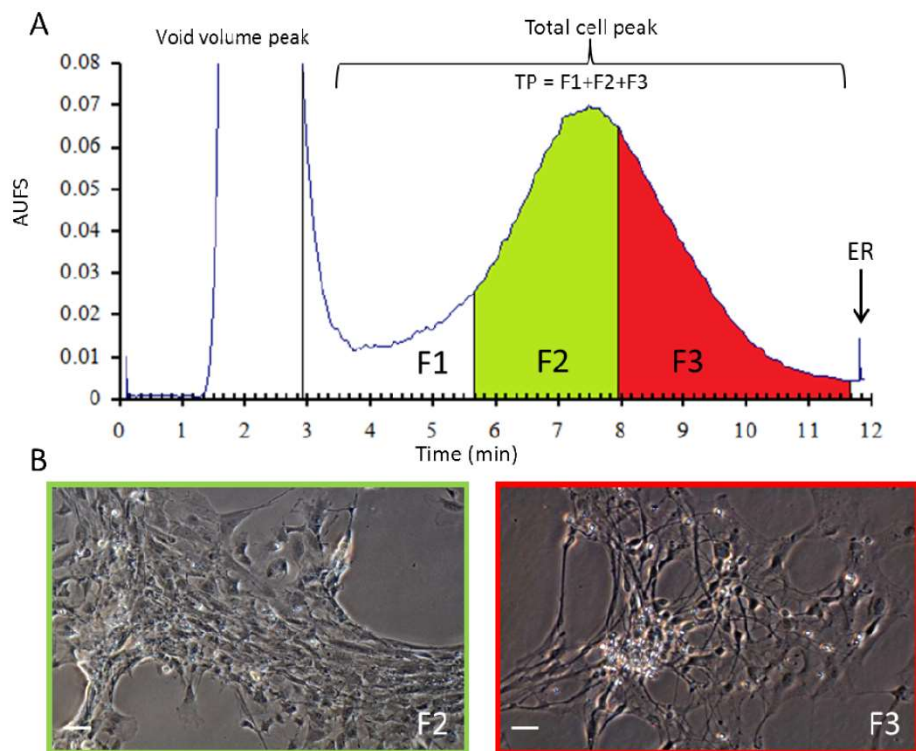


Figure 1: Representative fractograms of hiPSc derived progenitors and fraction collection

(A) Representative fractograms of hiPSc derived progenitors and fraction collection. Elution conditions: flow injection of 100 μL cell suspension (2.5×10^6 cells/mL), flow rate: 0.6 mL/min (sterile PBS, pH 7.4); external multi-gravitational field: 40.00 ± 0.02 g, spectrophotometric detection at $\lambda = 254$ nm. ER corresponds to the end of channel rotation (mean externally field strength = 0 g). (B) hiPSc derived progenitors 7 days after back to culture (phase contrast microcopy, scale bar = 100 μm).

Protein analyses

Obtain sub-populations without any tag was an important step in therapy. FACS or MACS based on labeling methods can modify and induce stem cell differentiation in all the way. Moreover for a majority of stem cells, specific cell markers are not clearly identified

and the sub-populations characterization could be made by proteomic analyses. After proteins extraction and electrophoresis separation (Figure 2A), 6 remarkable bands were analyzed per fractions by mass spectroscopy, and 321 proteins were identified and analysed. One hundred and fifty-eight proteins were expressed common to F2 and F3, whereas 14 and 15 proteins were markedly more expressed in F2 or in F3, respectively. 38 and 96 proteins were only expressed in F2 or in F3, respectively (Figure. 2B). Using the UniProt database, we found that many of the proteins found in both fractions were involved in basic cell functions, such as metabolism, extracellular matrix, angiogenesis or apoptosis. Proteomic analysis allowed us to detect types of cell-specific proteins in the two fractions. Most of F2-specific proteins were involved in endothelial cell biology (green) whereas a few of them seemed to be involved in neural fate (red) (Figure 2C). In contrast, a high proportion of F3-specific proteins were involved in neural cells biological process (red) and a few part seemed to be involved in endothelial cells biology (green) (Figure 2D and Table 1). In order to confirm these observations, western blotting assays were performed using characteristic markers of both lineages (Figure 2E, 2F). Because validated antibodies against F2- or F3-specific proteins were not commercially available for the vast majority of these proteins, we had to use common validated markers for both lineages, which explained that the expression could be found more or less in both fractions. The CD-31 is also known as Platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1), and is a transmembrane glycoprotein. It is present on the surface of monocytes, granulocytes, platelets, and endothelial cells ⁴¹. The Von Willebrand factor (VWF) is blood glycoprotein involved in the maintenance of hemostasis. The VWF antibody is specific to the endothelial cells cytoplasm ⁴². Neuropilin-1 and Neuropilin-2 (NRP-2) are both transmembrane glycoprotein receptors for semaphorins. Semaphorin signaling is involved during embryogenesis as an axonal repulsive activity that prevents improper innervation ⁴³. Roles of NRP-2 are more specific to the neural system. NCAM-1

(neural cell adhesion molecule 1) is also called CD56. It is a homophilic binding glycoprotein expressed in particular on the neurons membranes. This protein has been described in the control of proliferation and differentiation of embryonic cells from neuroectoderma and adult neural stem cells ^{44,45}, but it also involved in neuron adhesion, neurite fasciculation and outgrowth of neurites ⁴⁶.

The expression of CD31 and VWF were higher in F2, (respectively 1.55 ± 0.064 and 1.58 ± 0.03), than in F3 (0.81 ± 0.13 and 0.64 ± 0.14 respectively) compared to actin. CD31 and VWF are specific to endothelial cells. As expected, expression of NRP-2 was higher in F3 than in F2 (1.36 ± 0.16 and 0.97 ± 0.24 respectively). NCAM-1 protein expression was higher in F2 and F3 than in PT fraction (2.07 ± 0.35 and 2.3 ± 0.6 respectively) compared to actin, as indicated in histogram (Fig. 3F). Neuropilin-2 and NCAM-1 were specific to neural cells. According to these results, endothelial progenitor proteins were more expressed in F2 than in F3 and neural progenitor proteins were more expressed in F3.

Our team is interested in genetic peripheral nerves disease and in particular in Charcot-Marie-Tooth disease (CMT). One of our objectives is the development of cellular models of the disease, and thus we needed to differentiate hiPSc into spinal motor neurons (MN) in order to better understand the pathophysiology of this disease. For this purpose, an optimized protocol to generate neural progenitors and then spinal MN from hiPSc was built. But this protocol was costly and time-consuming. In this study, we have developed a new method based on the physical properties of the cells, which allowed us to obtain rapidly and with a reduced cost a population of cells enriched in neural and endothelial progenitors.

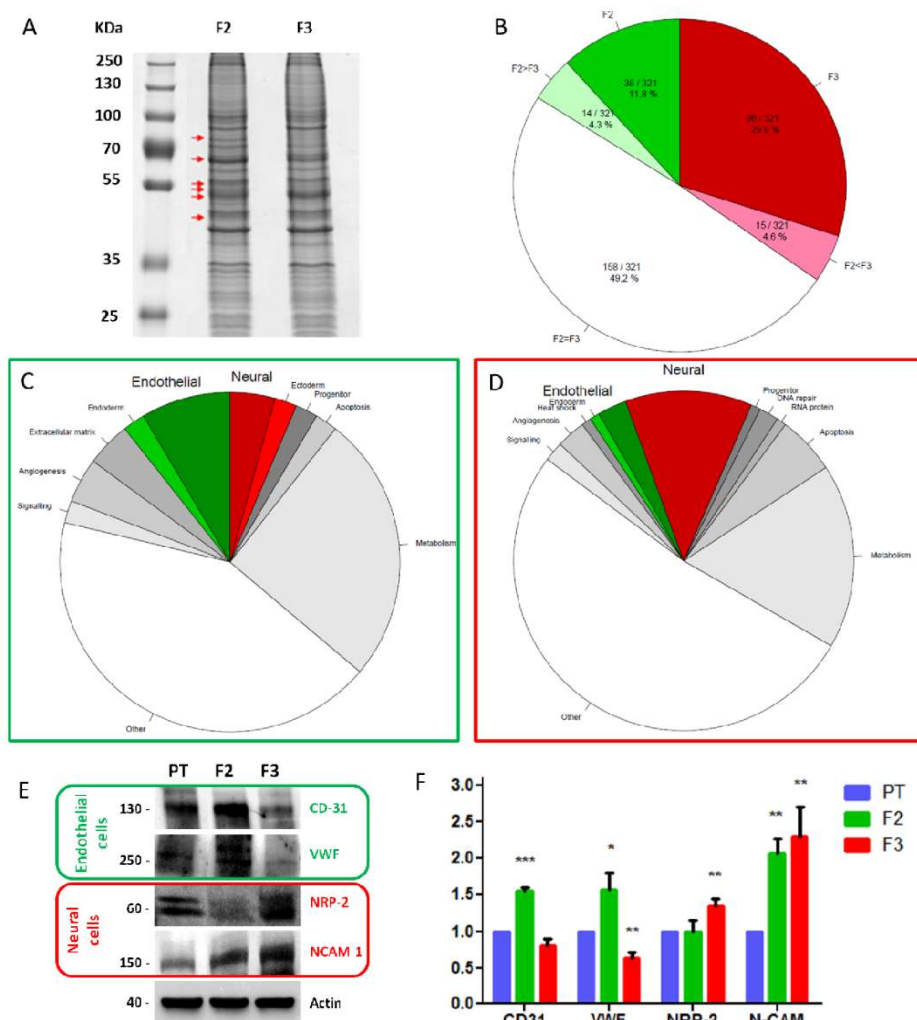


Figure 2: Protein analyses

(A) electrophoresis of F2 and F3 protein extraction, 6 bands label with red arrows were analyzed per fractions by mass spectroscopy, (B) repartition of 321 proteins only in F2, F3 or both in F2 and F3 after statistical analyses, unique F2 proteins (C) or unique F3 proteins (D) classification according to biological functions, (E) (F) western blot and quantification where CD-31 and Von Willebrand Factor were more expressed in F2 than in F3 and NRP-2 and NCAM-1 were more expressed in F3 than in F2.

		Proteins only in F2	Proteins in F2 & F3	Proteins only in F3
Nature of proteins	Endothelial	4F2 IKIP MMP14 PFKAP PLAK PTGIS	ANM5 AP2M1 CDC73 EZRI K2C1 LYRIC OFUT2 PTN11 SRC SRC8 TRY3	COR1B PAF1 STAT1
	Neural	ARSA PDL15	AIFM1 CMC2 CUL3 DFNA5 DNM1L DPYL3 ENOA FUBP2 GDIA HDAC2 IF2B1 LMNB1 MCM7 PLD3 PPP5 RTN4 SDHA SEP11 TBA1A TBA1B TBB5 ULA1 VPS35 ZYG	2ABA BASP1 DPYL1 DPYL2 GLMN GSK3A HNRPR LAMP1 SERA SUN2 TBA1C TF65

Table 1: Proteins involved in neural or endothelial biological process

Statistical analyses highlight proteins involved in neural or endothelial biological processes only in F2, only in F3 or in both F2 and F3

Conclusion

The creation of hiPSc and subsequent studies about their potentiality have shown that they can produce differentiated cells used for modeling human diseases, for drug screening and perhaps also for cell grafts. The production of purified distinct target cells is an important step for safe and controllable cell therapy. Usually, various techniques are used for cell separation and characterization, such as fluorescent- or magnetic-activated cell sorting (FACS or MACS) according to specific cell markers, but these labelings can induce and/or modify cell differentiation.

Taken together, our results show that SdFFF is able to sort endothelial and neural progenitors. They also show a gain of time of 17 days to obtain neural progenitors, from 30 days with the canonical way to 13 days with the SdFFF method, which also allows to avoid the use of multiple specific factors and media. Our results demonstrate that SdFFF is not just a preparative method but can isolate a population of interest

We now plan to increase the numbers of fraction collections, in order to avoid the overlap between endothelial and neural progenitor. In addition, obtaining a higher number of fractions should allow us to identify more precisely specific sub-populations of progenitor cells and to save more time. Finally, SdFFF could appear as a versatile, tagless cell sorting tool, allowing a much easier and cheaper enrichment of the hiPSc-derived cells of interest.

Acknowledgements

This work was supported by grants from Région Limousin (P-A. Faye, A-S Lia, B Funalot) and CHU Limoges, France. The authors also thank I-Stem institute (INSERM/UEVE UMR 861, AFM, Genopole, Evry, France) and The AFM-Téléthon institute for the formation they offered to help us to generate our hiPSc. The authors kindly thank Emilie Pinault (Proteomic department, University of Limoges, France) for the protein analysis, and Claire Carrion (Confocal microscopy facility, University of Limoges, France) for confocal microscopy analysis.

Complementary data

HiPSc control

For immunocytochemistry, cells were fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) for 15 minutes at room temperature and rinsed during 5 min 3 times with DPBS 1X. The cells were permeabilized with 0.2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) and 3% BSA (bovine serum albumin) in DPBS 1X for 1h at room temperature. Cells were rinsed 3 times with DPBS 1X, and then cells were incubated with 3% BSA and primary antibodies overnight at 4°C. Antibody used for pluripotency were Nanog (Abcam Rabbit poly IgG, 1:100), Oct 3/4 (Santa Cruz Biotech, Mouse Mono IgG2B, 1:100), Sox2 (Chemicon, Rabbit Poly IgG, 1:100), and for spontaneous differentiation in three germinal layers were Pax6 (Covance, Rabbit Poly IgG, 1:100), α SMA (DAKO, Mouse IgG2A, 1:500) and Sox17 (R&D, Goat IgG, 1:100). Cells were subsequently labeled with the appropriate fluorescently-tagged secondary antibodies Alexa fluor 488 (green fluorescence) and Alexa fluor 594 (red fluorescence) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). DAPI (4',6'-Diamidino-2-Phénylindole dihydrochloride, Sigma-Aldrich) was used to label nuclei at 1mg/mL . Then, cells were observed with a fluorescence microscope (Leica DM IRB, Nanterre, France). Pictures were obtained with the NIS Element BR software, and they were treated with Image J software (NIH, Bethesda, Maryland, USA).

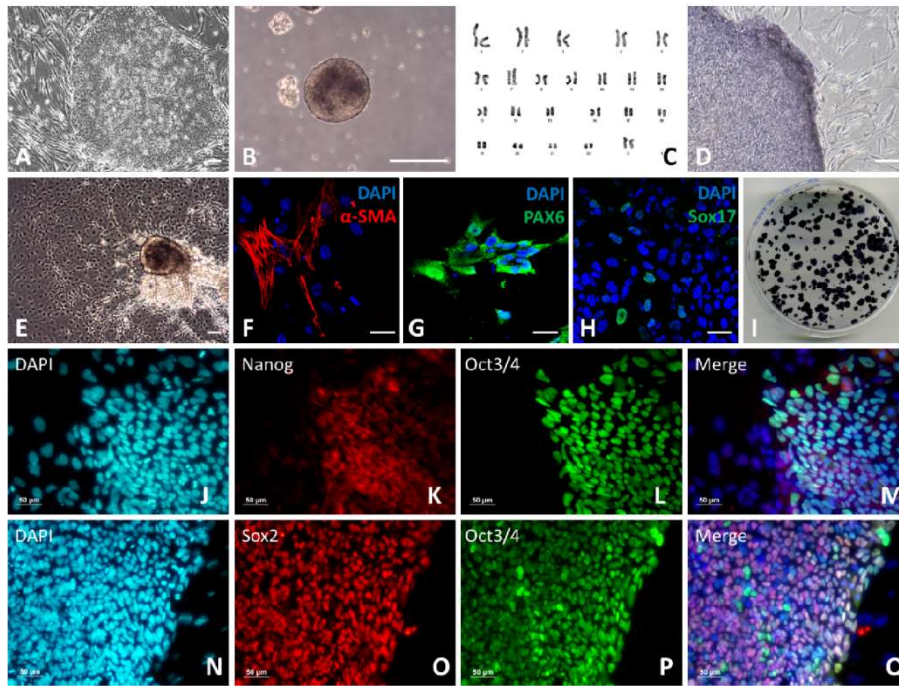


Figure S1: hiPSc generated from a healthy person

Dermal fibroblasts were reprogrammed with the Yamanaka's cocktail (Oct4, Sox2, Klf4, l-Myc) into induced pluripotent stem cells (A). These cells could form embryoid bodies (B) and, after seeding and growth (E), cells could spontaneously differentiate into cells from the three germ layers like mesoderm (F), ectoderm (G) and endoderm (H). These hiPSc had a normal karyotype (C) and were positive for alkaline phosphatase (D and I). These cells also expressed pluripotency markers (J to Q). Scale bar: 50 μ m

Protein Analyses

For each band, proteins were classified according to score (increased according to the probability of the protein presence), match (numbers of peptides identified for this protein), cover (percent coverage of the sequence), mass (molecular weight), pI (isoelectric point), emPAI (increased according to the probability of the protein presence).

L'ensemble des tableaux d'identification des protéines se trouve en Annexe IX

Bibliographie

- (1) Takahashi, K.; Tanabe, K.; Ohnuki, M.; Narita, M.; Ichisaka, T.; Tomoda, K.; Yamanaka, S. *Cell* **2007**, *131* (5), 861–872.
- (2) Okita, K.; Matsumura, Y.; Sato, Y.; Okada, A.; Morizane, A.; Okamoto, S.; Hong, H.; Nakagawa, M.; Tanabe, K.; Tezuka, K.; Shibata, T.; Kunisada, T.; Takahashi, M.; Takahashi, J.; Saji, H.; Yamanaka, S. *Nat. Methods* **2011**, *8* (5), 409–412.
- (3) Nakagawa, M.; Koyanagi, M.; Tanabe, K.; Takahashi, K.; Ichisaka, T.; Aoi, T.; Okita, K.; Mochizuki, Y.; Takizawa, N.; Yamanaka, S. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26* (1), 101–106.
- (4) Aasen, T.; Raya, A.; Barrero, M. J.; Garreta, E.; Consiglio, A.; Gonzalez, F.; Vassena, R.; Bilić, J.; Pekarik, V.; Tiscornia, G.; Edel, M.; Boué, S.; Izpisua Belmonte, J. C. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26* (11), 1276–1284.
- (5) Loh, Y.-H.; Agarwal, S.; Park, I.-H.; Urbach, A.; Huo, H.; Heffner, G. C.; Kim, K.; Miller, J. D.; Ng, K.; Daley, G. Q. *Blood* **2009**, *113* (22), 5476–5479.
- (6) Rakovic, A.; Seibler, P.; Klein, C. *Biochem. Soc. Trans.* **2015**, *43* (2), 302–307.
- (7) Muratore, C. R.; Rice, H. C.; Srikanth, P.; Callahan, D. G.; Shin, T.; Benjamin, L. N. P.; Walsh, D. M.; Selkoe, D. J.; Young-Pearse, T. L. *Hum. Mol. Genet.* **2014**, *23* (13), 3523–3536.
- (8) Saporta, M. a.; Dang, V.; Volfson, D.; Zou, B.; Xie, X. S.; Adebola, A.; Liem, R. K.; Shy, M.; Dimos, J. T. *Exp. Neurol.* **2015**, *263*, 190–199.
- (9) Yamamoto, S.; Otsu, M.; Matsuzaka, E.; Konishi, C.; Takagi, H.; Hanada, S.; Mochizuki, S.; Nakauchi, H.; Imai, K.; Tsuji, K.; Ebihara, Y. *PLoS One* **2015**, *10* (3), e0120841.
- (10) Kaufmann, M.; Schuffenhauer, A.; Fruh, I.; Klein, J.; Thiemeyer, A.; Rigo, P.; Gomez-Mancilla, B.; Heidinger-Millot, V.; Bouwmeester, T.; Schopfer, U.; Mueller, M.; Fodor, B. D.; Cobos-Correa, A. *J. Biomol. Screen.* **2015**.
- (11) Takebe, T.; Sekine, K.; Enomura, M.; Koike, H.; Kimura, M.; Ogaeri, T.; Zhang, R.-R.; Ueno, Y.; Zheng, Y.-W.; Koike, N.; Aoyama, S.; Adachi, Y.; Taniguchi, H. *Nature* **2013**, *499* (7459), 481–484.
- (12) Lancaster, M. a.; Knoblich, J. a. *Science (80-.)*. **2014**, *345* (6194), 1247125–1247125.
- (13) Fuerstenau-Sharp, M.; Zimmermann, M. E.; Stark, K.; Jentsch, N.; Klingenstein, M.; Drzymalski, M.; Wagner, S.; Maier, L. S.; Hehr, U.; Baessler, A.; Fischer, M.; Hengstenberg, C. *PLoS One* **2015**, *10* (5), e0126596.
- (14) Nishio, M.; Saeki, K. *Methods Enzymol.* **2014**, *537*, 177–197.

- (15) Reichman, S.; Terray, A.; Slembrouck, A.; Nanteau, C.; Orioux, G.; Habeler, W.; Nandrot, E. F.; Sahel, J.-A.; Monville, C.; Goureau, O. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111* (23), 8518–8523.
- (16) Maury, Y.; Gauthier, M.; Peschanski, M.; Martinat, C. *Bioessays* **2012**, *34* (1), 61–71.
- (17) Reschiglian, P.; Zattoni, A.; Roda, B.; Michelini, E.; Roda, A. *Trends Biotechnol.* **2005**, *23* (9), 475–483.
- (18) Caldwell, K. D.; Cheng, Z. Q.; Hradecky, P.; Giddings, J. C. *Cell Biophys.* **1984**, *6* (4), 233–251.
- (19) Chmelik, J. *J. Chromatogr. A* **1999**, *845* (1-2), 285–291.
- (20) Giddings, J. C. *Science* **1993**, *260* (5113), 1456–1465.
- (21) Giddings, J. C. *Anal. (Cambridge, U. K.)* **1993**, *118* (12), 1487–1494.
- (22) Martin, M.; Williams, P. S. In *Theoretical Advancement in Chromatography and Related Separation Techniques*; Dondi, F., Guiochon, G., Eds.; Kluwer: Dordrecht, 1992; Vol. 383, pp 513–580.
- (23) Plockova, J.; Matulik, F.; Chmelik, J. *J. Chromatogr. A* **2002**, *955* (1), 95–103.
- (24) Schure, M. R.; Caldwell, K. D.; Giddings, J. C. *Anal. Chem.* **1986**, *58* (7), 1509–1516.
- (25) Williams, P. S.; Lee, S.; Giddings, J. C. *Chem. Eng. Commun.* **1994**, *130*, 143–166.
- (26) Guglielmi, L.; Battu, S.; Le Bert, M.; Faucher, J. L.; Cardot, P. J. P.; Denizot, Y. *Anal. Chem.* **2004**, *76*, 1580–1585.
- (27) Battu, S.; Cook-Moreau, J.; Cardot, P. J. P. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **2002**, *25* (13 - 15), 2193–2210.
- (28) Bertrand, J.; Liagre, B.; Bégau-Grimaud, G.; Jauberteau, M. O.; Cardot, P.; Beneytout, J. L.; Battu, S. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2008**, *869* (1-2), 75–83.
- (29) Comte, I.; Battu, S.; Mathonnet, M.; Bessette, B.; Lalloué, F.; Cardot, P.; Ayer-Le Lièvre, C. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2006**, *843* (2), 175–182.
- (30) Mitais, N.; Bessette, B.; Gobron, S.; Cardot, P.; Jauberteau, M. O.; Battu, S.; Lalloué, F. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406* (6), 1671–1681.
- (31) Sarrazy, V.; Vedrenne, N.; Bordeau, N.; Billet, F.; Cardot, P.; Desmoulière, A.; Battu, S. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1289*, 88–93.
- (32) Battu, S.; Elyaman, W.; Hugon, J.; Cardot, P. J. P. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **2001**, *1528* (2-3), 89–96.

- (33) Micallef, L.; Battu, S.; Pinon, A.; Cook-Moreau, J.; Cardot, P. J. P.; Delage, C.; Simon, A. *J. Chromatogr. B* **2010**, *878* (15-16), 1051–1058.
- (34) Mélin, C.; Perraud, A.; Akil, H.; Jauberteau, M.-O.; Cardot, P.; Mathonnet, M.; Battu, S. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (3), 1549–1556.
- (35) Darby, I. A.; Vuillier-Devillers, K.; Pinault, E.; Sarrazy, V.; Lepreux, S.; Balabaud, C.; Bioulac-Sage, P.; Desmoulière, A. *Cancer Microenviron.* **2010**, *4* (1), 73–91.
- (36) Bégau-Grimaud, G.; Battu, S.; Leger, D. Y.; Cardot, P. J. P. In *Field-Flow Fractionation in Biopolymer Analysis*; Williams, S. K. R., Caldwell, K. D., Eds.; Springer-Verlag: Wien, 2012.
- (37) Mélin, C.; Perraud, A.; Bounaix Morand du Puch, C.; Loum, E.; Giraud, S.; Cardot, P.; Jauberteau, M.-O.; Lautrette, C.; Battu, S.; Mathonnet, M. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2014**, *963*, 40–46.
- (38) Cailleteau, C.; Micallef, L.; Lepage, C.; Cardot, P. J.-P.; Beneytout, J.-L.; Liagre, B.; Battu, S. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398* (3), 1273–1283.
- (39) Williams, P. S.; Moon, M. H.; Xu, Y.; Giddings, J. C. *Chem. Eng. Sci.* **1996**, *51* (19), 4477–4488.
- (40) Leger, D. Y.; Battu, S.; Liagre, B.; Beneytout, J. L.; Cardot, P. J. P. *Anal. Biochem.* **2006**, *355* (1), 19–28.
- (41) Newman, P. J.; Newman, D. K. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2003**, *23* (6), 953–964.
- (42) Andrews, R. K.; Berndt, M. C. *Thromb. Res.* **2004**, *114* (5-6), 447–453.
- (43) Yazdani, U.; Terman, J. R. *Genome Biol.* **2006**, *7* (3), 211.
- (44) Deleyrolle, L.; Sabourin, J.-C.; Rothhut, B.; Fujita, H.; Guichet, P.-O.; Teigell, M.; Ripoll, C.; Chauvet, N.; Perrin, F.; Mamaeva, D.; Noda, T.; Mori, K.; Yoshihara, Y.; Hugnot, J.-P. *PLoS One* **2015**, *10* (4), e0122337.
- (45) Shin, M. H.; Lee, E.-G.; Lee, S.-H.; Lee, Y. S.; Son, H. *Exp. Mol. Med.* **2002**, *34* (6), 401–410.
- (46) Missaire, M.; Hindges, R. *Dev. Neurobiol.* **2015**, *75* (6), 569–583.

2.3 Conclusion

La technique de SdFFF, utilisée à Limoges par l'équipe du Pr S. Battu et N. Vedrenne, nous paraît une technique intéressante pour augmenter la pureté d'une population cellulaire, mais aussi enrichir une fraction de cellules. Pris dans leur ensemble les résultats de ce travail (extraction, migration par électrophorèse, spectroscopie de masse et western blots) ont montré que la SdFFF était capable de trier des progéniteurs endothéliaux et neuraux.

Nous prévoyons maintenant d'augmenter le nombre de fractions collectées, pour améliorer la finesse de détection des différentes sous-populations, afin d'éviter le chevauchement entre progéniteurs endothéliaux et neuraux. En outre, l'obtention d'un plus grand nombre de fractions devrait nous permettre d'identifier plus précisément des sous-populations de cellules. Enfin, la SdFFF pourrait apparaître comme un outil de tri cellulaire polyvalent et sans marquage préalable, permettant un enrichissement en cellules dérivés d'hiPSC, beaucoup plus facile et moins coûteux.

3 Différences morphométaboliques des cellules de patients vs. cellules de témoin: apparition de gouttelettes lipidiques

3.1 Introduction

Les iPSc que nous avons obtenues ont été différenciées en motoneurones selon la méthodologie développée dans l'Article 1. Il est important de rappeler que les mêmes étapes ont été suivies pour les fibroblastes dermiques de la personne contrôle et pour ceux du patient. Bien que les iPSc avaient une morphologie similaire, les cellules du contrôle et du patient présentent des différences lors de l'apparition des rosettes, étape nécessaire à l'obtention motoneurones. Dans les cellules du patient, ont été observées des gouttelettes lipidiques intracytoplasmiques en quantité très importante. L'origine de ce stockage lipidique ne nous est pas connue. Par ailleurs, le nombre de rosettes (structure remplies de progéniteurs neuraux) produites par les cellules du patient a été beaucoup plus faible. Nous avons présenté ces différences dans l'Article 3.

3.2 Article 3

Title: Abnormal lipid storage during differentiation of induced pluripotent stem cells (iPSc) into spinal motor neurons, obtained from a GDAP1 mutated patient (Charcot-Marie-Tooth disease type 2).



Abnormal lipid storage during differentiation of induced pluripotent stem cells (iPSc) into spinal motor neurons, obtained from a GDAP1 mutated patient (Charcot-Marie-Tooth disease type 2)

Journal:	<i>Journal of Neurochemistry</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Short Communication
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	FAYE, Pierre-Antoine; University of Limoges, EA6309 VEDRENNE, Nicolas; University of Limoges, EA6309 RICHARD, Laurence; University of Limoges, EA6309; CHU of Limoges, Neurology Department BOURTHOUMIEU, Sylvie; University of Limoges, EA6309; CHU of Limoges, Cytogenetics Department FUNALOT, Benoît; Henri-Mondor Hospital, Genetics Department STURTZ, Franck; University of Limoges, EA6309; CHU of Limoges, Biochimie Génétique Moléculaire LIA, Anne-Sophie; University of Limoges, EA6309; CHU Limoges, Biochimie Génétique Moléculaire
Area/Section:	Molecular Basis of Disease
Keywords:	GDAP1, Charcot-Marie-Tooth disease, iPSc, Spinal motor neurons, Lipid droplets

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Title: Abnormal lipid storage during differentiation of induced pluripotent stem cells (iPSc) into spinal motor neurons, obtained from a *GDAP1* mutated patient (Charcot-Marie-Tooth disease type 2)

Authors: Pierre-Antoine Faye¹, Nicolas Védrenne², Laurence Richard^{1,3}, Sylvie Bourthoumieu^{1,4}, Benoît Funalot⁵, Franck Sturtz^{1,6} and Anne-Sophie Lia^{1,6}

1- Univ. Limoges, Maintenance myélinique et neuropathies périphériques, EA6309, F-87000 Limoges, France,

2- Univ. Limoges. Homeostasie cellulaire et pathologies, EA 3842, F-87000 Limoges, France,

3- CHU Limoges, Service de Neurologie, F-87000 Limoges, France,

4- CHU Limoges, Service de Cytogénétique, F-87000 Limoges, France,

5- CHU Henri-Mondor, Département de Génétique, F-94000 Paris, France,

6- CHU Limoges, Service de Biochimie et Génétique Moléculaire, F-87000 Limoges, France

Corresponding author:

Dr. Anne-Sophie LIA

EA 6309 – Maintenance Myélinique et Neuropathie Périphérique

Faculté de Médecine – Université de Limoges - 2 rue du Docteur Marcland

87025 Limoges Cedex

Tél : 06 22 73 00 21 - Fax : 05 55 43 58 85

Mail : asliabaldini@unilim.fr

Running title: human mutated *GDAP1* iPSc cells to study CMT

Key words: *GDAP1*, Charcot-Marie-Tooth disease, iPSc, Spinal motor neurons, Lipid droplets

Abbreviations:

CMT: Charcot-Marie-Tooth

DF: Dermal Fibroblast

EMG: Electromyogram

HMSN: Hereditary Motor Sensory Neuropathies

iPSc: induced pluripotent stem cells

MAM: Mitochondrial-Associated-ER-Membrane

NP: Neuronal Precursor

ROS: Reactive Oxygen Species

1
2
3 Title: **Abnormal lipid storage during differentiation of induced pluripotent stem cells (iPSc)**
4 **into spinal motor neurons, obtained from a *GDAP1* mutated patient (Charcot-Marie-Tooth**
5 **disease type 2)**
6
7

8
9
10 **Authors:** Pierre-Antoine Faye¹, Nicolas Védrenne², Laurence Richard^{1,3}, Sylvie
11 Bourthoumieu^{1,4}, Benoît Funalot⁵, Franck Sturtz^{1,6} and Anne-Sophie Lia^{1,6}
12

13
14
15 1- Univ. Limoges, Maintenance myélinique et neuropathies périphériques, EA6309, F-87000 Limoges, France,

16 2- Univ. Limoges. Homeostasie cellulaire et pathologies, EA 3842, F-87000 Limoges, France,

17 3- CHU Limoges, Service de Neurologie, F-87000 Limoges, France,

18 4- CHU Limoges, Service de Cytogénétique, F-87000 Limoges, France,

19 5- CHU Henri-Mondor, Département de Génétique, F-94000 Paris, France,

20 6- CHU Limoges, Service de Biochimie et Génétique Moléculaire, F-87000 Limoges, France
21

22
23
24 **Key words:** *GDAP1*, Charcot-Marie-Tooth disease, iPSc, Spinal motor neurons, Lipid droplets
25

26 27 28 **Abstract**

29 More than 80 genes are known to be responsible for Charcot-Marie-Tooth disease (CMT),
30 the most predominant hereditary peripheral neuropathy. Among those, *GDAP1* is
31 responsible for some of the axonal forms (CMT type 2). While models have been established
32 to better understand demyelination observed in the CMT1 subgroup, few models have been
33 developed for axonal forms. Thus, we generated induced pluripotent stem cells (iPSc) from a
34 patient affected by a homozygous *GDAP1* nonsense mutation and from a healthy person,
35 with the understanding and written consent of each subject and the approval of Limoges
36 Hospital. Thereafter, we differentiated iPSc into spinal motor neurons. While iPSc had a
37 similar morphology for those of the patient and of control when undifferentiated, marked
38 differences were observed during motor neurons differentiation. Intracytoplasmic lipid
39 droplets were observed in the patient's cells and a weaker efficiency to generate neuronal
40 precursors starting from patient iPSc.
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57

58 **Introduction**

59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Hereditary peripheral neuropathies (also called Charcot-Marie-Tooth's disease, CMT) are the most common degenerative disorder of the peripheral nervous system, affecting around 1 in every 2500 people worldwide (Nelis et al. 1996). Symptoms are usually located distally, in hands and feet, and include weakness, paresis, paralysis, numbness, pain and loss of sensitivity. Schematically, 2 forms of the disease have been proposed related to the pathophysiological main feature: a demyelinating form (CMT1 or Hereditary Motor Sensory Neuropathies I (HMSN I)) and axonal form (CMT2 or HMSN II) (Dyck 1968) which can be distinguished by electrophysiological and nerve biopsy studies (Thomas and Calne 1974) (Harding and Thomas 1980). However, more than 80 genes have been identified as of today that lead to different CMT (Timmerman et al. 2014) with different types of transmission (autosomal dominant, X-linked, autosomal recessive) even for a single gene. While CMT1 forms are actively studied, CMT2 forms are much less undertaken. Therefore, we focused on the *GDAP1* gene, which is one of the most frequently found in CMT2 cases. Some mutations in the *GDAP1* gene were described to be responsible for dominant axonal form called CMT2K (Cuesta et al. 2002), and some others for a recessive axonal form called CMT4A (Baxter et al. 2002). *GDAP1* was described in 1999 (Liu et al. 1999) and it encodes a mitochondrial outer membrane protein which is involved in mitochondrial (Niemann et al. 2005) and peroxisomal fission (Huber et al. 2013), in abnormal distribution and movement of mitochondria throughout cytoskeleton towards the ER (interaction with Rab6 and Caytaxin), and it increases reuptake of intracellular Ca^{2+} (Pla-Martín et al. 2013). *GDAP1* would protect the cells from an increase of oxidized glutamate rate and thus from oxidative stress. Indeed, it would stabilize the mitochondrial membrane potential and the activity of the respiratory chain and so Reactive Oxygen Species (ROS) production decreases. Noack et al suggested that the mitochondria shape and protection against oxidative stress are linked (Noack et al. 2012). Interestingly, these phenomena seem to be specifically disturbed in motor neurons and more precisely along the axon of these motor neurons.

Induced pluripotent stem cells (iPSc) are a highly interesting solution to create and observe the behavior of specific and unattainable cells from a patient (Takahashi and Yamanaka 2006) (Takahashi et al. 2007). Dermal fibroblasts (DF) can be easily obtained from skin biopsies and then reprogrammed into iPSc using non-integrative plasmids (Oct4, Sox2, Klf4 and lMyc) (Okita et al. 2011). In 2009, the differentiation of iPSc into motor neurons was described by Hu et al (Hu and Zhang 2009). The protocol was improved by Chambers using

1
2
3 Noggin and SB431542 (Chambers *et al.* 2009). Recently, Lancaster *et al.*, developed organoids
4 from patient and healthy human iPSc (Lancaster and Knoblich 2014). These organoids could
5 be used for disease modeling, for drug efficacy testing, for drug safety testing or for organ
6 replacement therapy. In 2015, Saporta *et al.*, developed motor neurons from iPSc with *NEFL*
7 mutation or *MFN2* mutation (Saporta *et al.* 2015).
8
9

10
11 In this study, we developed and characterized iPSc from dermal fibroblasts of a
12 patient with an axonal CMT caused by a non-sense mutation on each copy of the *GDAP1*
13 gene, and we differentiated these iPSc into motor neurons. We performed the same steps
14 for dermal fibroblasts of a non-affected person. One of our objectives is to develop motor
15 neurons cellular models in order to better understand the physiopathology of *GDAP1* gene
16 and provide a good model for further investigation and drug screening.
17
18
19
20
21
22

23 **Materials and methods**

24
25
26 **Patients.** The experiments were undertaken with the understanding and written consent of
27 each subject. The study conforms with The Code of Ethics of the World Medical Association
28 (Declaration of Helsinki). Dermal fibroblasts (DFs) were obtained according to patients'
29 signed agreements from skin biopsies of a healthy person and of a homozygous patient
30 carrying *GDAP1* nonsense mutation. The patient is a 23 years old man, currently using a
31 wheelchair. The first signs of the disease appeared during his teenage, with motor difficulties
32 in lower then in upper limbs, followed by sensitive troubles. Hands are now also affected
33 (weakness and dysfunction). No signal was obtained when muscles were stimulated during
34 electromyogram (EMG). The un-affected person is a 56 years old woman without mutation
35 in *GDAP1* gene.
36
37
38
39
40
41
42
43
44

45
46 **iPScells generation.** According to I-Stem procedure (INSERM/UEVE UMR 861, AFM,
47 Genopole, Evry, France), 3 plasmids (Plasmid #6 pCXLE-hOCT3/4 shp53-F Addgene, Plasmid
48 #7 pCXLE-hSK Addgene, Plasmid #8 pCXLE-hUL Addgene) at 1 µg/mL were used to reprogram
49 fibroblasts into iPSc by using Nucleofector II device (Amaxa, Lonza AAD-10015). Directly after
50 nucleofection, 100,000 cells were seeded in each well of a six wells plate seeded beforehand
51 with mitomycin C BJ-1. DMEM GlutaMAX (Life Technologies) supplemented with 10% fetal
52 calf serum (Life Technologies), 1X MEM non-essential amino acids 100X (Life Technologies)
53 was used. Tissue culture plates were kept at 37°C in a water-saturated atmosphere and 5%
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 CO2. At day 1, the medium was changed and supplemented with 10 UI/mL gentamycin (Life
4 Technologies). At day 4, iPSc medium is added during 10 days and changed every other day.
5
6 The iPSc colonies have to be picked about 2 - 5 weeks post nucleofection. Quality controls
7 and the iPSc differentiation assessments were made after passage 20.
8
9

10
11
12 **Motor neuron differentiation.** iPSc colonies were collected as small clusters after
13 collagenase IV treatment. Clusters were resuspended in 60 mm ultra-low attachment dishes
14 (Corning Incorporated, New York, USA), in iPSc medium without FGF2. Three days later,
15 embryoid bodies (EBs) were placed in differentiated medium (DMEM/F12 (Life
16 Technologies), 100 ng/mL FGF2 (Peprotech) and 10 ng/mL Nogging (Peprotech)). After
17 1 week, EBs were seeded on 20 µg/ml poly-L-ornithine (Sigma) and 30 µg/ml laminin
18 (Invitrogen) in neural induction medium up to the apparition of rosettes. Rosettes were
19 gently manually removed and dissociated with accutase (Sigma). Then singles cells were
20 seeded on 20 µg/ml poly-L-ornithine (Sigma) and 30 µg/ml laminin (Invitrogen) dish at
21 100,000 cells per cm² in order to generate neuronal precursor (NP). The neural induction
22 medium was supplemented at this step for 2 to 6 weeks to aid neuronal survival. In order to
23 generate motor neurons, NP were dissociated and seeded at 10,000 cells per cm².
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

34 **Motor neuron characterization**

35
36 **Immunocytochemical stainings** were performed to characterize neuronal differentiation.
37 Motor neurons were fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier,
38 France) for 15 minutes at room temperature and rinsed during 5 min 3 times with DPBS 1X.
39 The cells were permeabilized with 0.2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier,
40 France) and 3% BSA (bovine serum albumin) in DPBS 1X for 1h at room temperature. Cells
41 were rinsed and then incubated with 3% BSA and primary antibodies overnight at 4°C: For
42 pluripotency, dilution 1/100 : Nanog, Rabbit poly IgG (Abcam), Oct 3/4, Mouse Mono IgG2b
43 (Santa Cruz Biotech), Sox2, Rabbit Poly IgG (Chemicon); For spontaneous differentiation in
44 three germinal layers: Pax6, Rabbit Poly IgG (Covance), αSMA, Mouse IgG2A (DAKO), Sox17,
45 Goat IgG (R&D); for neurons and motor neurons staining: Islet 1, Mouse Mono IgG (DSHB),
46 Islet ½, Mouse Mono IgG (DSHB) and PGP9.5, Rabbit (Ultraclone). Dilution factor was 1/100
47 for all of these primary antibodies except for αSMA and PGP9.5, used at 1/500. Cells were
48 subsequently labeled with the appropriate fluorescently-tagged secondary antibodies Alexa
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 fluor 488 (green fluorescence) and Alexa fluor 594 (red fluorescence) (Molecular Probes,
4 Eugene, OR, USA). Cells were then counterstained with DAPI (4',6'-Diamidino-2-Phénylindole
5 dihydrochloride, Sigma-Aldrich) to stain nuclei at 1 mg/mL. Cells were observed with a
6 fluorescence microscope (Leica DM IRB, Nanterre, France). Pictures were obtained with the
7 NIS Element BR software, and they were treated with image J software (NIH, USA).
8
9

10
11
12
13 **Oil Red O Staining.** Cells in neural differentiation were fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma-
14 Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) for 15 minutes at room temperature (RT) and rinsed
15 during 5 min 3 times with DPBS 1X. Plates were stained with 0.5% Oil red O (Sigma-Aldrich,
16 Saint-Quentin Fallavier, France) in DPBS 1X for 20 min at RT and rinsed during 5 min 3 times
17 with DPBS 1X. Stained differentiated cells were observed and imaged with a Nikon
18 microscope, and a digital camera Nikon D90®.
19
20
21
22
23

24 25 26 **Results**

27 **Induced pluripotent stem cell lines generation**

28
29 Thanks to non-integrative plasmids bearing Oct4, Sox2, Klf4 and lMyc, we generated iPSc cells
30 from dermal fibroblasts (DFs) obtained from skin biopsies of a healthy person and of a
31 patient carrying the homozygous nonsense p.Gln163* mutation in *GDAP1*. Fifteen days after
32 nucleofection, DFs changed their morphology to finally form colonies with a typical
33 morphology (Fig 1A and 1M). About forty colonies of each condition were selected for
34 further expansion but only four clones from control's cells developed and three for the
35 patient. After 6 months of amplification, all of these colonies were able to form embryoid
36 bodies (Fig 1B and 1N) and to be differentiated into cell types from all three embryonic germ
37 layers following a spontaneous differentiation protocol (Fig 1C, E, F, G and 1O, Q, R, S). These
38 cells also expressed pluripotency markers including Nanog (not shown), Oct3/4 and Sox2 (Fig
39 1I to L and U to X), were positive for alkaline phosphatase (Fig 1D and 1P) and had normal
40 karyotypes (Fig. 1H and 1T). According to all quality controls, reprogrammed dermal
41 fibroblasts have the same properties than embryonic stem cells and could be called iPSc. At
42 this step, no difference was observed between control and patient cells.
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53

54 55 56 **Lipid droplets observation in patient while generating neuronal progenitors**

57
58
59
60

1
2
3 In order to generate neuronal progenitors (rosettes), embryoid bodies (IPSc colonies) were
4 cultured in neural induction media. After 5 days, control and patient cells began to grow up
5 (Fig 2A and 2B). At this step, the first difference between the control cells and the patient
6 was observed. For the patient, some cells appeared to be filled with vesicles, while it was not
7 observed in control. In order to characterize more precisely these vesicles, we performed
8 electron microscopy experiments and observed that these vesicles were homogenous
9 without any inner structure, like would be lipid droplets (Fig 2D, patient versus fig 2C,
10 control). In order to test this possibility, we used Oil Red O which stained these lipid droplets
11 in red (Fig 2E and 2F), confirming the presence of lipid in the patient's cells but not in control
12 while generating neuronal progenitors.
13
14
15
16
17
18
19

20 21 22 **Weaker rosettes creation efficiency in patient**

23 In addition to the lipid droplets observation, we evaluated that the rate of rosettes was
24 lower in patient dishes. While around 25 rosettes were obtained in a 9,6 cm² dish for
25 control, only 6 rosettes were obtained for the patient, suggesting a four times fewer
26 efficiency to generate neuronal progenitors in patient compared with control. However
27 despite the fact that the number was weaker, the structure of the patient's rosettes seems
28 to be similar (not shown). These rosettes were then used to generate spinal motor neurons.
29
30
31
32
33
34
35

36 37 **Spinal motor neurons generation**

38 Rosettes were then gently manually removed and dissociated. Singles cells were seeded on
39 dish at 100,000 cells per cm² and cultured in a neural induction medium in order to generate
40 neuronal precursor (NP). The numbers of NP obtained from a rosette's patient was
41 approximately the same than the control. After this step, NPs were amplified and motor
42 neurons became progressively mature (Fig 3). At day 33, all cells were differentiated into
43 neurons (fig 3C and 3G) in control but also in patient. At this stage, only 10% were already
44 differentiated into spinal motor neurons (Islet positives, Fig 3B and 3F). Two weeks later (day
45 50), the rate of motor neurons increased up to 60% due to a maturation process (Fig 3J and
46 3N). No morphological difference was observed at this level between control and patient
47 differentiation.
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Discussion

In this study, we created a new model to study the axonal neuropathy induced by a nonsense mutation in *GDAP1*, by generating iPSc and thereafter spinal motor neurons from a patient and a control. While no difference was observed during the iPSc generation, we observed the presence of specific vesicles in patient versus control and we showed that these vesicles are lipid droplets. We also observed at this stage that iPSc from *GDAP1* patient had more difficulties to generate rosettes than control iPSc. Starting from these rosettes, we were then able to create neurons and then spinal motor neurons in patient and in control.

The origin of these lipid droplets in the patient cells is unclear. It could be hypothesized that lipids are less used as energy providers than glucids in a person suffering from this mitochondria dysfunction. Subsequently, it could also be hypothesized that the acyl carnitine transferase system is less efficient if *GDAP1* is mutated. One can also think that *GDAP1* mutated mitochondria are more prone to store lipids than to use lipids as energy provider. On the other hand, Mitochondrial-Associated ER Membrane (MAM) plays a key role in cellular homeostasis, in particular in phospholipid transport, calcium homeostasis or lipid metabolism. Area-Gomez showed in Parkinson disease a dysfunction in MAM, resulting in lipid droplets observation (Area-Gomez *et al.* 2012). Interaction dysfunction in MAM while generating neuronal progenitors could also be hypothesized to explain the presence of lipid droplets in *GDAP1* patient's cells versus control cells. In any case, precisely exploring and explaining this lipid droplets formation could probably be of some help in explaining the pathophysiology of *GDAP1* mutations.

The decrease in rosette formation in the patient's cells is also intriguing, as it has not been reported that the *GDAP1* patients had a lower number of peripheral neurons than non-affected persons. One could hypothesize that a subtle mitochondria dysfunction is able to noticeably decrease the fragile process of cell differentiation by decreasing the availability of energy rich molecules (ATP mostly). However, this is pure speculation at this stage.

To our knowledge, models of iPSc cells for axonal CMT patients have been developed only for NEFL and MFN2 gene mutations (Saporta *et al.* 2015). Our work seems complementary to this study as it provides another model of axonal CMT. In all cases, energy metabolism seems a key feature in the pathophysiology of these cells.

Alternatively, animal models have been proposed to the iPSc. Barneo-Munoz *et al.* developed a *Gdap1* KO model in mice (Barneo-Muñoz *et al.* 2015) while Lopez del Amo

1
2
3 developed *Gdap1* mutated drosophila (López Del Amo *et al.* 2015). Although, these models
4 provide some insights in the function of *GDAP1*, they are not closely mimicking the human
5 pathophysiology. Unlike these models, we believe that models derived from human iPSc will
6 be more likely to mimic the human pathophysiology and therefore be good models for drug
7 testing. Our model is currently been studied for electrophysiology, protein expression and
8 gene expression. It will be used thereafter in drug tests meant to modify the sick phenotype
9 toward the healthy one.
10
11
12
13
14

15 16 17 **Acknowledgements**

18 This work was supported by grants from Région Limousin (P-A. FAYE) and CHU Limoges. We
19 also thank I-Stem institute (INSERM/UEVE UMR 861, AFM, Genopole, Evry, France) for the
20 formation they offered to help us to generate our iPSc.
21
22
23
24

25 26 **Author contributions**

27 P.A.F was the primary experimentalist, contributed to the study design and writing of the
28 manuscript. N.V, L.R. and S.B. contributed experimental work. B.F., F.S and A.S conceived
29 and directed experiments and wrote the manuscript.
30
31
32
33

34 35 **Legends:**

36
37
38 **Figure 1: iPSc generated from a healthy person (A to L) and from a patient with axonal**
39 **Charcot–Marie–Tooth disease (M to X).** Dermal fibroblasts were reprogrammed with the
40 Yamanaka’s cocktail (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc) into induced pluripotent stem cells (A and M).
41 These cells could form embryoid bodies (B and N) and, after seeding and growth (C and O),
42 cells could spontaneously differentiate into cells from the three germ layers like mesoderma
43 (E and Q), ectoderma (F and R) and endoderma (G and S). These iPSc had a normal karyotype
44 (H and T) and were positives for alkaline phosphatase (D and P). These cells also expressed
45 pluripotency markers (I to L and U to X). Scale bar: 50 μ m
46
47
48
49
50
51
52

53
54 **Figure 2: Lipid droplets in patient cells versus control cells observed 5 days after neural**
55 **induction.** (A, B) Photonic observation in control (A) and in patient (B) cells. (C, D) Electron
56 microscopy observation in control (C) and in patient (D) cells (N=Nucleus, M=Mitochondria,
57
58
59
60

1
2
3 LD=Lipid Droplet). (E, F) Oil Red O staining: lipid droplets were evidenced in patient cells (E)
4 but not in control cells (F). Scale bar = 50 μm (A, B and E, F); scale bar = 5 μm (C, D).
5
6
7

8 **Figure 3: Spinal motor neuron generation:** Immunocytochemistry was performed at d33 and
9 d50 of differentiation process. Nuclei were counterstained with DAPI (blue), neurons with
10 PGP9.5 (green) and motor neurons with an Islet cocktail (red). Scale bar = 50 μm
11
12
13
14
15
16

17 References

- 18
19
20 Area-Gomez E., Carmen Lara Castillo M. Del, Tambini M. D., Guardia-Laguarta C., Groof A. J.
21 C. de, Madra M., Ikenouchi J., et al. (2012) Upregulated function of mitochondria-
22 associated ER membranes in Alzheimer disease. *EMBO J.* **31**, 4106–23.
23
24 Barneo-Muñoz M., Juárez P., Civera-Tregón A., Yndriago L., Pla-Martin D., Zenker J., Cuevas-
25 Martín C., et al. (2015) Lack of GDAP1 induces neuronal calcium and mitochondrial
26 defects in a knockout mouse model of charcot-marie-tooth neuropathy. *PLoS Genet.* **11**,
27 e1005115.
28
29 Baxter R. V, Othmane K. Ben, Rochelle J. M., Stajich J. E., Hulette C., Dew-Knight S., Hentati
30 F., et al. (2002) Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 is mutant in
31 Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/8q21. *Nat. Genet.* **30**, 21–2.
32
33
34 Chambers S. M., Fasano C. a, Papapetrou E. P., Tomishima M., Sadelain M., Studer L. (2009)
35 Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD
36 signaling. *Nat. Biotechnol.* **27**, 275–80.
37
38 Cuesta A., Pedrola L., Sevilla T., García-Planells J., Chumillas M. J., Mayordomo F., LeGuern E.,
39 Marín I., Vilchez J. J., Palau F. (2002) The gene encoding ganglioside-induced
40 differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A
41 disease. *Nat. Genet.* **30**, 22–5.
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55 Dyck P. J. (1968) Lower Motor and Primary Sensory Neuron Diseases With Peroneal
56 Muscular Atrophy. *Arch. Neurol.* **18**, 603.
57
58
59
60

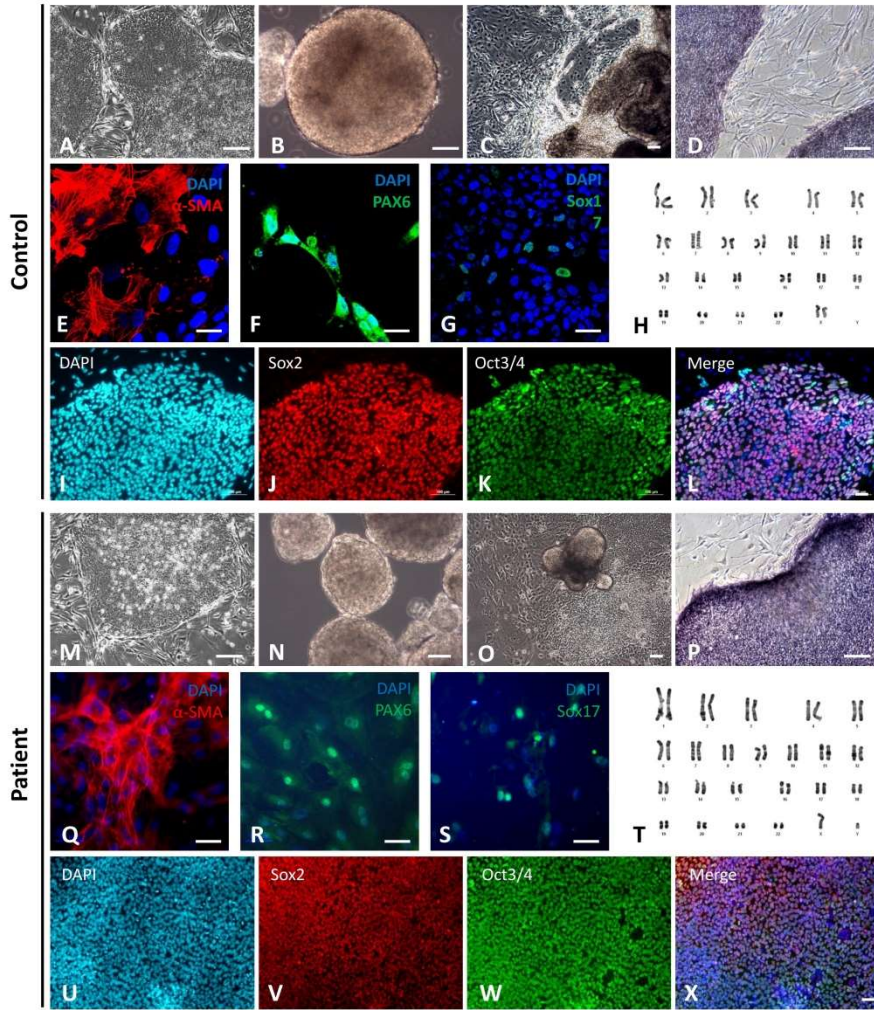
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- Harding A. E., Thomas P. K. (1980) THE CLINICAL FEATURES OF HEREDITARY MOTOR AND SENSORY NEUROPATHY TYPES I AND II. *Brain* **103**, 259–280.
- Hu B.-Y., Zhang S.-C. (2009) Differentiation of spinal motor neurons from pluripotent human stem cells. *Nat. Protoc.* **4**, 1295–304.
- Huber N., Guimaraes S., Schrader M., Suter U., Niemann A. (2013) Charcot-Marie-Tooth disease-associated mutants of GDAP1 dissociate its roles in peroxisomal and mitochondrial fission. *EMBO Rep.* **14**, 545–52.
- Lancaster M. a., Knoblich J. a. (2014) Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. *Science (80-.).* **345**, 1247125–1247125.
- Liu H., Nakagawa T., Kanematsu T., Uchida T., Tsuji S. (1999) Isolation of 10 differentially expressed cDNAs in differentiated Neuro2a cells induced through controlled expression of the GD3 synthase gene. *J. Neurochem.* **72**, 1781–90.
- López Del Amo V., Seco-Cervera M., Garcia-Giménez J. L., Whitworth A. J., Pallardó F. V., Galindo M. I. (2015) Mitochondrial defects and neuromuscular degeneration caused by altered expression of Drosophila Gdap1: implications for the Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 21–36.
- Nelis E., Broeckhoven C. Van, Jonghe P. De, Löfgren A., Vandenbergh A., Latour P., Guern E. Le, et al. (1996) Estimation of the mutation frequencies in Charcot-Marie-Tooth disease type 1 and hereditary neuropathy with liability to pressure palsies: a European collaborative study. *Eur. J. Hum. Genet.* **4**, 25–33.
- Niemann A., Ruegg M., Padula V. La, Schenone A., Suter U. (2005) Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *J. Cell Biol.* **170**, 1067–78.
- Noack R., Frede S., Albrecht P., Henke N., Pfeiffer A., Knoll K., Dehmel T., et al. (2012) Charcot-Marie-Tooth disease CMT4A: GDAP1 increases cellular glutathione and the mitochondrial membrane potential. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 150–62.

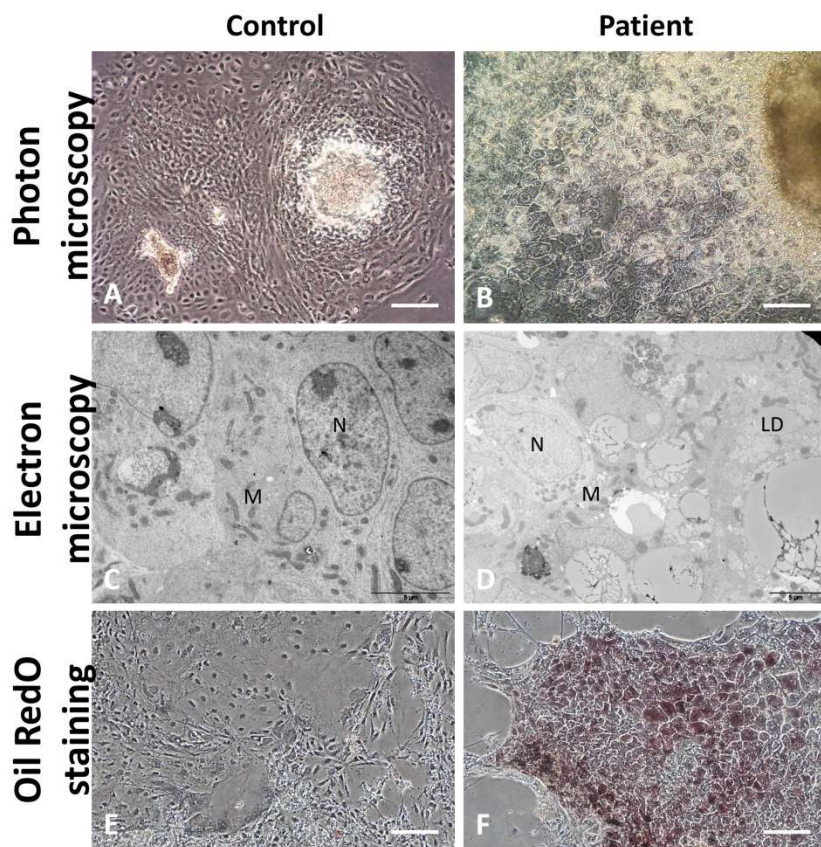
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- Okita K., Matsumura Y., Sato Y., Okada A., Morizane A., Okamoto S., Hong H., et al. (2011) A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat. Methods* **8**, 409–12.
- Pla-Martín D., Rueda C. B., Estela A., Sánchez-Piris M., González-Sánchez P., Traba J., la Fuente S. de, et al. (2013) Silencing of the Charcot-Marie-Tooth disease-associated gene GDAP1 induces abnormal mitochondrial distribution and affects Ca²⁺ homeostasis by reducing store-operated Ca²⁺ entry. *Neurobiol. Dis.* **55**, 140–51.
- Saporta M. a, Dang V., Volfson D., Zou B., Xie X. S., Adebola A., Liem R. K., Shy M., Dimos J. T. (2015) Axonal Charcot-Marie-Tooth disease patient-derived motor neurons demonstrate disease-specific phenotypes including abnormal electrophysiological properties. *Exp. Neurol.* **263**, 190–9.
- Takahashi K., Okita K., Nakagawa M., Yamanaka S. (2007) Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat. Protoc.* **2**, 3081–9.
- Takahashi K., Yamanaka S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663–76.
- Thomas P. K., Calne D. B. (1974) Motor nerve conduction velocity in peroneal muscular atrophy: evidence for genetic heterogeneity. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **37**, 68–75.
- Timmerman V., Strickland A. V., Züchner S. (2014) Genetics of Charcot-Marie-Tooth (CMT) Disease within the Frame of the Human Genome Project Success. *Genes (Basel)*. **5**, 13–32.

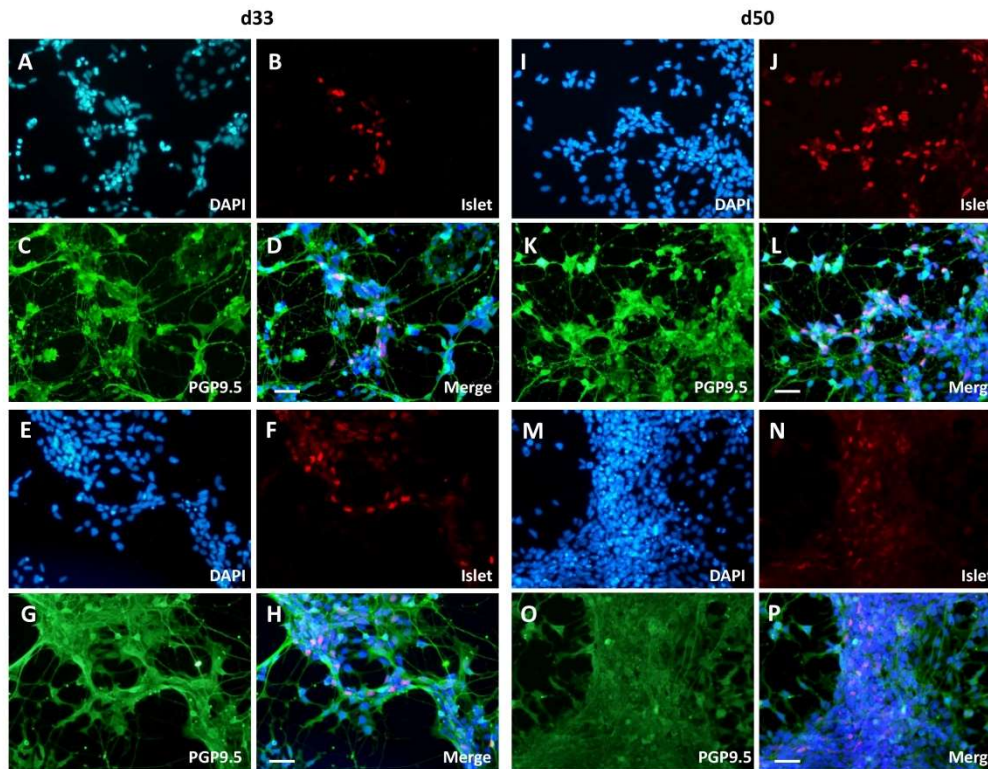
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



3.3 Conclusion

Bien que des corps embryoides (EB) puis des iPSc ont pu être obtenus tant chez la personne saine que chez le patient, leurs croissances a présenté des différences qui pourraient s'avérer intéressantes dans l'explication des mécanismes physiopathologiques de la mutation de GDAP1. De toute évidence, plusieurs études spécifiques seront nécessaires pour expliquer ces phénomènes cellulaires (stockage lipidique et difficulté à créer des rosettes).

4 Différences morphométaboliques des cellules de patients vs. cellules de témoin: altération des mitochondries et du réseau mitochondrial

4.1 Introduction

La création d'un modèle cellulaire iPSc-MN pour une neuropathie périphérique d'origine génétique touchant le gène *GDAP1* est une première étape pour la création d'autres modèles qui seront eux aussi intéressants, nous l'espérons, pour la compréhension des mécanismes pathogènes. En effet, même si le gène *GDAP1* n'est pas le plus fréquemment retrouvé dans les neuropathies CMT2 (c'est plutôt *MFN2*), il reste très intéressant par le flou qui entoure sa fonction exacte et par ses modalités d'action. Ce gène code pour une protéine enchâssée dans la membrane externe mitochondriale, pouvant être responsable de la fission mitochondriale, mais aussi de nombreux autres processus biologiques comme nous l'avons rappelé dans la Partie I – Etude bibliographique.

Nous avons donc tenté de mieux comprendre le rôle physiologique de *GDAP1* par différentes expériences qui ont été réalisées avec les cellules iPSc de contrôle et de patient. Ces expériences ont fait appel à des méthodes d'électrophysiologie et d'imagerie en temps réel, réalisées en collaboration avec Rod O'Connord et Sergii Romanenko (BioEPIX LABEX Xlim, Limoges, France), de microscopie confocale, réalisée en collaboration avec Claire Carrion (Plateforme Cytométrie Imagerie Mathématiques, IFR 145 GEIST de Limoges), et de microscopie électronique, réalisée en collaboration avec Laurence Richard (EA6309 MMNP / Service de Neurologie CHU Limoges). Nous avons présenté ces expériences dans l'Article 4.

4.2 Article 4

Title: *In vitro* pathogenic mitochondrial defect accessed thanks to iPS cells derived from Charcot-Marie-Tooth patient

En préparation

***In-vitro* pathogenic mitochondrial defect accessed thanks to iPSc cells derived from Charcot-Marie-Tooth patient**

Pierre-Antoine Faye¹, Rodney P. O'Connor², Sergii Romanenko², Nicolas Védrenne³, Laurence Richard^{1,4}, Sylvie Bourthoumieu^{1,5}, Franck Sturtz^{1,6}, Benoît Funalot^{7,8} and Anne-Sophie Lia^{1,6}

1- Univ. Limoges, Maintenance myelinique et neuropathies peripheriques, EA6309, F-87000 Limoges, France,

2- Univ. Limoges, CNRS, XLIM, UMR 7252, F-87000 Limoges, France.

3- Univ. Limoges. Homeostasie cellulaire et pathologies, EA 3842, F-87000 Limoges, France,

4- CHU Limoges, Service de Neurologie, F-87000 Limoges, France,

5- CHU Limoges, Service de Cytogénétique, F-87000 Limoges, France,

6- CHU Limoges, Service de Biochimie et Génétique Moléculaire, F-87000 Limoges, France

7- CHU Henri-Mondor, Département de Génétique, F-94000 Créteil, France,

8- Inserm U955-E10, Université Paris-Est-Créteil, F-94000 Créteil, France.

Charcot-Marie-Tooth disease is the most predominant hereditary peripheral neuropathy (1/2500). More than 80 genes are currently known to be responsible for this disease which can be classified into two subgroups: the demyelinating subgroup (CMT1) and the axonal group (CMT2), respectively due a duplication of *PMP22* gene (70% of the CMT1) and punctual mutations in *MFN2* or *GDAP1* genes (20 % of the CMT2). The proteins produced by these genes are located in the mitochondrial membrane and participate in mitochondrial fusion/fission contributing then to the maintenance and function of the mitochondrial network. While representative models have been established to better understand demyelination observed in CMT1 subgroup, few models have been performed for axonal and more specifically *GDAP1* form of the disease. To investigate the molecular mechanisms involved in axonal CMT, we produced iPSc containing homozygous *GDAP1* nonsense mutation starting from patient dermal fibroblast cells and we differentiated them into motor neurons. In contrast to other models, such as human fibroblasts or animal models, our motor neurons derived from human iPSc showed exactly the same mitochondrial morphological defect than those observed in neuronal biopsies of human CMT patients and provide then a good model for further investigation and drug screening.

GDAP1 gene was described in 1999 (Liu *et al.* 1999) and it encodes a mitochondrial outer membrane protein which is expressed predominantly in neurons and which is suspected

1

to be involved in mitochondrial fission (Niemann *et al.* 2005). Mitochondria form a more or less complex network which depends on the cell type. This network is regulated by a dynamic balance between fusion and fission (Karbowski and Youle 2003). These mechanisms determine the number, length and diameter of the mitochondria. In CMT patients with recessive autosomal GDAP1 mutations, presence of small, round and aggregated mitochondria have been described in longitudinal nerve of sural nerve fiber by electronic microscopy (Tazir *et al.* 2014). In order to study GDAP1 function more precisely, we generated dermal fibroblasts cultures starting from a homozygous patient carrying the *GDAP1* nonsense mutation p.Gln163*. Dermal fibroblasts (DFs) were obtained according to patient signed agreement from skin biopsies. The patient is a 23 years old man, currently using a wheelchair. The first signs of the disease appeared during his teenage, with motor difficulties in lower then in upper limbs, followed by sensitive troubles. Hands are now also affected (weakness and dysfunction). No signal was obtained when muscles were stimulated during electromyogram (EMG). We studied mitochondrial network by immunochemistry in this dermal fibroblast and in those of a control patient without GDAP1 mutation. No difference was observed in the mitochondrial network using this cellular type (Fig 1A and B). However GDAP1 being expressed more specifically expressed in neurons and more precisely in the peripheral part of the neurons, we decided to generate hiPSc starting from these DF culture and to differentiate then into spinal motor neurons.

According to Yamanaka protocol, we generated iPScells using non-integrative plasmids (Oct4, Sox2, Klf4 and l-Myc) to reprogram our dermal fibroblasts (DFs) (Okita *et al.* 2011). We differentiated then the iPSc into spinal motor neurons following the protocol we previously described (Ref method PAF). We generated then around 70% of spinal motor neurons (islets positive, data not shown, ref JNC PAF) and studied then more precisely. The morphological aspect of the cells seems to be similar between control and patient cells except for the processes which seem more long and abundant for control (Fig 1 D and C). However, when stained with TOM20 antibodies, we observed, in the soma of the cell, a particular fractionated pattern of the mitochondrial network in patient motor neurons compared to the normal network observed in control motor neurons (Fig 1F and E). The mitochondria seem to be smaller and not linked to each other, as described in human nerve biopsies. This result, not observed in dermal fibroblasts, shows the importance of the cellular type to mimic physiopathology of the GDAP1 Charcot-Marie-Tooth disease. In addition, we focused on the processes of these motor neurons and pointed out that the number of mitochondria seems to be less important in patient processes than in control ones, suggesting that our model is able

2

to mimic trafficking disturbance of mitochondria suspected in GDAP1 patient (Fig 1H and G).

To confirm these observation, we performed electronic microscopy on dermal fibroblasts and motor neurons derived from iPSc from the GDAP1 patient and the control. As expected we observed normal mitochondria in control and patient fibroblast (Fig 2A,C and B,D). Mitochondria presented a typical distribution in the cell (Fig2A and B) and the crests inside mitochondria seem to be correctly organized (Fig 2C and D). Interestingly, in GDAP1 patient motor neurons, mitochondria have a disturbed phenotype. Most of them are small and spherical and they are aggregated together like it has been reported in GDAP1 patient nerve biopsy. When focusing on these mitochondria, several of them presented abnormal crests and membrane. In contrast, normal motor neurons present normal mitochondria (fig 2E), with normal crest and membrane (Fig 2G).

Experiments were performed to study sodium channel kinetics. Electrophysiological recordings were made from iPSc-derived spinal motor neurons from control and GDAP1 (CMT4A). Patient motor neurons had higher sodium current compared to control suggesting that they were in a hyperexcitable state.

To our knowledge this model is the first one mimicking the phenotype observed in human nerve biopsy: small and round mitochondria. For instance, while *Gdap1* knockout mouse model created by Barneo-Munoz et al (Barneo-Muñoz *et al.* 2015) reproduced the clinical phenotype of axonal neuropathy, it surprisingly exhibits larger mitochondria. The same observation was done in *Gdap1* altered expression on *Drosophila* (López Del Amo *et al.* 2015). These differences are difficult to explain and could be due to species specificities. As we also showed it in our results, cell types is very important to reproduce mitochondrial altered phenotype observed in GDAP1 patient. While no differences were observed in dermal fibroblasts, motor neurons derived from hiPSc presented the mitochondrial defect observed in patient. These results suggest that GDAP1 defect is expressed specifically in motor neurons. It could be then interesting to study more precisely our model. Mitochondrial trafficking suspected to be disturbed in CMT neurons cells will be examined precisely by time laps analyses. Fusion and fission mechanisms will be also possible to study more efficiently *in vivo* thanks to these human motor neurons derived from hiPSc. We hope our model will be helpful to a better understanding of the mitochondria role in Charcot-Marie-Tooth disease and that it could be also useful to test drugs in order to develop efficient treatment for Charcot-Marie-Tooth patients.

Methods

Patients. The experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject. The study conforms with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki). Dermal fibroblasts (DFs) were obtained according to patients' signed agreements from skin biopsies of a healthy person and of a homozygous patient carrying *GDAP1* nonsense mutation. The patient is a 23 years old man, currently using a wheelchair. The first signs of the disease appeared during his teenage, with motor difficulties in lower then in upper limbs, followed by sensitive troubles. Hands are now also affected (weakness and dysfunction). No signal was obtained when muscles were stimulated during electromyogram (EMG). The un-affected person is a 56 years old woman without mutation in *GDAP1* gene.

iPScells generation. According to I-Stem procedure (INSERM/UEVE UMR 861, AFM, Genopole, Evry, France), 3 plasmids (Plasmid #6 pCXLE-hOCT3/4 shp53-F Addgene, Plasmid #7 pCXLE-hSK Addgene, Plasmid #8 pCXLE-hUL Addgene) at 1 µg/mL were used to reprogram fibroblasts into iPSc by using Nucleofector II device (Amaxa, Lonza AAD-10015). Directly after nucleofection, 100,000 cells were seeded in each well of a six wells plate seeded beforehand with mitomycin C BJ-1. DMEM GlutaMAX (Life Technologies) supplemented with 10% fetal calf serum (Life Technologies), 1X MEM non-essential amino acids 100X (Life Technologies) was used. Tissue culture plates were kept at 37°C in a water-saturated atmosphere and 5% CO₂. At day 1, the medium was changed and supplemented with 10 UI/mL gentamycin (Life Technologies). At day 4, iPSc medium is added during 10 days and changed every other day. The iPSc colonies have to be picked about 2 - 5 weeks post nucleofection. Quality controls and the iPSc differentiation assessments were made after passage 20.

Motor neurons differentiation. iPSc colonies were collected as small clusters after collagenase IV treatment. Clusters were resuspended in 60 mm ultra-low attachment dishes (Corning Incorporated, New York, USA), in iPSc medium without FGF2. Three days later, embryoid bodies (EBs) were placed in differentiated medium (DMEM/F12 (Life Technologies), 100 ng/mL FGF2 (Peprotech) and 10 ng/mL Nogging (Peprotech)). After 1 week, EBs were seeded on 20 µg/ml poly-L-ornithine (Sigma) and 30 µg/ml laminin (Invitrogen) in neural induction medium up to the apparition of rosettes. Rosettes were gently

4

manually removed and dissociated with accutase (Sigma). Then single cells were seeded on 20 µg/ml poly-L-ornithine (Sigma) and 30 µg/ml laminin (Invitrogen) dish at 100,000 cells per cm² in order to generate neuronal precursor (NP). The neural induction medium was supplemented at this step for 2 to 6 weeks to aid neuronal survival. In order to generate motor neurons, NP were dissociated and seeded at 10,000 cells per cm².

Immunocytochemical stainings. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) for 15 minutes at room temperature and rinsed during 5 min 3 times with DPBS 1X. The cells were permeabilized with 0.2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) and 3% BSA (bovine serum albumin) in DPBS 1X for 1h at room temperature. Cells were rinsed 3 times with DPBS 1X, and then cells were incubated with 3% BSA and primary antibodies overnight at 4°C (Tom 20, Santa Cruz Biotech, Rabbit polyclonal IgG, 1:100 (mitochondrial network) and Tuj1, R&D, Mouse monoclonal IgG, 1:500 (neuronal)). Cells were subsequently labeled with the appropriate fluorescently-tagged secondary antibodies Alexa fluor 488 (green fluorescence) and Alexa fluor 594 (red fluorescence) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). DAPI (4',6'-Diamidino-2-Phénylindole dihydrochloride, Sigma-Aldrich) was used to label nuclei at 1mg/mL. Then, cells were observed with a fluorescence microscope (Leica DM IRB, Nanterre, France). Pictures were obtained with the NIS Element BR software, and they were treated with Image J software (NIH, Bethesda, Maryland, USA).

Electronic microscopy. Briefly, cells were fixed in 2.5% glutaraldehyde and osmified for 30 minutes in 1% OsO₄ (Euromedex). Cells were then dehydrated in graded alcohols and embedded in Epon 812-. Ultra-thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and observed with a Jeol 1011 electron microscope. (JEM-1011; JEOL Ltd., Tokyo, Japan) in the anatomy pathology department at CHU Dupuytren, Limoges, France.

Electrophysiology. The Petri dish with cells was filled with custom made saline (Live Cell Imaging Solution, Life technologies,) so that cells were covered by approximately 1.5-mm-thick fluid layer and placed under the inverted microscope (IX70, Olympus); the total amount of saline was about 2 ml. Cells were illuminated with microscope upright condenser and 4x objective was used for distinguishing the neuronal shapes. For electrophysiological recording patch electrodes were fabricated by pulling borosilicate capillary glass (1.5/0.75 mm OD/ID,

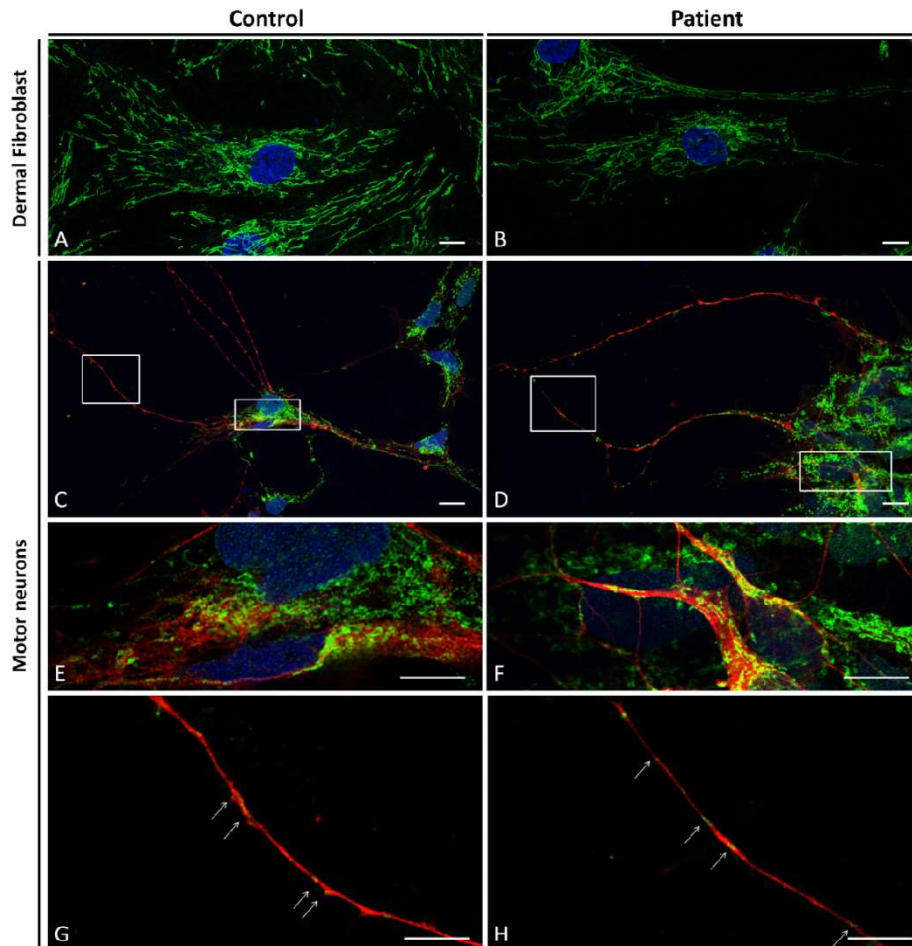
5

1B150F-4, WPI, Sarasota, FL, USA) using a micropipette puller (P-1000, Sutter Instrument Company, Novato, CA, USA) and microelectrode filled with intracellular solution has resistance in the range of 3-4 MOhm. The electrodes were filled with solution of next composition: 140 mM K-gluconate, 10 mM HEPES, 2 mM Mg-ATP, 1.1 EGTA with pH adjusted to 7.3 with KOH., for sodium channel recording solution composition was: 135 mM Cs-gluconate, 5 mM CsF, 10 mM HEPES, 2 mM Mg-ATP, 1.1 EGTA with pH adjusted to 7.3 with CsOH. All electrophysiological recordings were performed using a microelectrode amplifier (PC-ONE Patch/Whole Cell Clamp, CORNERSTONE Series, DAGAN, USA) in the voltage-clamp mode with a holding potential of -70 mV in Whole-Cell configuration. Acquired trans -membrane current alterations were online digitized at 20 kHz after passing through a low-pass Bessel filter setting of 10 kHz using data acquisition hardware (DigiData 1440A; Molecular Devices) and software (Whole Cell Electrophysiology Analysis Program V4.8.2, (c) John Dempster, University of Strathclyde 1996-2014). Leak current, stray capacitance were instrumentally pre-compensated, residual capacitance and related artifacts were subtracted out using the P/N method. Electrophysiological recordings were performed using the Stimulus Protocol mode, and processed offline with the data analysis software (Whole Cell Electrophysiology Analysis Program V4.8.2, (c) John Dempster, University of Strathclyde 1996-2014 and OriginPro 8). Whole-cell currents were measured in response to voltage ramp command protocol from -80 to 50 mV (with rate of voltage augmentation 0.65mV/msec).

Acknowledgements

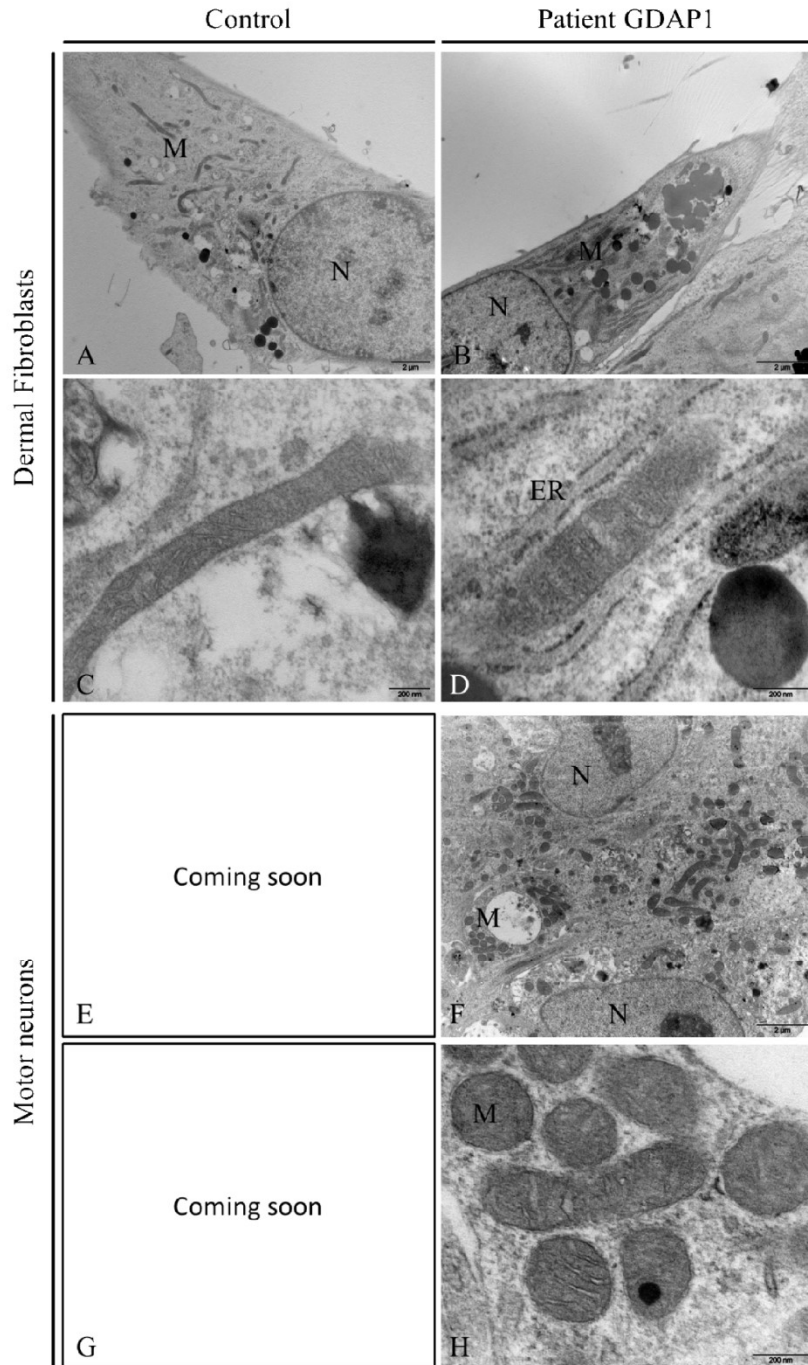
This work was supported by grants from Région Limousin (P-A. Faye, A-S Lia, B Funalot) and CHU Limoges, France. The authors also thank I-Stem institute (INSERM/UEVE UMR 861, AFM, Genopole, Evry, France) and The AFM-Téléthon institute for the formation they offered to help us to generate our hiPSc. The authors kindly thank Claire Carrion (Confocal microscopy facility, University of Limoges, France) for confocal microscopy analysis.

Figure 1: Immunocytochemical stainings



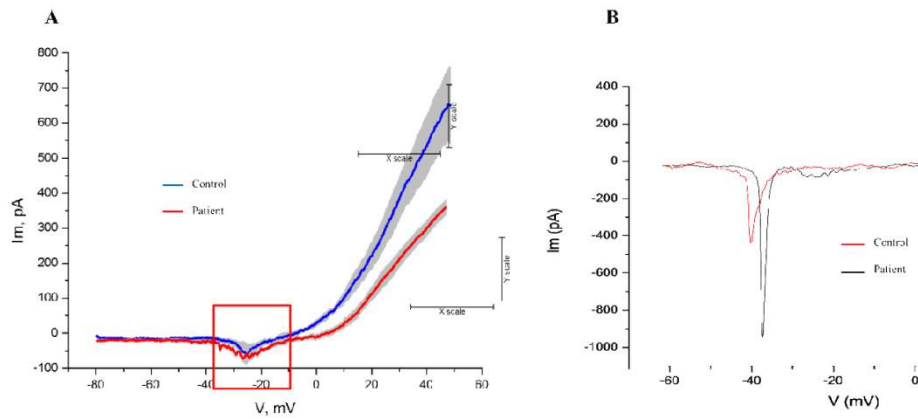
Mitochondrial network is labeled with Tom 20 (green) and is observed on dermal fibroblasts from control (A) and patient (B). Motor neurons are labeled with Tuj 1 (red) and the mitochondrial network with Tom 20 (green) for the control (C, E, G) and patient (D, F, H) at various magnifications. White square on picture C and D indicate high magnifications areas (E, G) and (F, H) respectively. White arrows indicate mitochondria in processes. Scale bar = 50 μ m

Figure 2: Electronic microscopy



Electronic microscopy of dermal fibroblasts from control (A, C) and patient (B, D) at various magnifications and motor neurons (E, G) and (F, H) respectively. M: mitochondria, N: Nucleus; ER: endoplasmic reticulum

Figure 3: Electrophysiology



Electrophysiological recordings from spinal motor neurons derived from control and patient iPSc.

Bibliography

- Barneo-Muñoz M., Juárez P., Civera-Tregón A., Yndriago L., Pla-Martin D., Zenker J., Cuevas-Martin C., et al. (2015) Lack of GDAP1 induces neuronal calcium and mitochondrial defects in a knockout mouse model of charcot-marie-tooth neuropathy. *PLoS Genet.* **11**, e1005115.
- Karbowski M., Youle R. J. (2003) Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ.* **10**, 870–80.
- Liu H., Nakagawa T., Kanematsu T., Uchida T., Tsuji S. (1999) Isolation of 10 differentially expressed cDNAs in differentiated Neuro2a cells induced through controlled expression of the GD3 synthase gene. *J. Neurochem.* **72**, 1781–90.
- López Del Amo V., Seco-Cervera M., García-Giménez J. L., Whitworth A. J., Pallardó F. V., Galindo M. I. (2015) Mitochondrial defects and neuromuscular degeneration caused by altered expression of *Drosophila* Gdap1: implications for the Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 21–36.
- Niemann A., Ruegg M., Padula V. La, Schenone A., Suter U. (2005) Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *J. Cell Biol.* **170**, 1067–78.
- Okita K., Matsumura Y., Sato Y., Okada A., Morizane A., Okamoto S., Hong H., et al. (2011) A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat. Methods* **8**, 409–12.
- Tazir M., Hamadouche T., Nouioua S., Mathis S., Vallat J.-M. (2014) Hereditary motor and sensory neuropathies or Charcot-Marie-Tooth diseases: An update. *J. Neurol. Sci.* **347**, 14–22.

4.3 Conclusion

La création de cellules iPSc et la différenciation en motoneurones semblent très intéressantes pour mieux comprendre le rôle de certains gènes responsables de neuropathies CMT. En effet, dans le cas de notre patient, nous avons pu mettre en évidence des anomalies des mitochondries et du réseau mitochondrial qui n'étaient pas visibles sur les cultures de fibroblastes dermiques ainsi que sur les cultures d'iPSc. De plus, nous avons mis en évidence des anomalies de la distribution axonale des mitochondries qui pourraient bien expliquer le caractère longueur-dépendant des neuropathies CMT. Il n'est bien sûr pas possible de voir ces anomalies sans la création d'axones donc sans la différenciation en motoneurones. C'est la raison pour laquelle nous pensons que cette stratégie de cellules iPSc différenciées sera très productive dans le futur.

Partie IV – Discussion et Perspectives

Nous allons tenter dans cette Partie Discussion-Perspectives de dégager les éléments forts et les faiblesses de notre travail de thèse au regard des avancées actuelles de la science dans le domaine des Neuropathies et de leur traitement. Nous discuterons donc, dans un premier temps, les méthodes que nous avons utilisées. Puis nous évaluerons les résultats que nous avons obtenus avant de présenter ce qui pourrait être une suite logique à ce travail.

La maladie de Charcot-Marie-Tooth correspond à un ensemble de neuropathies sensitivomotrices d'origine héréditaire dont la prévalence est de 1/2500, et impliquant plus de 80 gènes. Elle représente la pathologie dégénérative la plus courante du système nerveux périphérique. Elle se traduit principalement par une diminution de la force musculaire, associée à une fonte musculaire, des troubles de l'équilibre et une diminution de la sensibilité. Il faut savoir qu'à l'heure actuelle aucun traitement n'est disponible, et que seulement des moyens de préventions des complications entraînées par la pathologie sont possibles. Le but de ce travail était donc de développer des modèles cellulaires pouvant mimer la pathologie d'un patient, dans le but de mieux comprendre et appréhender le rôle physiopathologique de la protéine impliquée et enfin de proposer une approche thérapeutique. Avons-nous répondu, au moins partiellement, à ce problème ? Serait-il possible de procéder autrement ? Nous allons tenter de le discuter maintenant.

Discussion sur les méthodes employées

▫ Le type de cellules pour créer le modèle cellulaire

Dans ce travail, le modèle des cellules souches humaines induites à la pluripotence ou iPSc a été développé, mais des cellules embryonnaires humaines hES auraient aussi pu être utilisées. Néanmoins elles présentent une lourdeur administrative, logistique et éthique rendant difficile les expérimentations voir inaccessibles pour certaines structures comme la nôtre. De plus, ces cellules ne peuvent pas être générées à partir de patients adultes. Cette option n'a donc pas été retenue.

Les iPSc ont été générées pour la 1^{ère} fois en 2006 par l'équipe du Pr Shinya Yamanaka, à partir de fibroblastes murins embryonnaires et adultes (Takahashi and Yamanaka 2006; Takahashi *et al.* 2007a), puis de cellules somatiques humaines (Takahashi *et al.* 2007b). Ils ont réussi « un retour en arrière » des cellules somatiques au stade de cellules souches pluripotentes. Elles présentaient les mêmes caractéristiques que les cellules mES / hES (marqueurs de surface, facteurs de transcription, capacité de différenciation, facteurs favorisant la pluripotentialité...). La reprogrammation est une technique nécessitant des compromis quant au choix des facteurs

de reprogrammation, du mécanisme de reprogrammation et du type cellulaire utilisé, garantissant une sécurité et une bonne efficacité et cette reprogrammation, ainsi que le confort du patient.

Pour ce faire, Yamanaka et collègues ont étudié les gènes impliqués dans l'auto-renouvellement et le maintien de la pluripotence et seulement 4 gènes étaient suffisants pour induire cette reprogrammation (Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc). Le choix des facteurs de reprogrammation dépend de chaque équipe, de l'utilité des iPS par la suite mais aussi du type de cellules somatiques utilisées (développé dans la Partie I Etude Bibliographique). Théoriquement, toutes les cellules de patient jeune ou âgé peuvent être reprogrammées afin d'obtenir des iPS (Lapasset *et al.* 2011). Le choix est réalisé selon les caractéristiques intrinsèques de ces cellules, (capacité de prolifération, remise en culture aisée...), selon l'efficacité de la reprogrammation, avec le choix adapté du moyen de reprogrammation, et aussi selon le fait que le prélèvement doit être le moins contraignant et le moins invasif possible pour le patient.

▫ Les prélèvements sur les patients

Les DFs ont été obtenus selon les accords signés des patients à partir de biopsies de la peau d'une personne en bonne santé et d'un patient porteur d'une mutation homozygote non-sens *GDAP1*. Le patient est un homme âgé de 23 ans, actuellement en fauteuil roulant. Les premiers signes de la maladie sont apparus au cours de son adolescence, avec des difficultés motrices au niveau des membres inférieures puis supérieurs, suivie par des troubles sensitifs. Les mains sont également touchées (faiblesse et dysfonctionnement). Aucun signal n'a été obtenu après stimulation des muscles lors de l'EMG. Le témoin est une femme de 56 ans sans signe neurologique et, bien sûr, sans mutation dans le gène de *GDAP1*. De manière à augmenter la fiabilité de nos résultats, il serait nécessaire de biopsier plusieurs autres personnes « saines » comprenant des hommes comme des femmes, de différents âges. Afin de confirmer les résultats obtenus, il me semblerait aussi important d'augmenter le nombre de patients porteurs de mutation homozygote non-sens *GDAP1*. Il pourrait être aussi intéressant d'éteindre l'expression du gène *GDAP1* à l'aide de sh-RNA sur des iPS contrôles, pour vérifier que le phénotype que nous obtenons avec les cellules du patient peut être reproduit avec des cellules normales dont l'expression du gène *GDAP1* serait réprimée. Ce travail a été initié par Manon Pellegrini durant son stage de M1, permettant l'identification des différentes sondes sur une lignée cellulaire humaine de neuroblastomes, les SH-SY5Y. Malheureusement, toutes ces

expériences, qui seraient utiles voire nécessaires, sont très voraces en temps de manipulation et en consommables.

▫ Le type de transduction des gènes du Cocktail et les cellules de départ

Comme nous l'avons décrit dans la Partie Bibliographie, différents mécanismes de transduction de ces gènes sont possibles. Les vecteurs viraux demeurent une alternative souvent utilisée mais sont controversés en raison du nombre aléatoire de copies virales intégrées, qui peuvent provoquer à la fois la réactivation d'oncogènes, tels que Klf4 et c-Myc et augmenter le risque de cancérisation. Ils peuvent aussi laisser des « traces » insertionnelles modifiant de façon aléatoire l'expression génique des gènes adjacents ou encore, s'intégrer à de multiples endroits du génome rendant les iPSc inutilisables en clinique. Pour pallier à cela, ce sont des plasmides non intégratifs que nous avons utilisés sous la direction d'i-STEM à Evry. L'efficacité de transfection est certes bien plus faible mais leur non-intégration dans le génome des cellules rendent, nous semble-t-il, les résultats obtenus beaucoup plus fiables. En effet, étant non intégratifs, ces plasmides sont éliminés une fois la reprogrammation obtenue. Ils ne perturbent donc plus le génome initial des cellules du patient. De plus, les plasmides sont facilement disponibles commercialement et ne nécessitent pas de connaissances approfondies en biologie moléculaire. Les grands points forts de cette voie de vectorisation sont donc son coût modéré et sa facilité d'emploi.

Comme type cellulaire de départ, nous avons choisi d'utiliser des fibroblastes dermiques de patients obtenus après biopsie de peau pour l'élaboration de ce modèle. L'obtention de biopsies de peau de personne contrôle et de patients était facilitée par la proximité du Centre National de Référence des Neuropathies Périphériques Rares du CHU de Limoges. La technique d'obtention de FDs à partir d'explant y est maîtrisée, et ces cellules présentent une très bonne prolifération. L'étape de reprogrammation s'est déroulée au sein du laboratoire I-Stem, Génopole Evry (directeur : Professeur Marc Peschanski), sous la direction du Docteur Lina El Kassir. Pour cette étape, il nous a été demandé de fournir des FDs (3 conditions différentes maximum), ayant un faible passage (Takahashi *et al.* 2007a), ainsi que tous les tests nécessaires pour la culture des cellules dans ce laboratoire à savoir un test mycoplasme et la détection de différents virus, réalisé au sein du service de virologie du CHU de Limoges.

De manière à garantir une efficacité accrue, et éviter l'intégration des facteurs de transcription, un protocole de reprogrammation optimisé a été utilisé. Dans ce travail, les fibroblastes dermiques de patient ont été reprogrammés par le cocktail de Yamanaka composé

de trois plasmides comprenant Oct4, Sox2, Klf4 et l-Myc où l'oncogène c-Myc a été remplacé par le l-Myc (moins oncogène) (Okita *et al.* 2011).

▫ La reprogrammation en cellules iPS

L'étape de reprogrammation en cellules iPS s'est bien passée comme en témoignent la vitalité et la morphologie des cellules obtenues (Article 1, 2 et 3 et 4). De plus, différents tests ont été réalisés de manière à s'assurer que ces cellules présentaient les mêmes caractéristiques que les cellules souches embryonnaires à savoir, l'auto-renouveau et la capacité de donner l'ensemble des cellules de l'organisme. Nous nous sommes assurés aussi qu'aucune anomalie génétique n'avait été produite par la reprogrammation grâce à la réalisation de caryotype. Tous les contrôles de qualité s'étant révélés corrects, ceci nous permet de penser que les résultats obtenus plus tard sont bien dus aux mutations et non à des altérations génomiques survenues dans la phase de reprogrammation.

En revanche, l'étape de reprogrammation en cellules iPS s'est révélée être extrêmement chronophage, soulevant la question d'une possible industrialisation du procédé. Malheureusement, à ce jour, l'œil expert du manipulateur reste le plus efficace quant au nettoyage, au repiquage et à la sélection de colonies d'iPSc. Néanmoins des solutions commencent à émerger au vu de l'implication que cela nécessite. Un nouveau composé, le FGF-LP, permet par exemple une libération de FGF2 à un taux constant pendant 72 h au lieu d'un traitement journalier. Il conviendra dans la suite de ce travail de ne pas oublier ce point.

Discussion sur les Résultats

▫ Les Cellules iPS de patients

Bien qu'aucune différence n'ait été décelée lors de la génération des iPSc entre les cellules du patient et celles de la personne saine, nous avons observé la présence de vésicules spécifiques chez le patient par rapport au contrôle lors l'étape d'obtention des rosettes. D'après nos résultats ces vésicules seraient des gouttelettes lipidiques. Nous avons également observé à ce stade que la production de rosettes (structure remplie de progéniteurs neuraux) à partir de d'iPSc de patient était nettement plus faible comparée à la production de rosettes par les cellules contrôles. Néanmoins, à partir de ces rosettes, nous avons été en mesure de créer les neurones puis les motoneurones chez le témoin comme chez le patient.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises concernant l'origine de ces gouttelettes lipidiques. Tout d'abord, il se pourrait que la mutation de GDAP1 entraîne une moindre

utilisation des lipides comme fournisseur d'énergie par les mitochondries du patient. Ceci pourrait peut-être s'expliquer par une moindre efficacité du système Acyl-Carnitine Transférase lors de mutation GDAP1 et donc par une déficience relative de la β -oxydation mitochondriale des lipides (Partie I Etude Biliographique, Chapitre β -oxydation). On peut aussi penser à ce que les mitochondries mutées pour GDAP1 soient plus sujettes au stockage des lipides qu'à leur dégradation. Pour cela des tests dosages des corps cétoniques pourraient être développés ainsi que l'étude du profil des acylcarnitines.

Une autre hypothèse pourrait être que une altération des interactions mitochondrie / réticulum endoplasmique (ou MAM) dont on sait qu'elles jouent un rôle clé dans l'homéostasie cellulaire, en particulier dans le transport de phospholipides, l'homéostasie calcique ou du métabolisme lipidique. Area-Gomez et collègues ont montré dans la maladie de Parkinson un dysfonctionnement des MAM, mettant en évidence la présence, entre autres modifications, de gouttelettes lipidiques (Area-Gomez *et al.* 2012). Le faible nombre de rosettes dans les cultures du patient serait un signe de la faiblesse du processus de différenciation. La mutation renforcerait la fragilité des cellules aux différents stress (variation légère de pH, de température, de facteur de croissance, de CO₂...), et ne permettrait pas une différenciation optimale. Ces observations pourraient être le début de nouvelles investigations de notre laboratoire montrant par immunocytochimie les interactions entre les mitochondries de témoin et de patient. A notre connaissance, les modèles de cellules iPS pour les formes axonales de patients CMT ont été développés uniquement pour les mutations des gènes NEFL et MFN2 (Saporta *et al.* 2015). Notre travail nous semble complémentaire à cette étude car elle fournit un autre modèle de CMT axonal.

▫ *Obtention de motoneurones à partir de cellules iPS*

Après avoir obtenu des cellules iPSc, nous nous sommes lancés dans la différenciation de cellules en motoneurones et nous pensons que nous y sommes arrivés même si la caractérisation de ces cellules nous a posé quelques problèmes. Il n'a pas été simple de caractériser les motoneurones tant sur le plan immunocytochimique que sur le plan électrophysiologique. Les anticorps permettant une bonne détection des MN restent difficiles à trouver. Cependant, les immunomarquages par (Islet1, Isl1 et HB9) nous permettent de penser que les cellules que nous avons différenciées sont bien des cellules motoneuronales. Certes la différenciation en motoneurones de ces cellules est incomplète, de 60 à 70 % environ. Ceci peut être un souci car les observations (action de composés pharmacologiques, dynamique mitochondriale...) pourraient être liées aux MN mais aussi à d'autres types de cellules, ce qui rend difficile

l'interprétation des résultats et leur reproductibilité (Maury *et al.* 2012b). En électrophysiologie par exemple, il est difficile de clamber une cellule en étant certains que ce soit un MN. Pour cela une étape de tri cellulaire et d'enrichissement nous semble hautement nécessaire. La technique de SdFFF est une méthode de tri cellulaire douce, non invasive, et sans marquage préalable, respectant à la fois l'intégrité et la fonctionnalité cellulaire tout en garantissant une remise en culture des différentes populations obtenues. L'absence de marqueurs cellulaires fluorescents ou magnétiques fait la force de cette technique. En effet, cette méthode peut être utilisée quand ces marqueurs ne sont pas bien définis, qu'ils n'existent pas dans le commerce, quand ils pourraient interférer avec d'autres types de cellules, ou quand ils pourraient induire l'activation et donc la différenciation de cellules. Le principe de la séparation des cellules est seulement basé sur leurs propriétés biophysiques intrinsèques tels que la taille, la densité, la forme et la rigidité. De plus, la limitation des interactions entre les cellules et les faibles forces de cisaillements garantissent une remise en culture avec une faible mortalité cellulaire. Dans notre étude, la technique de SdFFF a permis de trier deux types de progéniteurs en même temps après une différenciation par défaut des iPSc : les progéniteurs endothéliaux et neuraux. De plus, l'obtention de progéniteurs neuraux par la voie classique est de 30 jours, ce délai est réduit à 13 jours grâce à la SdFFF sans ajout de facteur ou de milieu spécifique, et donc permettant un gain de temps et d'argent. Mais cette technique doit être optimisée de manière à séparer plus finement les différentes populations de progéniteurs. Cette optimisation peut se faire selon deux axes, soit en augmentant le nombre de fractions collectées et ainsi améliorer la pureté des différentes fractions, soit en ajoutant une étape de tri par SdFFF directement en sortie de canal. Ce dernier point peut être intéressant mais présente plusieurs faiblesses. Premièrement, la dilution de l'échantillon serait alors extrêmement importante rendant difficile le travail sur les cellules obtenues. Deuxièmement, le temps nécessaire serait très important pour une collecte de population cellulaire très diluée, et donc mettant en péril l'intégrité cellulaire.

Au lieu d'utiliser cette technique lors de la différenciation spontanée des EB, il serait intéressant de pouvoir enrichir une population en MN. De nombreuses équipes proposent déjà un tri par FACS de MN (Toli *et al.* 2015; Wichterle *et al.* 2002; Hargus *et al.* 2010). D. Toli et collègues ont obtenu des MN dérivés de cellules iPSc de patient présentant une maladie neurodégénérative, la SLA. Durant la différenciation en MN, des cellules non désirées pour l'étude de la pathologie sont obtenues. Ils ont réussi à isoler 100% de MN, avec un FACS double sélection basé sur la détection d'un épitope de surface p75^{NTR} et un lentivirus HB9 : RFP (Toli *et al.* 2015). Des résultats préliminaires ont été obtenus lors de l'enrichissement d'une fraction en MN par SdFFF, mais les conditions expérimentales restent encore à optimiser.

Une autre question soulevée par cette étude est la maturité de ces MN, en particulier leur maturité fonctionnelle. L'électrophysiologie peut nous apporter une ébauche de réponse. Cette technique nécessite temps et expertise, d'abord dans l'élaboration de pipettes de résistance reproductible mais aussi lors du clamp de la cellule. Une autre partie de la réponse peut être apporté lors de co-culture avec des cellules musculaire. L'établissement de myotubes à partir une lignée cellulaire de C2C12 est permis grâce au changement de milieu, passant d'un milieu riche en SVF à un milieu comprenant du sérum de cheval en faible quantité. Nous rencontrons actuellement des problèmes de prolifération des cellules musculaire rendant impossible la co-culture. Néanmoins des mises au point sont programmées comme l'ensemencement en faible proportion de C2C12 ou encore des moyens pour inactiver leur prolifération après l'apparition des myotubes (mitomycine-C, irradiation). Un immunomarquage devrait permettre par la suite de visualiser les interactions entre les MN et les myotubes.

Perspectives pour ce travail

▫ Co-culture

Dans le but de reproduire un modèle se rapprochant le plus possible des conditions physiopathologiques, il serait intéressant de développer une co-culture MN / cellule de Schwann. En effet, les résultats intéressants que nous avons obtenus pourraient être encore développés car les motoneurons peuvent modifier leurs caractéristiques lorsqu'ils sont co-cultivés avec des cellules de soutien. Ainsi, après détermination des conditions optimales pour induire la différenciation de cellules iPSc en cellules de Schwann et de leur caractérisation, nous pourrions déterminer les meilleures conditions de co-culture. Par la suite, nous pourrions étudier les interactions cellulaires d'un point de vue morphologique grâce à la microscopie confocale à fluorescence et la microscopie électronique, et d'un point de vue fonctionnel grâce à des études électrophysiologiques. Ces cellules de Schwann pourront être soit générées à partir de cellules iPSc d'un témoin soit à partir de cellules iPSc du patient GDAP1.

▫ Tests de molécules thérapeutiques

Enfin le point final de cette étude serait l'identification de molécules à potentiel thérapeutique, agissant de manière à rétablir la fonction physiologique perdu lors de la

mutation. Les iPS permettent de réaliser un criblage de drogues directement sur des cellules d'intérêt dérivées de patients, ce criblage pouvant se faire à plusieurs échelles, soit avec quelques molécules présentant un potentiel thérapeutique intéressant soit par un criblage à haut débit ou High Throughput Screening avec des banques de molécules (plusieurs milliers de composés). L'exemple d'une société marseillaise Trophos suscite notre intérêt quant au développement de candidats thérapeutiques. Elle est spécialisée dans le développement de nouvelles thérapeutiques contre les maladies neurodégénératives, en particulier l'amyotrophie spinale (décrite précédemment). Le composant phare de cette société est l'olesoxime (TRO19622), premier candidat thérapeutique issu de la nouvelle classe de molécules d'oximes du cholestérol brevetées par Trophos, ciblant les pores mitochondriaux. Les résultats d'une récente étude montrent que le traitement avec l'olesoxime préserve la fonction motrice des patients ainsi qu'une diminution des complications dues à la maladie sur une période deux ans.

Dans notre étude, les candidats thérapeutiques restent à définir En fonction d'indexés précis, comme l'élipticité des mitochondries ou encore leurs vitesses de déplacement (antérograde / rétrograde). Néanmoins, pour pouvoir mettre en place ce type d'analyse, il est nécessaire de disposer de cellules différenciées homogènes, en grande quantité et qui présentent un phénotype caractéristique de la maladie. Pour cela des tests de la dynamique mitochondriale sont en cours de développement.

▫ Anticorps GDAP1 ?

Un des problèmes soulevés pendant cette thèse est le marquage fiable de la protéine de la membrane externe mitochondriale GDAP1. En effet, l'ensemble des anticorps testés ne présentaient pas soit le bon poids moléculaire, soit une détection correcte en immunocytochimie (marquage de l'appareil de Golgi). Un paramètre primordial serait le développement d'un anticorps fiable permettant une détection optimale de GDAP1, de manière à pouvoir imputer un rôle physiologique à cette protéine. Ainsi les hypothèses selon laquelle GDAP1 serait impliqué dans la liaison au phagosome lors de la mitophagie, lors de la fission dans la dynamique mitochondriale ou lors des MAM pourraient être vérifiées.

Partie V – Conclusion

Les neuropathies périphériques d'origine génétique restent encore aujourd'hui des maladies orphelines, en manque de traitement efficace. L'étude de leurs mécanismes physiopathologiques reste donc une tâche importante à réaliser afin de parvenir à de réels progrès thérapeutiques. Cependant, nous sommes bien conscients que l'extrême variété des mutations et des gènes causant ces NP génétiques ne rendra pas la chose aisée.

L'objectif de ce travail était de tenter de générer de motoneurones à partir de fibroblastes dermiques de patient atteint de maladie CMT via les iPSc, de déterminer si ceux-ci présentaient des anomalies morphométriques et si celles-ci étaient susceptibles d'être traitées. Nous pensons que plusieurs éléments de cet objectif ont été atteints (obtention d'iPSc puis de motoneurones, mise en évidence d'anomalies liées à la mutation) mais nous n'avons pas, dans le temps imparti, pu mettre en évidence l'utilité de cette stratégie pour découvrir de nouvelles pistes thérapeutiques. C'est une tâche à laquelle nous aimerions nous atteler dans les années qui viennent au sein de l'EA6309.

Bibliographie

- Aasen T., Raya A., Barrero M. J., Garreta E., Consiglio A., Gonzalez F., Vassena R., et al. (2008) Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat. Biotechnol.* **26**, 1276–84.
- Akhurst R. J., Hata A. (2012) Targeting the TGF β signalling pathway in disease. *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**, 790–811.
- Allen N. J., Barres B. A. (2009) Neuroscience: Glia - more than just brain glue. *Nature* **457**, 675–7.
- Amabile G., Meissner A. (2009) Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine. *Trends Mol. Med.* **15**, 59–68.
- Anderson R. M., Lawrence A. R., Stottmann R. W., Bachiller D., Klingensmith J. (2002) Chordin and noggin promote organizing centers of forebrain development in the mouse. *Development* **129**, 4975–4987.
- Anokye-Danso F., Trivedi C. M., Jühr D., Gupta M., Cui Z., Tian Y., Zhang Y., et al. (2011) Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* **8**, 376–88.
- Aoi T., Yae K., Nakagawa M., Ichisaka T., Okita K., Takahashi K., Chiba T., Yamanaka S. (2008) Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* **321**, 699–702.
- Area-Gomez E., Carmen Lara Castillo M. Del, Tambini M. D., Guardia-Laguarta C., Groof A. J. C. de, Madra M., Ikenouchi J., et al. (2012) Upregulated function of mitochondria-associated ER membranes in Alzheimer disease. *EMBO J.* **31**, 4106–23.
- Ashrafi G., Schwarz T. L. (2013) The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death Differ.* **20**, 31–42.
- Attarian S., Vallat J.-M., Magy L., Funalot B., Gonnaud P.-M., Lacour A., Péréon Y., et al. (2014a) An exploratory randomised double-blind and placebo-controlled phase 2 study of a combination of baclofen, naltrexone and sorbitol (PXT3003) in patients with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Orphanet J. Rare Dis.* **9**, 199.
- Attarian S., Vallat J.-M., Magy L., Funalot B., Gonnaud P.-M., Lacour A., Péréon Y., et al. (2014b) An exploratory randomised double-blind and placebo-controlled phase 2 study of a combination of baclofen, naltrexone and sorbitol (PXT3003) in patients with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Orphanet J. Rare Dis.* **9**, 199.

- Badcock G., Pigott C., Goepel J., Andrews P. W. (1999) The human embryonal carcinoma marker antigen TRA-1-60 is a sialylated keratan sulfate proteoglycan. *Cancer Res.* **59**, 4715–9.
- Bagher Z., Azami M., Ebrahimi-Barough S., Mirzadeh H., Solouk A., Soleimani M., Ai J., Nourani M. R., Joghataei M. T. (2015) Differentiation of Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells into Motor Neuron-Like Cells on Three-Dimensional Collagen-Grafted Nanofibers. *Mol. Neurobiol.*, 1–12.
- Ban H., Nishishita N., Fusaki N., Tabata T., Saeki K., Shikamura M., Takada N., et al. (2011) Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 14234–9.
- Barneo-Muñoz M., Juárez P., Civera-Tregón A., Yndriago L., Pla-Martin D., Zenker J., Cuevas-Martín C., et al. (2015) Lack of GDAP1 induces neuronal calcium and mitochondrial defects in a knockout mouse model of charcot-marie-tooth neuropathy. *PLoS Genet.* **11**, e1005115.
- Bar-Nur O., Russ H. A., Efrat S., Benvenisty N. (2011) Epigenetic memory and preferential lineage-specific differentiation in induced pluripotent stem cells derived from human pancreatic islet beta cells. *Cell Stem Cell* **9**, 17–23.
- Bartram U., Speer C. P. (2004) The role of transforming growth factor beta in lung development and disease. *Chest* **125**, 754–65.
- Battu S., Cook-Moreau J., Cardot P. J. P. (2002) Sedimentation field-flow fractionation: methodological basis and applications for cell sorting. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **25**, 2193–2210.
- Battu S., Rigaud M., Beneytout J. L. (1998) Resistance to apoptosis and cyclooxygenase-2 expression in a human adenocarcinoma cell line HT29 Cl.19A. *Anticancer Res.* **18**, 3579–3584.
- Baxter R. V., Othmane K. Ben, Rochelle J. M., Stajich J. E., Hulette C., Dew-Knight S., Hentati F., et al. (2002) Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 is mutant in Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/8q21. *Nat. Genet.* **30**, 21–2.
- Beal M. F., Oakes D., Shoulson I., Henchcliffe C., Galpern W. R., Haas R., Juncos J. L., et al. (2014) A randomized clinical trial of high-dosage coenzyme Q10 in early Parkinson disease: no evidence of benefit. *JAMA Neurol.* **71**, 543–52.
- Bégaud-Grimaud G., Battu S., Lazcoz P., Castresana J. S., Jauberteau M. O., Cardot P. J. P. (2007) Study of the phenotypic relationship in the IMR-32 human neuroblastoma cell line by sedimentation field flow fractionation. *Int. J. Oncol.* **31**, 883–92.

- Bergmann S., Sandler O., Sberro H., Shnider S., Schejter E., Shilo B.-Z., Barkai N. (2007) Pre-steady-state decoding of the Bicoid morphogen gradient. *PLoS Biol.* **5**, e46.
- Bier E., Robertis E. M. De (2015) BMP gradients: A paradigm for morphogen-mediated developmental patterning. *Science (80-.).* **348**, aaa5838–aaa5838.
- Bjelakovic G., Nikolova D., Glud L. L., Simonetti R. G., Glud C. (2012) Antioxidant supplements for prevention of mortality in healthy participants and patients with various diseases. *Cochrane database Syst. Rev.* **3**, CD007176.
- Bohl D., Liu S., Blanchard S., Hocquemiller M., Haase G., Heard J.-M. (2008) Directed evolution of motor neurons from genetically engineered neural precursors. *Stem Cells* **26**, 2564–75.
- Boveris A., Chance B. (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* **134**, 707–16.
- Braun R. J. (2012) Mitochondrion-mediated cell death: dissecting yeast apoptosis for a better understanding of neurodegeneration. *Front. Oncol.* **2**, 182.
- Bréjot T., Blanchard S., Hocquemiller M., Haase G., Liu S., Nosjean A., Heard J. M., Bohl D. (2006) Forced expression of the motor neuron determinant HB9 in neural stem cells affects neurogenesis. *Exp. Neurol.* **198**, 167–82.
- Brito O. M. de, Scorrano L. (2008) Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* **456**, 605–610.
- Brons I. G. M., Smithers L. E., Trotter M. W. B., Rugg-Gunn P., Sun B., Chuva de Sousa Lopes S. M., Howlett S. K., et al. (2007) Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* **448**, 191–5.
- Burdon R. H., Gill V. M., Rice-Evans C. (1987) Oxidative stress and heat shock protein induction in human cells. *Free Radic. Res. Commun.* **3**, 129–39.
- Burté F., Carelli V., Chinnery P. F., Yu-Wai-Man P. (2014) Disturbed mitochondrial dynamics and neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurol.* **11**, 11–24.
- Cailleteau C., Liagre B., Battu S., Jayat-Vignoles C., Beneytout J. L. (2008) Increased cyclooxygenase-2 and thromboxane synthase expression is implicated in diosgenin-induced megakaryocytic differentiation in human erythroleukemia cells. *Anal. Biochem.* **380**, 26–34.
- Calvo J., Funalot B., Ouvrier R. A., Lazaro L., Toutain A., Mas P. De, Bouche P., et al. (2009) Genotype-phenotype correlations in Charcot-Marie-Tooth disease type 2 caused by mitofusin 2 mutations. *Arch. Neurol.* **66**, 1511–6.

- Cardot P., Battu S., Sarrazin R. (2006) *Swivel joint for conduits used in analytical chemistry*. (Universite De Limoges, Fr.), Fr.
- Casarosa S., Zasso J., Conti L. (2013) *Systems for ex-vivo Isolation and Culturing of Neural Stem Cells*.
- Cassereau J., Chevrollier A., Gueguen N., Desquiret V., Verny C., Nicolas G., Dubas F., et al. (2011) Mitochondrial dysfunction and pathophysiology of Charcot-Marie-Tooth disease involving GDAP1 mutations. *Exp. Neurol.* **227**, 31–41.
- Cassereau J., Chevrollier A., Gueguen N., Malinge M.-C., Letournel F., Nicolas G., Richard L., et al. (2009) Mitochondrial complex I deficiency in GDAP1-related autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease (CMT2K). *Neurogenetics* **10**, 145–50.
- Chambers S. M., Fasano C. a, Papapetrou E. P., Tomishima M., Sadelain M., Studer L. (2009) Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat. Biotechnol.* **27**, 275–80.
- Chapman A. L., Bennett E. J., Ramesh T. M., Vos K. J. De, Grierson A. J. (2013) Axonal Transport Defects in a Mitofusin 2 Loss of Function Model of Charcot-Marie-Tooth Disease in Zebrafish. *PLoS One* **8**, e67276.
- Chen H., Chan D. C. (2009) Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases. *Hum. Mol. Genet.* **18**, R169–76.
- Chumakov I., Milet A., Cholet N., Primas G., Boucard A., Pereira Y., Graudens E., et al. (2014) Polytherapy with a combination of three repurposed drugs (PXT3003) down-regulates Pmp22 over-expression and improves myelination, axonal and functional parameters in models of CMT1A neuropathy. *Orphanet J. Rare Dis.* **9**, 201.
- Cipolat S., Martins de Brito O., Dal Zilio B., Scorrano L. (2004) OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 15927–32.
- Clarke L., Kooy D. van der (2009) A safer stem cell: inducing pluripotency. *Nat. Med.* **15**, 1001–2.
- Cogliati S., Frezza C., Soriano M. E., Varanita T., Quintana-Cabrera R., Corrado M., Cipolat S., et al. (2013) Mitochondrial cristae shape determines respiratory chain supercomplexes assembly and respiratory efficiency. *Cell* **155**, 160–71.
- Colas J. F., Schoenwolf G. C. (2001) Towards a cellular and molecular understanding of neurulation. *Dev. Dyn.* **221**, 117–45.
- Collins T. J., Berridge M. J., Lipp P., Bootman M. D. (2002) Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *EMBO J.* **21**, 1616–27.

- Comte I., Battu S., Mathonnet M., Bessette B., Lalloué F., Cardot P., Ayer-Le Lièvre C. (2006) Neural stem cell separation from the embryonic avian olfactory epithelium by sedimentation field-flow fractionation. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **843**, 175–82.
- Cuesta A., Pedrola L., Sevilla T., García-Planells J., Chumillas M. J., Mayordomo F., LeGuern E., Marín I., Vélchez J. J., Palau F. (2002) The gene encoding ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *Nat. Genet.* **30**, 22–5.
- Czerwinska P., Kaminska B. (2015) Regulation of breast cancer stem cell features. *Contemp. Oncol. (Poznań, Poland)* **19**, A7–A15.
- Danigo A., Magy L., Richard L., Sturtz F., Funalot B., Demiot C. (2014) A reversible functional sensory neuropathy model. *Neurosci. Lett.* **571**, 39–44.
- Denoulet P., Filliatreau G., Néchaud B. de, Gros F., Giamberardino L. Di (1989) Differential axonal transport of isotubulins in the motor axons of the rat sciatic nerve. *J. Cell Biol.* **108**, 965–71.
- Dimos J. T., Rodolfa K. T., Niakan K. K., Weisenthal L. M., Mitumoto H., Chung W., Croft G. F., et al. (2008) Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* **321**, 1218–21.
- Ding V. M. Y., Ling L., Natarajan S., Yap M. G. S., Cool S. M., Choo A. B. H. (2010) FGF-2 modulates Wnt signaling in undifferentiated hESC and iPS cells through activated PI3-K/GSK3 β signaling. *J. Cell. Physiol.* **225**, 417–428.
- Do J. T., Schöler H. R. (2009) Regulatory circuits underlying pluripotency and reprogramming. *Trends Pharmacol. Sci.* **30**, 296–302.
- Duprat F. Principes Et Techniques. *Source*.
- Dvorak P., Dvorakova D., Hampl A. (2006) Fibroblast growth factor signaling in embryonic and cancer stem cells. *FEBS Lett.* **580**, 2869–74.
- Ebert A. D., Yu J., Rose F. F., Mattis V. B., Lorson C. L., Thomson J. A., Svendsen C. N. (2009) Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* **457**, 277–80.
- Eccles J. C., Eccles R. M., Magni F. (1960) Monosynaptic excitatory action on motoneurons regenerated to antagonistic muscles. *J. Physiol.* **154**, 68–88.
- Ekins S., Litterman N. K., Arnold R. J. G., Burgess R. W., Freundlich J. S., Gray S. J., Higgins J. J., et al. (2015) A brief review of recent Charcot-Marie-Tooth research and priorities. *F1000Research* **4**, 53.

- Emery A. E. (1991) Population frequencies of inherited neuromuscular diseases--a world survey. *Neuromuscul. Disord.* **1**, 19–29.
- Estela A., Pla-Martín D., Sánchez-Piris M., Sesaki H., Palau F. (2011) Charcot-Marie-Tooth-related gene GDAP1 complements cell cycle delay at G2/M phase in *Saccharomyces cerevisiae* fis1 gene-defective cells. *J. Biol. Chem.* **286**, 36777–86.
- Evans M. J., Kaufman M. H. (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154–6.
- Evans P., Halliwell B. (2001) Micronutrients: oxidant/antioxidant status. *Br. J. Nutr.* **85**, S67–S74.
- Fernández-Moriano C., González-Burgos E., Gómez-Serranillos M. P. (2015) Mitochondria-Targeted Protective Compounds in Parkinson's and Alzheimer's Diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2015**, 408927.
- Fledrich R., Stassart R. M., Sereda M. W. (2012) Murine therapeutic models for Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease. *Br. Med. Bull.* **102**, 89–113.
- Frezza C., Cipolat S., Martins de Brito O., Micaroni M., Beznoussenko G. V., Rudka T., Bartoli D., et al. (2006) OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* **126**, 177–89.
- Fridman V., Bundy B., Reilly M. M., Pareyson D., Bacon C., Burns J., Day J., et al. (2014) CMT subtypes and disease burden in patients enrolled in the Inherited Neuropathies Consortium natural history study: a cross-sectional analysis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, 1–6.
- Fridovich I. (1999) Fundamental Aspects of Reactive Oxygen Species, or What's the Matter with Oxygen? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **893**, 13–18.
- Friel R., Sar S. van der, Mee P. J. (2005) Embryonic stem cells: understanding their history, cell biology and signalling. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 1894–903.
- Fritz S., Rapaport D., Klanner E., Neupert W., Westermann B. (2001) Connection of the mitochondrial outer and inner membranes by Fzo1 is critical for organellar fusion. *J. Cell Biol.* **152**, 683–92.
- Fuerstenau-Sharp M., Zimmermann M. E., Stark K., Jentsch N., Klingenstein M., Drzymalski M., Wagner S., et al. (2015) Generation of highly purified human cardiomyocytes from peripheral blood mononuclear cell-derived induced pluripotent stem cells. *PLoS One* **10**, e0126596.

- Funalot B., Magdelaine C., Sturtz F., Ouvrier R., Vallat J.-M. (2009) [Ultrastructural lesions of axonal mitochondria in patients with childhood-onset Charcot-Marie-Tooth disease due to MFN2 mutations]. *Bull. Acad. Natl. Med.* **193**, 151–60; discussion 160–1.
- Fusaki N., Ban H., Nishiyama A., Saeki K., Hasegawa M. (2009) Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc. Japan Acad. Ser. B* **85**, 348–362.
- Gammill L. S., Bronner-Fraser M. (2003) Neural crest specification: migrating into genomics. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 795–805.
- Giddings J. C. (1993) Field-flow fractionation: analysis of macromolecular, colloidal, and particulate materials. *Science* **260**, 1456–65.
- Gilbert D. L. (2000a) Fifty years of radical ideas. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **899**, 1–14.
- Gilbert S. F. (2000b) *Developmental Biology*. Sinauer Associates.
- Goetz R., Mohammadi M. (2013) Exploring mechanisms of FGF signalling through the lens of structural biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 166–80.
- Gorrini C., Harris I. S., Mak T. W. (2013) Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **12**, 931–47.
- Gregor T., Tank D. W., Wieschaus E. F., Bialek W. (2007) Probing the limits to positional information. *Cell* **130**, 153–64.
- Haase G., Dessaud E., Garcès A., Bovis B. de, Birling M.-C., Filippi P., Schmalbruch H., Arber S., deLapeyrière O. (2002) GDNF Acts through PEA3 to Regulate Cell Body Positioning and Muscle Innervation of Specific Motor Neuron Pools. *Neuron* **35**, 893–905.
- Hanna J., Markoulaki S., Schorderet P., Carey B. W., Beard C., Wernig M., Creighton M. P., et al. (2008) Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell* **133**, 250–64.
- Harfe B. D., Scherz P. J., Nissim S., Tian H., McMahon A. P., Tabin C. J. (2004) Evidence for an expansion-based temporal Shh gradient in specifying vertebrate digit identities. *Cell* **118**, 517–28.
- Hargus G., Cooper O., Deleidi M., Levy A., Lee K., Marlow E., Yow A., et al. (2010) Differentiated Parkinson patient-derived induced pluripotent stem cells grow in the adult rodent brain and reduce motor asymmetry in Parkinsonian rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 15921–6.
- Hartfuss E., Galli R., Heins N., Götz M. (2001) Characterization of CNS precursor subtypes and radial glia. *Dev. Biol.* **229**, 15–30.

- Heins N., Malatesta P., Cecconi F., Nakafuku M., Tucker K. L., Hack M. A., Chapouton P., Barde Y.-A., Götz M. (2002) Glial cells generate neurons: the role of the transcription factor Pax6. *Nat. Neurosci.* **5**, 308–15.
- Hoffman L. M., Carpenter M. K. (2005) Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **23**, 699–708.
- Hu B.-Y., Zhang S.-C. (2009) Differentiation of spinal motor neurons from pluripotent human stem cells. *Nat. Protoc.* **4**, 1295–304.
- Huber N., Guimaraes S., Schrader M., Suter U., Niemann A. (2013) Charcot-Marie-Tooth disease-associated mutants of GDAP1 dissociate its roles in peroxisomal and mitochondrial fission. *EMBO Rep.* **14**, 545–52.
- Ingerman E., Perkins E. M., Marino M., Mears J. A., McCaffery J. M., Hinshaw J. E., Nunnari J. (2005) Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *J. Cell Biol.* **170**, 1021–7.
- Inglese J., Dranchak P., Moran J. J., Jang S.-W., Srinivasan R., Santiago Y., Zhang L., et al. (2014) Genome editing-enabled HTS assays expand drug target pathways for Charcot-Marie-tooth disease. *ACS Chem. Biol.* **9**, 2594–602.
- Ito N., Ohta K. (2015) Reprogramming of human somatic cells by bacteria. *Dev. Growth Differ.* **57**, 305–12.
- Jang S.-W., Lopez-Anido C., MacArthur R., Svaren J., Inglese J. (2012) Identification of drug modulators targeting gene-dosage disease CMT1A. *ACS Chem. Biol.* **7**, 1205–13.
- Janssens K., Goethals S., Atkinson D., Ermanoska B., Franssen E., Jordanova A., Auer-Grumbach M., Asselbergh B., Timmerman V. (2014) Human Rab7 mutation mimics features of Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2B in *Drosophila*. *Neurobiol. Dis.* **65**, 211–9.
- Jessen K. R., Mirsky R. (2005) The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**, 671–82.
- Kabzińska D., Niemann A., Drac H., Huber N., Potulska-Chromik A., Hausmanowa-Petrusewicz I., Suter U., Kochański A. (2011) A new missense GDAP1 mutation disturbing targeting to the mitochondrial membrane causes a severe form of AR-CMT2C disease. *Neurogenetics* **12**, 145–53.
- Kaji K., Norrby K., Paca A., Mileikovsky M., Mohseni P., Woltjen K. (2009) Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* **458**, 771–5.

- Kaufmann M., Schuffenhauer A., Fruh I., Klein J., Thiemeyer A., Rigo P., Gomez-Mancilla B., et al. (2015) High-Throughput Screening Using iPSC-Derived Neuronal Progenitors to Identify Compounds Counteracting Epigenetic Gene Silencing in Fragile X Syndrome. *J. Biomol. Screen.*
- Kaya F., Belin S., Diamantidis G., Fontes M. (2008) Ascorbic acid is a regulator of the intracellular cAMP concentration: old molecule, new functions? *FEBS Lett.* **582**, 3614–8.
- Kazamel M., Boes C. J. (2014) Charcot Marie Tooth disease (CMT): historical perspectives and evolution. *J. Neurol.*
- Kieffer E., Kuntz S., Viville S. (2010) [An overview of pluripotent stem cell lines]. *Med. Sci. (Paris)*. **26**, 848–54.
- Kim D.-S., Lee J. S., Leem J. W., Huh Y. J., Kim J. Y., Kim H.-S., Park I.-H., Daley G. Q., Hwang D.-Y., Kim D.-W. (2010) Robust Enhancement of Neural Differentiation from Human ES and iPS Cells Regardless of their Innate Difference in Differentiation Propensity. *Stem Cell Rev. Reports* **6**, 270–281.
- Kim J. B., Sebastiano V., Wu G., Araúzo-Bravo M. J., Sasse P., Gentile L., Ko K., et al. (2009) Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell* **136**, 411–9.
- Kiskinis E., Eggan K. (2010) Progress toward the clinical application of patient-specific pluripotent stem cells. *J. Clin. Invest.* **120**, 51–9.
- Koch P., Opitz T., Steinbeck J. A., Ladewig J., Brüstle O. (2009) 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**, 3225–30.
- Koestenbauer S., Zech N. H., Juch H., Vanderzwalmen P., Schoonjans L., Dohr G. (2006) Embryonic stem cells: similarities and differences between human and murine embryonic stem cells. *Am. J. Reprod. Immunol.* **55**, 169–80.
- Komiya Y., Habas R. (2008) Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis* **4**, 68–75.
- Kondo T., Asai M., Tsukita K., Kutoku Y., Ohsawa Y., Sunada Y., Imamura K., et al. (2013) Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A β and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell* **12**, 487–96.
- Kriegstein A., Alvarez-Buylla A. (2009) The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu. Rev. Neurosci.* **32**, 149–84.
- Kroon E., Martinson L. A., Kadoya K., Bang A. G., Kelly O. G., Eliazzer S., Young H., et al. (2008) Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat. Biotechnol.* **26**, 443–52.

- Kudoh T., Wilson S. W., Dawid I. B. (2002) Distinct roles for Fgf, Wnt and retinoic acid in posteriorizing the neural ectoderm. *Development* **129**, 4335–4346.
- Kumar S., Duester G. (2014) Retinoic acid controls body axis extension by directly repressing Fgf8 transcription. *Development* **141**, 2972–7.
- Lancaster M. a, Renner M., Martin C.-A., Wenzel D., Bicknell L. S., Hurles M. E., Homfray T., Penninger J. M., Jackson A. P., Knoblich J. a (2013) Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* **501**, 373–9.
- Lancaster M. a., Knoblich J. a. (2014) Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. *Science (80-.)*. **345**, 1247125–1247125.
- Landon D. N., Williams P. L. (1963) Ultrastructure of the node of Ranvier. *Nature* **199**, 575–7.
- Lapasset L., Milhavet O., Prieur A., Besnard E., Babled A., Aït-Hamou N., Leschik J., et al. (2011) Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state. *Genes Dev.* **25**, 2248–53.
- Lewis E. B. (1978) A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* **276**, 565–70.
- Li X.-J., Du Z.-W., Zarnowska E. D., Pankratz M., Hansen L. O., Pearce R. A., Zhang S.-C. (2005) Specification of motoneurons from human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **23**, 215–21.
- Liang G., Zhang Y. (2013) Embryonic stem cell and induced pluripotent stem cell: an epigenetic perspective. *Cell Res.* **23**, 49–69.
- Liao J., Wu Z., Wang Y., Cheng L., Cui C., Gao Y., Chen T., et al. (2008) Enhanced efficiency of generating induced pluripotent stem (iPS) cells from human somatic cells by a combination of six transcription factors. *Cell Res.* **18**, 600–3.
- Lin T., Ambasudhan R., Yuan X., Li W., Hilcove S., Abujarour R., Lin X., et al. (2009) A chemical platform for improved induction of human iPSCs. *Nat. Methods* **6**, 805–808.
- Loh Y.-H., Agarwal S., Park I.-H., Urbach A., Huo H., Heffner G. C., Kim K., Miller J. D., Ng K., Daley G. Q. (2009) Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood* **113**, 5476–9.
- López Del Amo V., Seco-Cervera M., García-Giménez J. L., Whitworth A. J., Pallardó F. V, Galindo M. I. (2015) Mitochondrial defects and neuromuscular degeneration caused by altered expression of *Drosophila* Gdap1: implications for the Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 21–36.

- Lu D., Li Y., Liu Q.-R., Wu Q., Zhang H., Xie P., Wang Q. (2015) Wls promotes the proliferation of breast cancer cells via Wnt signaling. *Med. Oncol.* **32**, 140.
- Maday S., Holzbaur E. L. F. (2012) Autophagosome assembly and cargo capture in the distal axon. *Autophagy* **8**, 858–60.
- Maday S., Wallace K. E., Holzbaur E. L. F. (2012) Autophagosomes initiate distally and mature during transport toward the cell soma in primary neurons. *J. Cell Biol.* **196**, 407–17.
- Maden M. (2002) Retinoid signalling in the development of the central nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* **3**, 843–53.
- Magnaudeix A. (2011) Autophagie dans le système nerveux central et neuroprotection [En ligne]. Thèse de doctorat : Biologie Sciences Santé. Limoges : Université de Limoges. Disponible sur <<http://epublications.unilim.fr/theses/2011/magnaudeix-amandine/magnaudeix-amandine.pdf>>
- Magy L., Vallat J.-M. (2009) [Peripheral neuropathies]. *Rev. Prat.* **59**, 839–40.
- Malatesta P., Hartfuss E., Götz M. (2000) Isolation of radial glial cells by fluorescent-activated cell sorting reveals a neuronal lineage. *Development* **127**, 5253–63.
- Manczak M., Reddy P. H. (2012) Abnormal interaction between the mitochondrial fission protein Drp1 and hyperphosphorylated tau in Alzheimer's disease neurons: implications for mitochondrial dysfunction and neuronal damage. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 2538–47.
- Marco A., Cuesta A., Pedrola L., Palau F., Marín I. (2004) Evolutionary and structural analyses of GDAP1, involved in Charcot-Marie-Tooth disease, characterize a novel class of glutathione transferase-related genes. *Mol. Biol. Evol.* **21**, 176–87.
- Martin G. R. (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 7634–8.
- Martinez-Vicente M. (2015) Autophagy in neurodegenerative diseases: From pathogenic dysfunction to therapeutic modulation. *Semin. Cell Dev. Biol.* **40**, 115–126.
- Maury Y., Gauthier M., Peschanski M., Martinat C. (2012a) Human pluripotent stem cells for disease modelling and drug screening. *Bioessays* **34**, 61–71.
- Maury Y., Gauthier M., Peschanski M., Martinat C. (2012b) Human pluripotent stem cells for disease modelling and drug screening. *Bioessays* **34**, 61–71.
- McGill M. A., McGlade C. J. (2003) Mammalian numb proteins promote Notch1 receptor ubiquitination and degradation of the Notch1 intracellular domain. *J. Biol. Chem.* **278**, 23196–203.

- Mélin C., Perraud A., Bounaix Morand du Puch C., Loum E., Giraud S., Cardot P., Jauberteau M.-O., Lautrette C., Battu S., Mathonnet M. (2014) Sedimentation field flow fractionation monitoring of in vitro enrichment in cancer stem cells by specific serum-free culture medium. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **963**, 40–6.
- Miles G. B., Yohn D. C., Wichterle H., Jessell T. M., Rafuse V. F., Brownstone R. M. (2004) Functional properties of motoneurons derived from mouse embryonic stem cells. *J. Neurosci.* **24**, 7848–58.
- Miyoshi N., Ishii H., Nagano H., Haraguchi N., Dewi D. L., Kano Y., Nishikawa S., et al. (2011) Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell Stem Cell* **8**, 633–8.
- Nakagawa M., Koyanagi M., Tanabe K., Takahashi K., Ichisaka T., Aoi T., Okita K., Mochiduki Y., Takizawa N., Yamanaka S. (2008) Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat. Biotechnol.* **26**, 101–6.
- Nichols J., Evans E. P., Smith A. G. (1990) Establishment of germ-line-competent embryonic stem (ES) cells using differentiation inhibiting activity. *Development* **110**, 1341–8.
- Niemann A., Huber N., Wagner K. M., Somandin C., Horn M., Lebrun-Julien F., Angst B., et al. (2014) The Gdap1 knockout mouse mechanistically links redox control to Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain* **137**, 668–82.
- Niemann A., Ruegg M., Padula V. La, Schenone A., Suter U. (2005) Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *J. Cell Biol.* **170**, 1067–78.
- Niemann A., Wagner K. M., Ruegg M., Suter U. (2009) GDAP1 mutations differ in their effects on mitochondrial dynamics and apoptosis depending on the mode of inheritance. *Neurobiol. Dis.* **36**, 509–20.
- Nishimura K., Sano M., Ohtaka M., Furuta B., Umemura Y., Nakajima Y., Ikehara Y., et al. (2011) Development of defective and persistent Sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming. *J. Biol. Chem.* **286**, 4760–71.
- Nishio M., Saeki K. (2014) Differentiation of human pluripotent stem cells into highly functional classical brown adipocytes. *Methods Enzymol.* **537**, 177–97.
- Noack R., Frede S., Albrecht P., Henke N., Pfeiffer A., Knoll K., Dehmel T., et al. (2012) Charcot-Marie-Tooth disease CMT4A: GDAP1 increases cellular glutathione and the mitochondrial membrane potential. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 150–62.

- Oh S.-I., Lee C. K., Cho K. J., Lee K.-O., Cho S.-G., Hong S. (2012) Technological progress in generation of induced pluripotent stem cells for clinical applications. *ScientificWorldJournal*. **2012**, 417809.
- Ohta K., Kawano R., Ito N. (2012) Lactic acid bacteria convert human fibroblasts to multipotent cells. *PLoS One* **7**, e51866.
- Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S. (2007) Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* **448**, 313–7.
- Okita K., Matsumura Y., Sato Y., Okada A., Morizane A., Okamoto S., Hong H., et al. (2011) A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat. Methods* **8**, 409–12.
- Okita K., Nakagawa M., Hyenjong H., Ichisaka T., Yamanaka S. (2008) Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* **322**, 949–53.
- Pedrola L., Espert A., Wu X., Claramunt R., Shy M. E., Palau F. (2005) GDAP1, the protein causing Charcot-Marie-Tooth disease type 4A, is expressed in neurons and is associated with mitochondria. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 1087–94.
- Pla-Martín D., Calpena E., Lupo V., Márquez C., Rivas E., Sivera R., Sevilla T., Palau F., Espinós C. (2015) Junctophilin-1 is a modifier gene of GDAP1-related Charcot-Marie-Tooth disease. *Hum. Mol. Genet.* **24**, 213–29.
- Pla-Martín D., Rueda C. B., Estela A., Sánchez-Piris M., González-Sánchez P., Traba J., la Fuente S. de, et al. (2013) Silencing of the Charcot-Marie-Tooth disease-associated gene GDAP1 induces abnormal mitochondrial distribution and affects Ca²⁺ homeostasis by reducing store-operated Ca²⁺ entry. *Neurobiol. Dis.* **55**, 140–51.
- Polo J. M., Liu S., Figueroa M. E., Kulal W., Eminli S., Tan K. Y., Apostolou E., et al. (2010) Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* **28**, 848–55.
- Rakovic A., Seibler P., Klein C. (2015) iPS models of Parkin and PINK1. *Biochem. Soc. Trans.* **43**, 302–7.
- Ratajewski M., Pulaski L. (2009) YY1-dependent transcriptional regulation of the human GDAP1 gene. *Genomics* **94**, 407–13.
- Reichman S., Terray A., Slembrouck A., Nanteau C., Orioux G., Habeler W., Nandrot E. F., Sahel J.-A., Monville C., Goureau O. (2014) From confluent human iPS cells to self-forming neural retina and retinal pigmented epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 8518–23.

- Robel S., Berninger B., Götz M. (2011) The stem cell potential of glia: lessons from reactive gliosis. *Nat. Rev. Neurosci.* **12**, 88–104.
- Roegiers F., Jan Y. N. (2004) Asymmetric cell division. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, 195–205.
- Rowland A. A., Voeltz G. K. (2012) Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: function of the junction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 607–25.
- Ruberte E., Dolle P., Chambon P., Morriss-Kay G. (1991) Retinoic acid receptors and cellular retinoid binding proteins. II. Their differential pattern of transcription during early morphogenesis in mouse embryos. *Development* **111**, 45–60.
- Saotome M., Safiulina D., Szabadkai G., Das S., Fransson A., Aspenstrom P., Rizzuto R., Hajnóczky G. (2008) Bidirectional Ca²⁺-dependent control of mitochondrial dynamics by the Miro GTPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 20728–33.
- Saporta M. a, Dang V., Volfson D., Zou B., Xie X. S., Adebola A., Liem R. K., Shy M., Dimos J. T. (2015) Axonal Charcot-Marie-Tooth disease patient-derived motor neurons demonstrate disease-specific phenotypes including abnormal electrophysiological properties. *Exp. Neurol.* **263**, 190–9.
- Sarrazy V., Vedrenne N., Bordeau N., Billet F., Cardot P., Desmoulière A., Battu S. (2013) Fast astrocyte isolation by sedimentation field flow fractionation. *J. Chromatogr. A* **1289**, 88–93.
- Schon E. A., Area-Gomez E. (2013) Mitochondria-associated ER membranes in Alzheimer disease. *Mol. Cell. Neurosci.* **55**, 26–36.
- Senderek J. (2003) Mutations in the ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 (GDAP1) gene in intermediate type autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Brain* **126**, 642–649.
- Sereda M., Griffiths I., Pühlhofer A., Stewart H., Rossner M. J., Zimmermann F., Magyar J. P., et al. (1996) A Transgenic Rat Model of Charcot-Marie-Tooth Disease. *Neuron* **16**, 1049–1060.
- Shield A. J., Murray T. P., Board P. G. (2006) Functional characterisation of ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 as a glutathione transferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **347**, 859–66.
- Shio M. T., Christian J. G., Jung J. Y., Chang K.-P., Olivier M. (2015) PKC/ROS-Mediated NLRP3 Inflammasome Activation Is Attenuated by Leishmania Zinc-Metalloprotease during Infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **9**, e0003868.
- Shirendeb U. P., Calkins M. J., Manczak M., Anekonda V., Dufour B., McBride J. L., Mao P., Reddy P. H. (2012) Mutant huntingtin's interaction with mitochondrial protein Drp1

- impairs mitochondrial biogenesis and causes defective axonal transport and synaptic degeneration in Huntington's disease. *Hum. Mol. Genet.* **21**, 406–20.
- Singh Roy N., Nakano T., Xuing L., Kang J., Nedergaard M., Goldman S. A. (2005) Enhancer-specified GFP-based FACS purification of human spinal motor neurons from embryonic stem cells. *Exp. Neurol.* **196**, 224–34.
- Si-Tayeb K., Noto F. K., Sepac A., Sedlic F., Bosnjak Z. J., Lough J. W., Duncan S. A. (2010) Generation of human induced pluripotent stem cells by simple transient transfection of plasmid DNA encoding reprogramming factors. *BMC Dev. Biol.* **10**, 81.
- Smith A. G., Heath J. K., Donaldson D. D., Wong G. G., Moreau J., Stahl M., Rogers D. (1988) Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* **336**, 688–90.
- Soldner F., Hockemeyer D., Beard C., Gao Q., Bell G. W., Cook E. G., Hargus G., et al. (2009) Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* **136**, 964–77.
- Sommer C. A., Stadtfeld M., Murphy G. J., Hochedlinger K., Kotton D. N., Mostoslavsky G. (2009) Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells* **27**, 543–9.
- Stadtfeld M., Nagaya M., Utikal J., Weir G., Hochedlinger K. (2008) Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* **322**, 945–9.
- Stifani N. (2014) Motor neurons and the generation of spinal motor neuron diversity. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 293.
- Stuppia G., Rizzo F., Riboldi G., Bo R. Del, Nizzardo M., Simone C., Comi G. P., Bresolin N., Corti S. (2015) MFN2-related neuropathies: Clinical features, molecular pathogenesis and therapeutic perspectives. *J. Neurol. Sci.*
- Sun N., Panetta N. J., Gupta D. M., Wilson K. D., Lee A., Jia F., Hu S., et al. (2009) Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 15720–5.
- Takahashi K., Okita K., Nakagawa M., Yamanaka S. (2007a) Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat. Protoc.* **2**, 3081–9.
- Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. (2007b) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861–72.
- Takahashi K., Yamanaka S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663–76.

- Takebe T., Sekine K., Enomura M., Koike H., Kimura M., Ogaeri T., Zhang R.-R., et al. (2013) Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature* **499**, 481–4.
- Taveggia C., Zanazzi G., Petrylak A., Yano H., Rosenbluth J., Einheber S., Xu X., et al. (2005) Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons. *Neuron* **47**, 681–94.
- Tazir M., Hamadouche T., Nouioua S., Mathis S., Vallat J.-M. (2014) Hereditary motor and sensory neuropathies or Charcot–Marie–Tooth diseases: An update. *J. Neurol. Sci.* **347**, 14–22.
- Teodorczyk M., Schmidt M. H. H. (2014) Notching on Cancer’s Door: Notch Signaling in Brain Tumors. *Front. Oncol.* **4**, 341.
- Thomson J. A. (1998) Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science (80-.)*. **282**, 1145–1147.
- Tieu Q., Okreglak V., Naylor K., Nunnari J. (2002) The WD repeat protein, Mdv1p, functions as a molecular adaptor by interacting with Dnm1p and Fis1p during mitochondrial fission. *J. Cell Biol.* **158**, 445–52.
- Timmerman V., Strickland A. V., Züchner S. (2014) Genetics of Charcot-Marie-Tooth (CMT) Disease within the Frame of the Human Genome Project Success. *Genes (Basel)*. **5**, 13–32.
- Toli D., Buttigieg D., Blanchard S., Lemonnier T., Lamotte d’Incamps B., Bellouze S., Baillat G., Bohl D., Haase G. (2015) Modeling amyotrophic lateral sclerosis in pure human iPSc-derived motor neurons isolated by a novel FACS double selection technique. *Neurobiol. Dis.* **82**, 269–280.
- Vallat J., Funalot B. (2010) La maladie de Charcot-Marie-Tooth. *MS. Médecine Sci.* **26**.
- Vallat J.-M., Ouvrier R. A., Pollard J. D., Magdelaine C., Zhu D., Nicholson G. A., Grew S., Ryan M. M., Funalot B. (2008) Histopathological findings in hereditary motor and sensory neuropathy of axonal type with onset in early childhood associated with mitofusin 2 mutations. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **67**, 1097–102.
- Vance J. E. (2014) MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: lipids and beyond. *Biochim. Biophys. Acta* **1841**, 595–609.
- Vehviläinen P., Koistinaho J., Gundars G. (2014) Mechanisms of mutant SOD1 induced mitochondrial toxicity in amyotrophic lateral sclerosis. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 126.
- Wagner K. M., Rüegg M., Niemann A., Suter U. (2009) Targeting and function of the mitochondrial fission factor GDAP1 are dependent on its tail-anchor. *PLoS One* **4**, e5160.

- Wang R. N., Green J., Wang Z., Deng Y., Qiao M., Peabody M., Zhang Q., et al. (2014) Bone Morphogenetic Protein (BMP) signaling in development and human diseases. *Genes Dis.* **1**, 87–105.
- Watanabe K., Ueno M., Kamiya D., Nishiyama A., Matsumura M., Wataya T., Takahashi J. B., et al. (2007) A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **25**, 681–6.
- Westermann B. (2010) Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 872–84.
- Wichterle H., Lieberam I., Porter J. A., Jessell T. M. (2002) Directed Differentiation of Embryonic Stem Cells into Motor Neurons. *Cell* **110**, 385–397.
- Williams P. S., Lee S., Giddings J. C. (1994) Characterization of hydrodynamic lift forces by field-flow fractionation. Inertial and near-wall lift forces. *Chem. Eng. Commun.* **130**, 143–166.
- Williams R. L., Hilton D. J., Pease S., Willson T. A., Stewart C. L., Gearing D. P., Wagner E. F., Metcalf D., Nicola N. A., Gough N. M. (1988) Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* **336**, 684–7.
- Willis D. E., Twiss J. L. (2006) The evolving roles of axonally synthesized proteins in regeneration. *Curr. Opin. Neurobiol.* **16**, 111–118.
- Wobus A. M., Kaomei G., Shan J., Wellner M.-C., Rohwedel J., Guanju J., Fleischmann B., Katus H. A., Hescheler J., Franz W.-M. (1997) Retinoic Acid Accelerates Embryonic Stem Cell-Derived Cardiac Differentiation and Enhances Development of Ventricular Cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **29**, 1525–1539.
- Wurst W., Bally-Cuif L. (2001) Neural plate patterning: upstream and downstream of the isthmus organizer. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 99–108.
- Yamamoto S., Otsu M., Matsuzaka E., Konishi C., Takagi H., Hanada S., Mochizuki S., et al. (2015) Screening of drugs to treat 8p11 myeloproliferative syndrome using patient-derived induced pluripotent stem cells with fusion gene CEP110-FGFR1. *PLoS One* **10**, e0120841.
- Yamanaka S. (2009) A fresh look at iPS cells. *Cell* **137**, 13–7.
- Yang J., Andre P., Ye L., Yang Y.-Z. (2015) The Hedgehog signalling pathway in bone formation. *Int. J. Oral Sci.*
- Yoshioka N., Gros E., Li H.-R., Kumar S., Deacon D. C., Maron C., Muotri A. R., et al. (2013) Efficient generation of human iPSCs by a synthetic self-replicative RNA. *Cell Stem Cell* **13**, 246–54.

- Yu J., Hu K., Smuga-Otto K., Tian S., Stewart R., Slukvin I. I., Thomson J. A. (2009) Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* **324**, 797–801.
- Yu J., Vodyanik M. A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J. L., Tian S., Nie J., et al. (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**, 1917–20.
- Yuan A., Rao M. V., Veeranna, Nixon R. A. (2012) Neurofilaments at a glance. *J. Cell Sci.* **125**, 3257–63.
- Yuan X., Li W., Ding S. (2011) Small molecules in cellular reprogramming and differentiation. *Prog. Drug Res.* **67**, 253–66.
- Zhang J., Tsoi H., Li X., Wang H., Gao J., Wang K., Go M. Y., et al. (2015) Carbonic anhydrase IV inhibits colon cancer development by inhibiting the Wnt signalling pathway through targeting the WTAP-WT1-TBL1 axis. *Gut*, gutjnl-2014-308614.
- Zhang Z., Gao Y., Gordon A., Wang Z. Z., Qian Z., Wu W.-S. (2011) Efficient generation of fully reprogrammed human iPS cells via polycistronic retroviral vector and a new cocktail of chemical compounds. *PLoS One* **6**, e26592.
- Zhou H., Wu S., Joo J. Y., Zhu S., Han D. W., Lin T., Trauger S., et al. (2009) Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* **4**, 381–4.
- Zhu J., Chen W., Mi R., Zhou C., Reed N., Höke A. (2013) Ethoxyquin prevents chemotherapy-induced neurotoxicity via Hsp90 modulation. *Ann. Neurol.* **74**, 893–904.
- Züchner S., Mersiyanova I. V., Muglia M., Bissar-Tadmouri N., Rochelle J., Dadali E. L., Zappia M., et al. (2004) Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat. Genet.* **36**, 449–51.
- Zurn A. D., Winkel L., Menoud A., Djabali K., Aebischer P. (1996) Combined effects of GDNF, BDNF, and CNTF on motoneuron differentiation in vitro. *J. Neurosci. Res.* **44**, 133–41.

Annexes

Annexe I – Protéines associées aux « Mitochondrial-Associated endoplasmic reticulum Membrane » d'après (Schon and Area-Gomez 2013)

(pour les références se référer à l'article)

Table 1
Genes encoding proteins associated with MAM.

Protein	Function	Gene	Reference
Apoptosis			
Apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated 1	Pro-apoptotic protein; mito morphology	AIFM1	(Chiang et al., 2012)
BAP31 (B-cell receptor-associated protein 31)	Pro-apoptotic protein, w BCL2	BCAP31	(Iwasawa et al., 2011)
BCL2	Anti-apoptotic protein	BCL2	(Meunier and Hayashi, 2010)
HCLS1-binding protein 3 (HS1 binding protein 3)	Pro-apoptotic; binds 14-3-3 proteins	HS1BP3	(Shi et al., 2011)
Calcium homeostasis			
Ankyrin-B (Ankyrin-2)	Binds IP3R3, SIG1R	ANK2	(Hayashi and Su, 2001)
Calnexin	Calcium pumping	CANX	(Myhill et al., 2008)
Inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 1 (IP3R1)	Calcium homeostasis	ITPR1	(Szabadkai et al., 2006)
Inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 2 (IP3R2)	Calcium homeostasis	ITPR2	(Szabadkai et al., 2006)
Inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 3 (IP3R3)	Calcium homeostasis	ITPR3	(Mendes et al., 2005)
Promyelocytic leukemia tumor suppressor	Reg Ca; binds IP3R, AKT, PP2A	PML	(Giorgi et al., 2010)
Protein kinase AKT1 (PKB)	Reg phosphorylation of IP3R3, AKT	AKT1	(Giorgi et al., 2010)
Ryanodine receptor 1 (skeletal muscle)	Calcium homeostasis	RYR1	(Kopach et al., 2008)
Ryanodine receptor 2 (cardiac)	Calcium homeostasis	RYR2	(García-Pérez et al., 2008)
SERCA1 exon-11 spliced variant SIT (SERCA1T)	Amplifies ER stress; reg MAM	ATP2A1	(Chami et al., 2008)
Sigma-1 type non-opioid receptor (SIG1R; OPR51)	ER lipid transp; Ca signaling; sterol syn	SIGMAR1	(Hayashi and Su, 2007)
Cholesterol and lipid metabolism			
Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT1)	Cholesterol metabolism	SOAT1	(Rusinol et al., 1994)
Microsomal triglyceride transfer protein (MTP) large subunit	Lipoprotein transport	MTPP	(Rusinol et al., 1994)
Retinol-binding protein 1	Retinol transport; MAM-> lipid droplets	RBP1	(Jiang and Napoli, 2012)
ER-mitochondrial interactions			
Mitofusin-2	Regulator of ER-mito tethering	MFN2	(de Brito and Scorrano, 2008)
Phosphofurin acidic cluster sorting protein 2	MAM integrity; apoptosis	PACS2	(Simmen et al., 2005)
Presenilin-1 (PS1)	Catalytic component of γ -secretase	PSEN1	(Area-Gomez et al., 2009)
Presenilin-2 (PS2)	Catalytic component of γ -secretase	PSEN2	(Area-Gomez et al., 2009)
Ras-related protein Rab-32 (A-kinase anchoring protein)	Affects mito fission	RAB32	(Bui et al., 2010)
Reticulon 4 (NOGO), isoform B (RTN4B; NOGO-B)	ER tubulation; ER-mito tethering	RTN4	(Sutendra et al., 2011)
Trichoplein keratin filament-binding protein (mitostatatin)	Regulates ER-mito tethering, with MFN2	TCHP	(Cerqua et al., 2010)
ER stress			
Endoplasmic reticulum oxidoreductin-1-L-alpha	Associates with ERp44; regulates [Ca]	ERO1L	(Gilady et al., 2010)
Endoplasmic reticulum resident protein ERp44	Retention of proteins in ER	ERP44	(Gilady et al., 2010)
ER lipid raft protein 1 (ERLIN-1; SPFH1)	Targets IP3Rs for degradation in ERAD	ERLIN1	(Browman et al., 2006)
ER lipid raft protein 2 (ERLIN-2; SPFH2)	Targets IP3Rs for degradation in ERAD	ERLIN2	(Browman et al., 2006)
Glucose-regulated protein 75-kDa (GRP75; mortalin-2)	Binds VDAC	HSPA9	(Szabadkai et al., 2006)
Glucose-regulated protein 78-kDa (GRP78; BiP)	ER stress; chaperone	HSPA5	(Hayashi and Su, 2007)
Heme oxygenase-1 (HO1; HSP32)	Heme catabolism (heme-> biliverdin)	HMOX1	(Lynes et al., 2012)
Protein disulfide-isomerase A1 (PDI A1)	Retention of proteins in ER	PDHAB	(Hoffstrom et al., 2010)
Protein disulfide-isomerase A3 (ERp57; GRP58)	Retention of proteins in ER	PDI A3	(Hoffstrom et al., 2010)
Src homology and collagen, 66-kDa isoform (p66Shc)	Redox regulator	SHC1	(Lieberzinska et al., 2009)
Fatty acid metabolism			
Acyl-CoA desaturase (stearoyl-CoA desaturase)	Fatty acid metabolism	SCD	(Man et al., 2006)
Fatty acid transport protein 4 (FATP4)	Fatty acid transport	SLC27A4	(Jia et al., 2007)
Fatty acid-CoA ligase, long-chain 1 (FACL1)	Fatty acid metabolism	ACSL1	(Lewin et al., 2002)
Fatty acid-CoA ligase, long-chain 4 (FACL4)	Fatty acid metabolism	ACSL4	(Lewin et al., 2002)
Glucose metabolism			
Glucose-6-phosphatase	Glucose homeostasis	G6PC	(Bionda et al., 2004)
Lectin, mannose-binding 1 (p58; ERGIC-53)	Mannose-specific lectin	LMAN1	(Rusinol et al., 1994)
Inflammation and immunity			
Haptoglobin (actually prohaptoglobin)	Cleaved to haptoglobin by C1RL in MAM	HP	(Wassler and Fries, 1993)
Inflammasome component NLRP3 (NALP3)	Inflammasome	NLRP3	(Zhou et al., 2011)
Inflammasome adaptor ASC	Inflammasome	PYCARD	(Zhou et al., 2011)
Mitochondrial antiviral signaling protein	Activates NF- κ B/IRF3; involved in immunity	MAVS	(Horner et al., 2011)
RNA helicase (RIG-1)	Recruited to mitos by MAVS	DDX58	(Horner et al., 2011)
Thioredoxin interacting protein TXNIP	Binds NLRP3	TXNIP	(Zhou et al., 2011)
Stimulator of interferon genes (STING)	Interacts with MAVS	TMEM173	(Horner et al., 2011)
Mitochondria-related proteins			
Dynamin-related protein 1 (DLP1, DRP1)	With MFF at ER tubule-mito contacts	DNM1L	(Friedman et al., 2011)
Fission 1 homologue	Mitochondrial fission	FIS1	(Iwasawa et al., 2011)
Mitochondrial fission factor (MFF)	With DRP1 at ER tubule-mito contacts	MFF	(Friedman et al., 2011)
Voltage-dependent anion channel 1 (Porin 1)	Ion exchange	VDAC1	(Szabadkai et al., 2006)
Phospholipid, glycolipid, and triglyceride metabolism			
Acyl-CoA:lysocardiolipin acyltransferase 1 (ALCAT1)	Cardiolipin acyl chain remodeling	LCLAT1	(Kinoshita and Inoue, 2000)
Alpha-1,4 mannosyltransferase	GPI syn; mannosyltransferase	PIGM	(Kinoshita and Inoue, 2000)
Beta-1,4N-acetylgalactosaminyltransferase 1 (SIAT2)	Ganglioside synthesis	B4GALNT1	(Ardail et al., 2003)
Beta-1,4-galactosyltransferase 6	Glycosphingolipid metabolism	B4GALT6	(Ardail et al., 2003)
Beta-galactoside alpha(2-3) sialyltransferase (SIAT4)	Ganglioside synthesis	ST3GAL1	(Ardail et al., 2003)
Beta-galactoside alpha(2-6) sialyltransferase (SIAT1)	Ganglioside synthesis	ST6GAL1	(Ardail et al., 2003)
Diacylglycerol O-acyltransferase 2	Triglyceride metabolism	DGAT2	(Stone et al., 2009)
Ethanolaminephosphate transferase	GPI syn; transferase	PIGN	(Kinoshita and Inoue, 2000)
Glycerol-3-phosphate acyltransferase 1 (GPAT1)	Phospholipid synthesis	GPAM	(Pellon-Maison et al., 2007)
N-acetylglucosaminyl-phosphatidylinositol de-N-acetylase	GPI syn; deacetylase	PIGL	(Pottekat and Menon, 2004)
Plectin 1b ("cytolinker" protein), mito isoform	Binds int filaments; controls mito shape	PLEC1	(Cerqua et al., 2010)
Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase	Phospholipid metabolism	PEMT	(Vance et al., 1997)

Table 1 (continued)

Protein	Function	Gene	Reference
Phosphatidylserine synthase 1 (PSS1)	Phospholipid metab; ceramide turnover	PTDSS1	(Stone and Vance, 2000)
Phosphatidylserine synthase 2 (PSS2)	Phospholipid metab; ceramide turnover	PTDSS2	(Stone and Vance, 2000)
Serine active site containing 1 (SERAC1)	Phospholipid metab; cholesterol trafficking	SERAC1	(Ardail et al., 2003)
UDP-glucose ceramide glucosyltransferase	Glycosphingolipid metabolism	UGCG	(Ardail et al., 2003)
Other			
ABC protein, subfamily C (CFTR/MRP), member 6	Orphan transporter; function unknown	ABCC6	(Martin et al., 2012)
Autocrine motility factor receptor 2 (GP78)	Ubiquitination	AMFR	(Goetz et al., 2007)
Basigin/CD147/EMMPRIN	Regulatory component of γ -secretase	BSG	(Hashimoto et al., 2006)
Prion protein preproprotein (PrPc)	Membrane GPI-anchored glycoprotein	PRNP	(Mattei et al., 2011)

Annexe II – Séquences de référence ADN et protéique de GDAP1

→ Ex1-F
 1 ATGGCTGAGAGGCAGGAAAGAGCAGAGAGGGAGCCCGCCCTTGAGGGCGGAAGGCAAGGCC
 1 -M--A--E--R--Q--E--E--Q--R--G--S--P--P--L--R--A--E--G--K--A--

 61 GACGCGGAGGTTAAGCTCATTCTGTACCATTGGACGCATTCCCTTCAGCTCTCAAAAGGTG
 21 -D--A--E--V--K--L--I--L--Y--H--W--T--H--S--F--S--S--Q--K--V--

 121 CGCTTGGTAATTGCTGAAAAGGCATTGAAGTGCAGGAAACATGATGTAAGTCTGCCCTTG
 41 -R--L--V--I--A--E--K--A--L--K--C--E--E--H--D--V--S--L--P--L--

 181 AGTGAGCACAATGAGCCTTGGTTTATGCGTTTGAAC TCAACTGGAGAAAGTGCTGTCTT
 61 -S--E--H--N--E--P--W--F--M--R--L--N--S--T--G--E--V--P--V--L--

 241 ATCCACGGGGAAAACATAATTTGTGAGGCCACTCAGATCATTGATTATCTTGAACAGACT
 81 -I--H--G--E--N--I--I--C--E--A--T--Q--I--I--D--Y--L--E--Q--T--

 301 TTCCTGGATGAAAGAACACCCAGGTTAATGCCTGATAAAGAAAGCATGTATTACCCACGG
 101 -F--L--D--E--R--T--P--R--L--M--P--D--K--E--S--M--Y--P--R--

→
 361 GTACAACATTACCGAGAGCTGCTTGACTCCCTTGCCAATGGATGCCTATACACATGGCTGC
 121 -V--Q--H--Y--R--E--L--L--D--S--L--P--M--D--A--Y--T--H--G--C--

→ F' ← Ex3-R
 421 ATTTTACATCCTGAGTTAACTGTGGACTCCATGATCCCGGCTTATGCAACTACAAGGATT
 141 -I--L--H--P--E--L--T--V--D--S--M--I--P--A--Y--A--T--T--R--I--

→ Ex4-F
 481 CGTAGCCAAATTGGAAACACAGAGTCTGAGCTGAAGAAACTTGCTGAAGAAAACCCAGAT
 161 -R--S--Q--I--G--N--T--E--S--E--L--K--K--L--A--E--E--N--P--D--

 541 TTACAAGAAGCATAACATTGCAAAACAGAAACGACTTAAATCAAAGCTGCTTGATCATGAC
 181 -L--Q--E--A--Y--I--A--K--Q--K--R--L--K--S--K--L--L--D--H--D--

← R'
 601 AATGTCAAGTATTTGAAGAAAATTCTTGATGAGTTGGAGAAAAGTCTTGGATCAGGTTGAA
 201 -N--V--K--Y--L--K--K--I--L--D--E--L--E--K--V--L--D--Q--V--E--

 661 ACTGAATTGCAAAGAAGAAATGAAGAAACCCAGAAGAGGGCCAGCAACCTTGGCTCTGC
 221 -T--E--L--Q--R--R--N--E--E--T--P--E--E--G--Q--Q--P--W--L--C--

 721 GGTGAATCCTTCACCCTGGCAGACGTCTCACTCGCTGTCACATTGCATCGACTGAAGTTC
 241 -G--E--S--F--T--L--A--D--V--S--L--A--V--T--L--H--R--L--K--F--

 781 CTGGGGTTTGAAGGAGAAAAC TGGGGAAAACGAAAAGCGAACCAACTTGGAAACCTATTAC
 261 -L--G--F--A--R--R--N--W--G--N--G--K--R--P--N--L--E--T--Y--Y--

 841 GAGCGTGTCTTGAAGAGAAAACATTTAACAAGGTTTTAGGACATGTCAACAATATATTA
 281 -E--R--V--L--K--R--K--T--F--N--K--V--L--G--H--V--N--N--I--L--

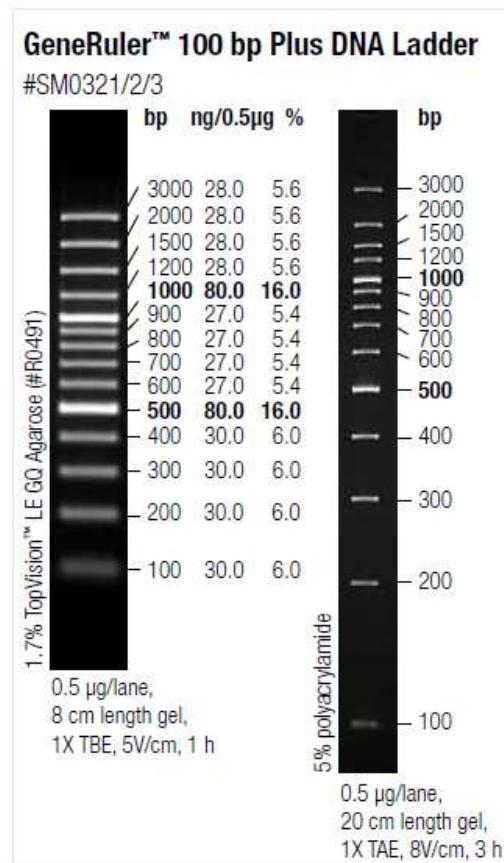
← Ex6-R
 901 ATCTCTGCAGTGTGCCAACAGCATTCCGGGTGGCCAAGAAAAGGGCCCAAAAAGTTCTT
 301 -I--S--A--V--L--P--T--A--F--R--V--A--K--K--R--A--P--K--V--L--

 961 GGCACGACCCTTGTGGTTGGTTTGTCTGCAGGAGTGGGATATTTGCTTTTATGCTTTTC
 321 -G--T--T--L--V--V--G--L--L--A--G--V--G--Y--F--A--F--M--L--F--

 1021 AGAAAGAGGCTTGGCAGCATGATATTAGCATT TAGACCCAGACCAAAT TATTTCTAG
 341 -R--K--R--L--G--S--M--I--L--A--F--R--P--R--P--N--Y--F--*--

Annexe III - Liste des amorces, taille des amplifiats et marqueur de poids moléculaire

Nom de l'amorce	Séquence	Tm	Taille de l'amplifiat pour	
			ADNc	ADNg
GDAP1-Ex1-F	5' CAAGATGGCTGAGAGGCAG	60 °C	477 pb	9 845 pb
GDAP1-Ex3-R	5' CCTTGTAGTTGCATAAGCCG	60 °C		
GDAP1-Ex4-F	5' ACAGAGTCTGAGCTGAAGAAA	60 °C	422 pb	2313 pb
GDAP1-Ex6-R	5' TGTTGGCAGCACTGCAGAG	60 °C		
GDAP1-F'	5' TGGCTGCATTTTACATCCTG	56 °C	238 pb	2771 pb
GDAP1-R'	5' GATCCAAGACTTTCTCCA ACT	56°C		



Annexe IV – Valeurs de référence pour l'étude électroneuromyographique au CHU de Limoges

Nerf	Amplitude	Vitesse	Latence distale	Onde F
Moteur	mV	m/s	ms	ms
Médian	4	46	4	32
Ulnaire	4,8	46	3,5	32
SPE	2	40	5,6	55
SPI	5	40	6,5	55
Sensitif	μV	m/s		
Médian	7	47		
Ulnaire	5	48		
Radial	10	48		
Sural	7	41		
Musculo-cutané (M. inf)	7	41		

Annexe V – Version en vigueur de l'article L2151-5 du 7 août 2013 relative à la bioéthique

En savoir plus sur ce texte  **Legifrance**.gouv.fr
LE SERVICE PUBLIC DE LA DIFFUSION DU DROIT
JORF n°0182 du 7 août 2013 page 13449
texte n° 1

LOI LOI n° 2013-715 du 6 août 2013 tendant à modifier la loi n° 2011-814 du 7 juillet 2011 relative à la bioéthique en autorisant sous certaines conditions la recherche sur l'embryon et les cellules souches embryonnaires

NOR: ESRX1241473L
ELI: <http://www.legifrance.gouv.fr/eli/loi/2013/8/6/ESRX1241473L/jo/texte>
Alias: <http://www.legifrance.gouv.fr/eli/loi/2013/8/6/2013-715/jo/texte>

L'Assemblée nationale et le Sénat ont adopté,
Vu la décision du Conseil constitutionnel n° 2013-674 DC en date du 1er août 2013 ;
Le Président de la République promulgue la loi dont la teneur suit :

Article unique.

L'article L. 2151-5 du code de la santé publique est ainsi rédigé :

« Art. L. 2151-5.-I. — Aucune recherche sur l'embryon humain ni sur les cellules souches embryonnaires ne peut être entreprise sans autorisation. Un protocole de recherche conduit sur un embryon humain ou sur des cellules souches embryonnaires issues d'un embryon humain ne peut être autorisé que si :

« 1° La pertinence scientifique de la recherche est établie ;

« 2° La recherche, fondamentale ou appliquée, s'inscrit dans une finalité médicale ;

« 3° En l'état des connaissances scientifiques, cette recherche ne peut être menée sans recourir à ces embryons ou ces cellules souches embryonnaires ;

« 4° Le projet et les conditions de mise en œuvre du protocole respectent les principes éthiques relatifs à la recherche sur l'embryon et les cellules souches embryonnaires.

« II. — Une recherche ne peut être menée qu'à partir d'embryons conçus in vitro dans le cadre d'une assistance médicale à la procréation et qui ne font plus l'objet d'un projet parental. La recherche ne peut être effectuée qu'avec le consentement écrit préalable du couple dont les embryons sont issus, ou du membre survivant de ce couple, par ailleurs dûment informés des possibilités d'accueil des embryons par un autre couple ou d'arrêt de leur conservation. A l'exception des situations mentionnées au dernier alinéa de l'article L. 2131-4 et au troisième alinéa de l'article L. 2141-3, le consentement doit être confirmé à l'issue d'un délai de réflexion de trois mois. Le consentement des deux membres du couple ou du membre survivant du couple est révocable sans motif tant que les recherches n'ont pas débuté.

« III. — Les protocoles de recherche sont autorisés par l'Agence de la biomédecine après vérification que les conditions posées au I du présent article sont satisfaites. La décision de l'agence, assortie de l'avis du conseil d'orientation, est communiquée aux ministres chargés de la santé et de la recherche qui peuvent, dans un délai d'un mois et conjointement, demander un nouvel examen du dossier ayant servi de fondement à la décision :

« 1° En cas de doute sur le respect des principes éthiques ou sur la pertinence scientifique d'un protocole autorisé. L'agence procède à ce nouvel examen dans un délai de trente jours. En cas de confirmation de la décision, la validation du protocole est réputée acquise ;

« 2° Dans l'intérêt de la santé publique ou de la recherche scientifique, lorsque le protocole a été refusé. L'agence procède à ce nouvel examen dans un délai de trente jours. En cas de confirmation de la décision, le refus du protocole est réputé acquis.

« En cas de violation des prescriptions législatives et réglementaires ou de celles fixées par l'autorisation, l'agence suspend l'autorisation de la recherche ou la retire. L'agence diligente des inspections comprenant un ou des experts n'ayant aucun lien avec l'équipe de recherche dans les conditions fixées à l'article L. 1418-2.

« IV. — Les embryons sur lesquels une recherche a été conduite ne peuvent être transférés à des fins de gestation.

»

La présente loi sera exécutée comme loi de l'Etat.

Fait à Paris, le 6 août 2013.

François Hollande

Annexe VI – Résumé selon (Hoffman and Carpenter 2005) des différents types de différenciations de cellules hES en 2005

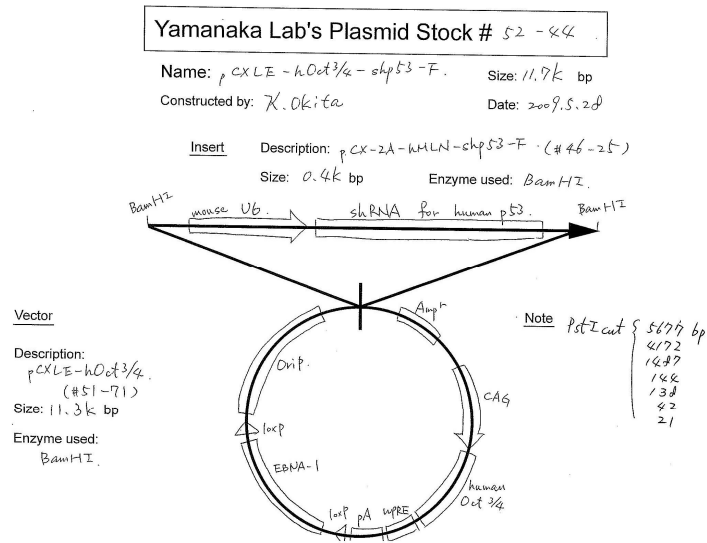
(pour les références se référer à l'article)

Table 2 Summary of differentiation of hES cells				
Cell type	Comments	Cell lines	Reference	
General Differentiation				
Endoderm, ectoderm and mesoderm derivatives	Analysis of mRNA expression of various markers after growth factor treatment of hES cell-derived EBs.	H9, H1	69	
Endoderm, ectoderm and mesoderm derivatives	Analysis of expression of various markers using PCR and immunocytochemistry.	H9	70	
Endoderm, ectoderm and mesoderm derivatives	Analysis of gene expression during differentiation using microarrays.	H9, H13	71	
Mesoderm				
Cardiomyocytes	Evaluation of structural and functional properties.	H9,2	72	
Cardiomyocytes	High resolution electrophysiology.	H9,2	73	
Cardiomyocytes	Differentiation into enriched, populations of functional cardiomyocytes.	H1, H7, H9	74	
Cardiomyocytes	Differentiation into cardiomyocytes.	HES2	75	
Cardiomyocytes	Characterization of hES cell-derived cardiomyocytes.		76	
Cardiomyocytes	Evaluation of electrophysiological and pharmacological properties	H1, H7, H9, H14	77	
Cardiomyocytes	Differentiation into cardiomyocytes by co-culture with END-2 cells.	HES2	78	
Cardiomyocytes	Evaluation of ultrastructural and proliferative characteristics.	H9,2	79	
Cardiomyocytes	Evaluation of electrophysiological and pharmacological properties.	H9,2	80	
Cardiomyocytes	Demonstration of functional integration after transplantation into guinea pig model.	H1	81	
Hematopoietic colony-forming cells	Differentiation of multipotent hematopoietic precursors.	H1, H1.1, H9,2	18	
Hematopoietic progenitor cells	Differentiation of multipotent CD45 ⁺ hematopoietic precursors.	H1, H9	82	
Hematopoietic progenitor cells	Differentiation of multipotent CD34 ⁺ hematopoietic precursors.	H1, H9	83	
Leucocytes	Differentiation into antigen-presenting leucocytes.	H1	84	
Endothelial cells	Isolation and characterization of hES cell-derived endothelial cells.	H9	85	
Endothelial	Identification of primitive endothelial-like cells that generate endothelial and hematopoietic cells.	H1, H9	86	
Endothelial	Evaluation of endothelial markers during spontaneous differentiation.	H9,2	87	
Vasculogenesis	Vasculogenesis using alginate scaffolding.	H9,2, H13	88	
Vasculogenesis	Vasculogenesis in teratomas.	H9,2, H13, I6	89	

Table 2 (continued)				
Cell type	Comments	Cell lines	Reference	
Ectoderm				
Neurons	RA and NGF enhance neuronal differentiation.	H9	90	
Neurons and glia	Differentiation into enriched populations of functional neurons and neural progenitors.	H1, H7, H9	91	
Neurons and glia	Differentiation into neural progenitors, neurons and glia. Transplantation into neonatal rats.	H1, H9, H9,2	92	
Neurons and glia	Differentiation into neural progenitors, neurons and glia. Transplantation into neonatal rats.	HES1	93	
Neurons	Differentiation into neural precursors and neurons.	BG01, BG02	94	
Neurons	Differentiation into dopaminergic neurons. Transplantation into Parkinsonian rats, resulting in functional improvement.	HES-1	95	
Neural precursors	Differentiation into neural precursors.	HES-2, HES-3	59	
Neurons	Differentiation into midbrain dopaminergic neurons.	H1, H9, HES-3	96	
Neurons	Differentiation into dopaminergic neurons.	BG01, BG03	97	
Neurons	Differentiation into dopaminergic neurons.	BG01	98	
Neurons	Differentiation into dopaminergic neurons.	MB03	99	
Neurons	Differentiation into motoneurons.	H1, H9	100	
Oligodendrocytes	Differentiation into enriched populations of oligodendrocytes and myelination after transplantation.	H7	101	
Endoderm				
Insulin positive cells	Differentiation into insulin positive clusters.	H9	102	
Insulin-producing cells	Differentiation into insulin producing clusters.	H9, H9,2, H13, I6	103	
Hepatocyte-like cells	Differentiation into enriched populations of hepatocyte-like cells.	H1, H9	104	
Hepatocyte-like cells	Differentiation into hepatocyte-like cells	N/A	105	
Trophoblast				
Trophoblast	Differentiation into trophoblast cells.	H1, H7, H9, H14	58	
Trophoblast	Identification of trophoblast cells in EBs.	H1	106	
Germ cells				
Germ cells	Spontaneous differentiation of germ cells.	HSF-1, HSF-6, H9	107	

RA, retinoic acid; NGF, nerve growth factor; EBs, embryoid bodies.

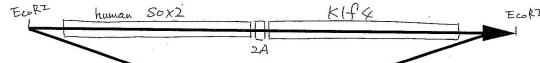
Annexe VII – Plasmides de S. Yamanaka utilisés pour la reprogrammation



Yamanaka Lab's Plasmid Stock # 51-74

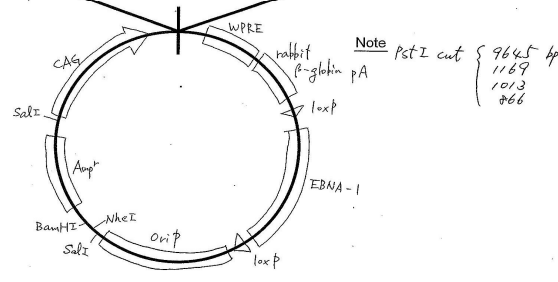
Name: pCXLE-hSK Size: 12.7k bp
 Constructed by: X. Okita Date: May 2009

Insert Description: pBS-hSox2-2A-Klf4 (486-3p)
 Size: 2.5k bp Enzyme used: EcoRI



Vector

Description: pCXLE-GFP (451-69)
 Size: 10.2k bp
 Enzyme used: EcoRI



Yamanaka Lab's Plasmid Stock # 52-2d

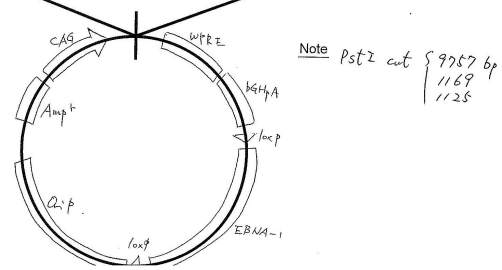
Name: pCXLE-hUL Size: 12.1k bp
 Constructed by: X. Okita Date: 2009.5.19

Insert Description: pCX-hUL
 Size: 1.9k bp Enzyme used: EcoRI

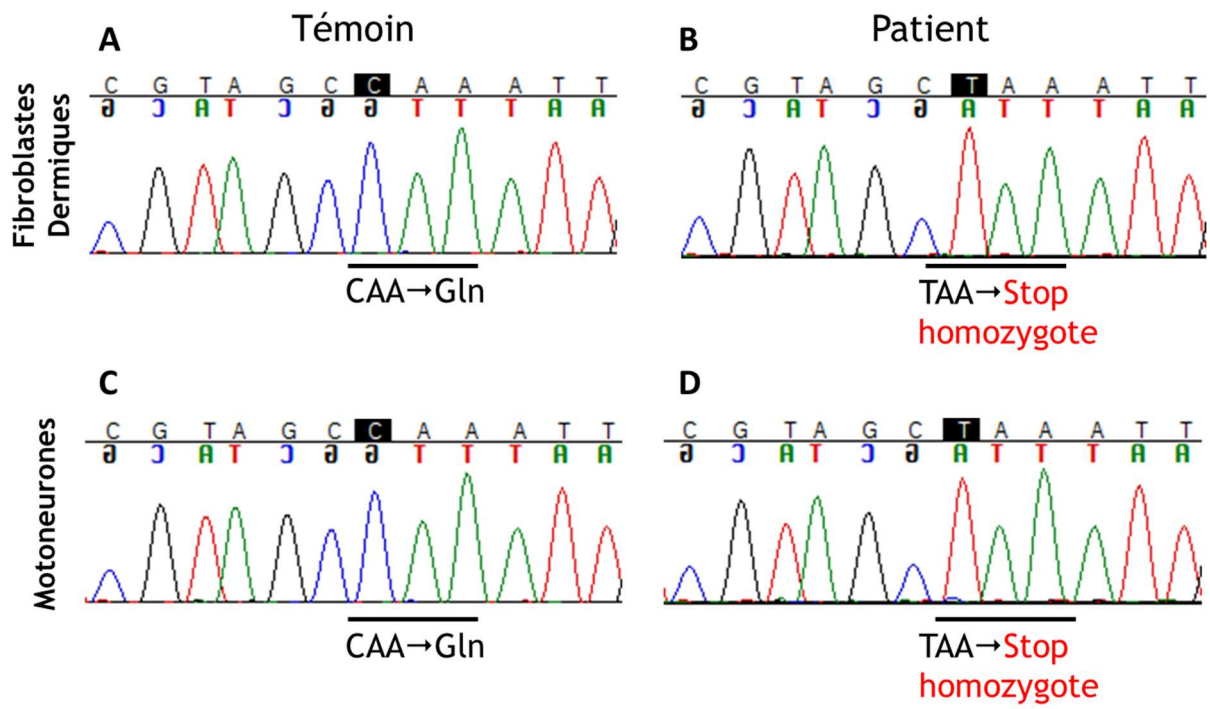


Vector

Description: pCXLE-GFP (451-69)
 Size: 10.2k bp
 Enzyme used: EcoRI



Annexe VIII – Séquences nucléiques de *GDAP1* du contrôle et du patient obtenu après extraction des ARN des fibroblastes dermiques et des motoneurones (après différenciation des iPSc)



Annexe IX – Identification des protéines après spectroscopie de masse (Relatif à l'article SdFFF)

Fraction F2 - bande 1 (~90kDa)								
Hits	Access Number	Protein description	Score	Cover	Mass	pI	emPAI	
1	EBP1_HUMAN	Erythrosomal protein Os-Homo sapiens GN=EBP1 PE=1 SV=3	1289	48	57,2%	69370	5,94	5,53
2	GFPT1_HUMAN	Glutamine-fructose-6-phosphate aminotransferase (aspartate) 1 Os-Homo sapiens GN=GFPT1 PE=1 SV=3	1209	29	49,6%	78756	6,56	2,18
3	K2C1_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 1 Os-Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=2	879	20	25,3%	65999	8,15	1,65
4	VPS35_HUMAN	Vacuolar protein sorting-associated protein 35 Os-Homo sapiens GN=VPS35 PE=1 SV=2	793	20	29,1%	91649	5,32	1,12
5	SC23A_HUMAN	Protein transport protein Sec23A Os-Homo sapiens GN=SEC23A PE=1 SV=2	740	16	24,7%	86105	6,64	0,96
6	CAN1_HUMAN	Calpain-1 catalytic subunit Os-Homo sapiens GN=CAN1 PE=1 SV=1	699	20	29,6%	81838	5,49	1,32
7	PSC3_HUMAN	Delta-3-pyrroline-5-carboxylate synthase Os-Homo sapiens GN=ALDH3B1 PE=1 SV=2	667	17	25,5%	87248	6,66	0,79
8	FLOD1_HUMAN	Procollagen type2 alpha1(I)5 domainase 1 Os-Homo sapiens GN=FLOD1 PE=1 SV=2	587	17	28,7%	83497	6,47	1,09
9	PKAM_HUMAN	ATP-dependent K+ phosphotransferase, muscle type Os-Homo sapiens GN=PKAM PE=1 SV=2	565	18	23,1%	85128	8,23	0,89
11	CALD1_HUMAN	Caldesmon Os-Homo sapiens GN=CALD1 PE=1 SV=3	517	13	18,2%	93175	5,62	0,53
13	MARK3_HUMAN	Methylcrotonyl carboxylase subunit Os-Homo sapiens GN=MARK3 PE=1 SV=4	496	6	30,4%	31336	4,47	0,76
14	GRP78_HUMAN	78 kDa glucose-regulated protein Os-Homo sapiens GN=HSPA78 PE=1 SV=2	392	13	27,7%	72388	5,07	0,82
15	FUBP2_HUMAN	Far upstream element-binding protein 2 Os-Homo sapiens GN=FUBP2 PE=1 SV=1	390	13	19,3%	73070	6,85	0,64
18	SRCB_HUMAN	Src substrate contact Os-Homo sapiens GN=CTTNB1 PE=1 SV=2	337	15	24,4%	61549	5,24	0,91
19	SYT1_HUMAN	Threonine-tRNA ligase, cytoplasmic Os-Homo sapiens GN=SYT1 PE=1 SV=1	317	15	23,1%	83882	6,23	0,68
20	ACPI_HUMAN	Acylamino acid-releasing enzyme Os-Homo sapiens GN=ACPI PE=1 SV=4	304	7	12,0%	81173	5,29	0,31
22	CUL3_HUMAN	Cullin-3 Os-Homo sapiens GN=CUL3 PE=1 SV=2	257	11	15,0%	88972	8,68	0,39
23	LYRC1_HUMAN	Protein LYRC1 Os-Homo sapiens GN=LYRC1 PE=1 SV=2	247	8	17,9%	63799	9,33	0,57
24	FLAK_HUMAN	Junction plaaglobin Os-Homo sapiens GN=FLAK PE=1 SV=3	243	6	8,9%	81693	5,75	0,25
25	CUL5_HUMAN	Cullin-5 Os-Homo sapiens GN=CUL5 PE=1 SV=4	240	10	11,9%	90997	8,08	0,38
26	PKAP_HUMAN	ATP-dependent cytochrome b5 reductase, placental type Os-Homo sapiens GN=PKAP PE=1 SV=2	230	9	12,9%	85542	7,5	0,29
28	4F2_HUMAN	4F2 cell-surface antigen heavy chain Os-Homo sapiens GN=SC2B2 PE=1 SV=1	196	7	12,9%	67952	4,89	0,45
31	LUM_HUMAN	Lumican Os-Homo sapiens GN=LUM PE=1 SV=2	162	5	21,0%	38405	6,16	0,45
32	ZYX_HUMAN	Zyxin Os-Homo sapiens GN=ZYX PE=1 SV=1	159	4	11,2%	61238	6,22	0,27
35	SCRB2_HUMAN	Liposome membrane protein 2 Os-Homo sapiens GN=SCRB2 PE=1 SV=2	145	4	6,1%	54255	5	0,3
36	NCP1_HUMAN	Nuclear cap-binding protein subunit 1 Os-Homo sapiens GN=NCP1 PE=1 SV=2	139	4	5,4%	91781	5,99	0,17
37	SYCC_HUMAN	Cysteine-tRNA ligase, cytoplasmic Os-Homo sapiens GN=SYCC PE=1 SV=3	124	8	11,1%	85419	6,31	0,24
40	HNRPU_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U1 Os-Homo sapiens GN=HNRPU PE=1 SV=6	116	3	5,1%	90528	5,76	0,08
42	IF4B_HUMAN	Eukaryotic translation initiation factor 4B Os-Homo sapiens GN=IF4B PE=1 SV=2	109	3	5,1%	89110	5,55	0,17
43	HSS0B_HUMAN	Heat shock protein HSP90-beta Os-Homo sapiens GN=HSP90B1 PE=1 SV=4	109	3	4,3%	83212	4,97	0,09
44	UROM_HUMAN	Uromodulin Os-Homo sapiens GN=UROM PE=1 SV=1	106	3	8,0%	69714	5,05	0,05
45	MIRD2_HUMAN	Mitochondrial Rho GTPase 2 Os-Homo sapiens GN=MIRD2 PE=1 SV=2	105	3	6,5%	68075	5,55	0,11
48	COG7_HUMAN	Conserved oligomeric Golgi complex subunit 7 Os-Homo sapiens GN=COG7 PE=1 SV=1	101	5	6,5%	86289	5,27	0,09
49	GTPB1_HUMAN	GTP-binding protein 1 Os-Homo sapiens GN=GTPB1 PE=1 SV=3	96	2	3,9%	72408	8,6	0,11
50	TRF3_HUMAN	Trypsin-3 Os-Homo sapiens GN=PRSS3 PE=1 SV=2	91	2	10,9%	31508	7,46	0,12
51	CUL2_HUMAN	Cullin-2 Os-Homo sapiens GN=CUL2 PE=1 SV=2	90	3	7,3%	86517	8,45	0,18
52	DNM1L_HUMAN	Dynamitin-1 like protein Os-Homo sapiens GN=DNM1L PE=1 SV=2	88	5	5,6%	81826	6,37	0,14
55	EXOC3_HUMAN	Exocyst complex component 3 Os-Homo sapiens GN=EXOC3 PE=1 SV=2	83	2	3,4%	86790	5,8	0,04
62	SFO1_HUMAN	Splicing factor 1 Os-Homo sapiens GN=SFI1 PE=1 SV=4	76	3	5,0%	88286	9,07	0,11
70	TRE1_HUMAN	Serotoninsin Os-Homo sapiens GN=TP PE=1 SV=3	69	2	3,2%	77014	6,81	0,05
75	MCM7_HUMAN	DNA replication licensing factor MCM7 Os-Homo sapiens GN=MCM7 PE=1 SV=4	61	5	7,0%	81267	6,08	0,09

Fraction F2 - bande 2 (~70kDa)								
Hits	Access Number	Protein description	Score	Matches	Cover	Mass	pI	emPAI
1	ANEK6_HUMAN	Anexin A6 Os-Homo sapiens GN=ANEK6 PE=1 SV=3	1581	43	55,6%	75826	5,42	4,58
2	PLT_HUMAN	Plastin-3 Os-Homo sapiens GN=PLS3 PE=1 SV=4	1381	34	57,8%	70766	5,43	2,77
3	TKT_HUMAN	Transketolase Os-Homo sapiens GN=TKT PE=1 SV=3	1376	32	43,7%	67835	7,58	2,23
4	RPN1_HUMAN	Dolichyl-diphosphooligotriaccharide-protein glycosyltransferase subunit 1 Os-Homo sapiens GN=RPN1 PE=1 SV=1	1165	32	47,3%	68527	5,96	2,95
5	LMNB1_HUMAN	Lamin B1 Os-Homo sapiens GN=LMNB1 PE=1 SV=2	1012	22	41,6%	66368	5,11	1,81
6	HSP71_HUMAN	Heat shock 70 kDa protein 1A/2B Os-Homo sapiens GN=HSPA7A PE=1 SV=5	983	23	39,2%	70009	5,48	1,81
8	K2C1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1 Os-Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6	640	16	27,2%	65999	8,15	1,27
9	CMC2_HUMAN	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar2 Os-Homo sapiens GN=SC25A12 PE=1 SV=2	619	16	26,4%	74129	8,79	0,98
10	XKCC5_HUMAN	X-ray repair cross-complementing protein 5 Os-Homo sapiens GN=XKCC5 PE=1 SV=2	609	17	33,7%	69799	6,23	1,07
11	SYFR_HUMAN	Phenylalanine-tRNA ligase beta subunit Os-Homo sapiens GN=ARS3 PE=1 SV=3	433	14	26,0%	66074	6,4	0,93
12	SDHA_HUMAN	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein subunit, mitochondrial Os-Homo sapiens GN=SDHA PE=1 SV=2	427	11	19,7%	72645	7,06	0,57
13	AMPB_HUMAN	Aminopeptidase B Os-Homo sapiens GN=AMPB PE=1 SV=2	376	10	18,9%	72549	5,51	0,65
15	IF2B3_HUMAN	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3 Os-Homo sapiens GN=IGFBP3 PE=1 SV=2	367	14	23,7%	63666	8,99	0,97
18	LRCAT_HUMAN	Leucine-rich repeat-containing protein 47 Os-Homo sapiens GN=LRCAT PE=1 SV=1	337	12	22,1%	63434	8,55	0,67
19	RFA1_HUMAN	Replication protein A 70 kDa DNA-binding subunit Os-Homo sapiens GN=RPA1 PE=1 SV=2	324	11	21,9%	68095	6,92	0,61
20	IF2B1_HUMAN	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1 Os-Homo sapiens GN=IGFBP1 PE=1 SV=2	299	9	18,0%	63441	9,26	0,58
21	ALBU_HUMAN	Serum albumin Os-Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2	297	15	11,0%	69321	5,92	0,52
22	SYT1_HUMAN	Arginine-tRNA ligase, cytoplasmic Os-Homo sapiens GN=ARS1 PE=1 SV=2	296	10	19,8%	75331	6,26	0,54
23	IF2B2_HUMAN	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2 Os-Homo sapiens GN=IGFBP2 PE=1 SV=2	281	9	17,5%	66081	8,48	0,55
24	DDP2_HUMAN	Dihydrodipicolinate decarboxylase cofactor, mitochondrial Os-Homo sapiens GN=DDP2 PE=1 SV=3	259	7	15,6%	68953	7,96	0,37
25	EJAK2_HUMAN	Interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase Os-Homo sapiens GN=EIF2AK2 PE=1 SV=1	257	6	11,8%	62056	8,58	0,42
26	NPL4_HUMAN	Nuclear protein localization protein 4 homolog Os-Homo sapiens GN=NPL4 PE=1 SV=3	239	5	11,0%	68077	5,94	0,24
27	FUS_HUMAN	FUS RNA-binding protein FUS Os-Homo sapiens GN=FUS PE=1 SV=1	233	3	8,6%	53394	9,4	0,22
28	CMC1_HUMAN	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1 Os-Homo sapiens GN=SC25A12 PE=1 SV=2	229	9	11,2%	74715	8,58	0,34
29	DDX17_HUMAN	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17 Os-Homo sapiens GN=DDX17 PE=1 SV=2	184	8	11,7%	80222	8,53	0,2
31	EBP1_HUMAN	Erythrosomal protein Os-Homo sapiens GN=EBP1 PE=1 SV=3	169	4	8,5%	69770	5,94	0,23
32	LUM_HUMAN	Lumican Os-Homo sapiens GN=LUM PE=1 SV=2	163	7	23,7%	38405	6,16	0,59
33	PTN11_HUMAN	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11 Os-Homo sapiens GN=PTN11 PE=1 SV=2	159	4	8,2%	68993	6,87	0,17
34	AIFM1_HUMAN	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial Os-Homo sapiens GN=AIFM1 PE=1 SV=1	156	5	9,1%	66859	9,04	0,18
35	ANMS_HUMAN	Protein arginine N-methyltransferase 5 Os-Homo sapiens GN=ANMS PE=1 SV=4	155	7	11,3%	72638	5,88	0,35
36	KHDR1_HUMAN	Kin domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 1 Os-Homo sapiens GN=KHDR1 PE=1 SV=1	153	4	10,6%	48197	8,73	0,35
38	UROM_HUMAN	Uromodulin Os-Homo sapiens GN=UROM PE=1 SV=1	139	1	2,8%	69714	5,05	0,05
39	NRPB_HUMAN	Nuclear receptor-binding protein Os-Homo sapiens GN=NRPB PE=1 SV=1	138	3	6,9%	59807	5,02	0,02
41	GALT1_HUMAN	Polypeptide N-acetylglucosaminyltransferase 1 Os-Homo sapiens GN=GALT1 PE=1 SV=1	127	5	9,5%	64177	7,83	0,25
42	FXR1_HUMAN	Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1 Os-Homo sapiens GN=FXR1 PE=1 SV=2	123	3	5,0%	60678	5,84	0,17
47	RS7A_HUMAN	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27A Os-Homo sapiens GN=RP27A PE=1 SV=2	94	5	21,2%	17953	9,68	0,79
48	TRV3_HUMAN	Trypsin-3 Os-Homo sapiens GN=PRSS3 PE=1 SV=2	93	1	4,3%	32508	7,46	0,12
49	RBM39_HUMAN	RNA-binding protein 39 Os-Homo sapiens GN=RBM39 PE=1 SV=2	92	3	6,2%	59343	10,1	0,13
50	PDLU5_HUMAN	PDZ and LIM domain protein 5 Os-Homo sapiens GN=PDLU5 PE=1 SV=5	90	5	8,2%	63904	8,55	0,18
53	TDP2_HUMAN	Torsin-1A-interacting protein 2 Os-Homo sapiens GN=TOR1AIP2 PE=1 SV=1	81	1	3,2%	51232	4,84	0,07
56	STAM1_HUMAN	Signal transducing adapter molecule 1 Os-Homo sapiens GN=STAM1 PE=1 SV=3	74	2	5,9%	59142	4,7	0,06
57	LRC4B_HUMAN	Leucine-rich repeat-containing protein 40 Os-Homo sapiens GN=LRC4B PE=1 SV=1	74	5	5,6%	68207	6,04	0,17
58	PKGIM_HUMAN	Phosphoenolpyruvate carboxykinase [GTP] mitochondrial Os-Homo sapiens GN=PKG1 PE=1 SV=3	73	4	6,1%	70685	7,57	0,11
59	IRGQ_HUMAN	Immunity-related GTPase family G protein Os-Homo sapiens GN=IRGQ PE=1 SV=1	73	4	6,6%	62678	4,81	0,12
70	DGD_HUMAN	Dermcidin Os-Homo sapiens GN=DGD PE=1 SV=2	60	1	10,0%	11277	6,08	0,35
74	HHRPM_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M1 Os-Homo sapiens GN=HHRPM PE=1 SV=3	59	6	8,2%	77464	8,84	0,15

Fraction F2 - bande 3 (~65kDa)								
Hits	Access Number	Protein description	Score	Matches	Cover	empAI		
1	KZC1_HUMAN	Keratin, type I cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6	1212	27	40.4%	65999	8.15	2.33
2	CHD3_HUMAN	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPD1 PE=1 SV=2	1147	23	48.3%	61016	5.7	2.26
4	TOPA_HUMAN	T-complex protein 1 subunit alpha OS=Homo sapiens GN=TCP1A PE=1 SV=3	1038	28	56.8%	60306	5.8	2.52
6	2AAA_HUMAN	Serine/threonine-protein phosphatase 2A G54 domain regulatory subunit A alpha isoform OS=Homo sapiens GN=PPP2R1A PE=1 SV=4	885	21	42.6%	65267	5.7	1.86
7	TCPE_HUMAN	T-complex protein 1 subunit zeta OS=Homo sapiens GN=CCT6 PE=1 SV=3	811	17	37.1%	57988	6.23	1.71
9	PHH2_HUMAN	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-2 OS=Homo sapiens GN=H4H2 PE=1 SV=2	686	16	33.1%	60864	5.49	1.59
10	DPY13_HUMAN	Dihydropyrimidine related protein 3 OS=Homo sapiens GN=DPY13 PE=1 SV=2	622	14	29.8%	61924	6.04	1.13
11	PHH1A_HUMAN	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1 OS=Homo sapiens GN=H4H1A PE=1 SV=2	614	13	31.1%	61011	5.7	1.16
12	KPYM_HUMAN	Pyruvate kinase PKM OS=Homo sapiens GN=PKM PE=1 SV=4	538	13	29.9%	57900	7.06	0.98
13	EHD1_HUMAN	EH1 domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=EHD1 PE=1 SV=2	451	14	25.3%	60589	6.35	0.93
14	IPN2_HUMAN	Dolichyl dihydroepiandrosterone protein glycosyltransferase subunit 2 OS=Homo sapiens GN=IPN2 PE=1 SV=3	394	6	15.7%	69241	5.44	0.33
15	TCP2_HUMAN	T-complex protein 1 subunit zeta OS=Homo sapiens GN=CCT2 PE=1 SV=1	364	11	22.0%	59633	5.45	0.95
18	COPD_HUMAN	Cosmeamer subunit delta OS=Homo sapiens GN=ARH1 PE=1 SV=1	243	11	21.9%	57174	5.89	0.56
20	ALBU_HUMAN	Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2	227	7	8.7%	69321	5.92	0.37
22	DHAX_HUMAN	Bifunctional ATP-dependent dihydroxyacetone kinase/FAD-AMP lyase (oxidizing) OS=Homo sapiens GN=DHAX PE=1 SV=2	215	6	14.6%	58910	7.12	0.36
23	BGAL_HUMAN	Beta-galactosidase OS=Homo sapiens GN=GLB1 PE=1 SV=2	199	6	11.1%	76027	6.1	0.27
24	PDAS_HUMAN	Protein disulfide-isomerase AS OS=Homo sapiens GN=PDAS PE=1 SV=1	181	8	15.4%	59556	8.08	0.62
26	CALR_HUMAN	Calreticulin OS=Homo sapiens GN=CALR PE=1 SV=1	171	5	14.8%	48112	4.29	0.45
29	PDH1_HUMAN	Protein disulfide-isomerase OS=Homo sapiens GN=H4H1 PE=1 SV=2	169	9	14.4%	57081	4.76	0.66
30	UZAF2_HUMAN	Splicing factor UZAF2 subunit OS=Homo sapiens GN=UZAF2 PE=1 SV=4	161	3	9.9%	53467	5.19	0.22
31	PGMS_HUMAN	Phosphoglucomutase-like protein 5 OS=Homo sapiens GN=PGMS PE=1 SV=2	146	4	7.9%	62186	6.81	0.26
33	UL1A_HUMAN	NDC80-activating enzyme E1 regulatory subunit OS=Homo sapiens GN=NAE1 PE=1 SV=1	120	4	8.4%	60209	5.25	0.2
34	UROD_HUMAN	Uromodulin OS=Homo sapiens GN=UMOD PE=1 SV=1	119	1	2.8%	69714	5.05	0.05
35	PAK2_HUMAN	Serine/threonine protein kinase PAK 2 OS=Homo sapiens GN=PAK2 PE=1 SV=3	112	4	7.3%	58006	5.69	0.28
36	NUDC1_HUMAN	Nucleic acid domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=NUDC1 PE=1 SV=2	111	3	5.3%	66713	4.99	0.18
37	PUF60_HUMAN	Poly(U) binding splicing factor PUF60 OS=Homo sapiens GN=PUF60 PE=1 SV=1	111	4	7.5%	59838	5.19	0.13
38	TBA1A_HUMAN	Tubulin alpha-1A chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1A PE=1 SV=1	109	4	9.3%	50104	4.54	0.24
39	EF2A_HUMAN	Eukaryotic translation initiation factor 2A OS=Homo sapiens GN=EF2A PE=1 SV=3	100	5	8.2%	64549	9	0.12
41	AP3_HUMAN	Apoptosis inhibitor 5 OS=Homo sapiens GN=AP5 PE=1 SV=3	90	5	9.7%	58568	6.59	0.2
42	TCOY_HUMAN	T-complex protein 1 subunit theta OS=Homo sapiens GN=CCT9 PE=1 SV=4	90	3	5.5%	59583	5.42	0.13
43	ZC3H9_HUMAN	Zinc finger CCH1 domain-containing protein 15 OS=Homo sapiens GN=ZC3H9 PE=1 SV=1	87	5	7.0%	48573	5.22	0.08
44	CHMP7_HUMAN	Charged multivesicular body protein 7 OS=Homo sapiens GN=CHMP7 PE=1 SV=1	83	3	7.5%	50879	5.26	0.15
45	SMH2_HUMAN	Putative adenosylhomocysteinase 2 OS=Homo sapiens GN=AHCL1 PE=1 SV=2	83	2	3.8%	58913	6.49	0.13
46	UBP1_HUMAN	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14 OS=Homo sapiens GN=USP14 PE=1 SV=3	81	4	7.3%	56033	5.2	0.07
48	CKAP1_HUMAN	Cytoskeleton associated protein 4 OS=Homo sapiens GN=CKAP1 PE=1 SV=2	77	3	5.8%	65983	5.63	0.12
51	TRX3_HUMAN	Thyroxine 3 OS=Homo sapiens GN=PRSS3 PE=1 SV=2	67	1	4.3%	32508	7.46	0.12
52	TXT_HUMAN	Transketolase OS=Homo sapiens GN=TXT PE=1 SV=3	67	2	3.9%	67835	7.58	0.11
53	CPNE3_HUMAN	Copine 3 OS=Homo sapiens GN=CPNE3 PE=1 SV=1	66	2	3.7%	60092	5.6	0.13
54	HNRPK_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Homo sapiens GN=HNRPK PE=1 SV=1	63	2	5.0%	50944	5.39	0.07
55	NUCB1_HUMAN	Nucleobindin-1 OS=Homo sapiens GN=NUCB1 PE=1 SV=4	63	3	6.7%	53846	5.15	0.14
59	EF1A1_HUMAN	Elongation factor 1 alpha 1 OS=Homo sapiens GN=EF1A1 PE=1 SV=1	59	3	7.6%	50109	9.1	0.07
61	GPAAL1_HUMAN	Glycophosphatidylinositol anchor attachment 1 protein OS=Homo sapiens GN=GPAAL1 PE=1 SV=3	53	3	4.2%	67580	8.16	0.11

Fraction F2 - bande 4 (~63kDa)								
Hits	Access Number	Protein description	Score	Matches	Cover	empAI		
1	CHD3_HUMAN	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPD1 PE=1 SV=2	2950	52	69.1%	61016	5.7	9.64
2	KPYM_HUMAN	Pyruvate kinase PKM OS=Homo sapiens GN=PKM PE=1 SV=4	1958	42	60.6%	57900	7.96	6.81
3	TCPE_HUMAN	T-complex protein 1 subunit theta OS=Homo sapiens GN=CCT9 PE=1 SV=4	1239	34	52.6%	59583	5.42	4.79
4	PDH1_HUMAN	Protein disulfide-isomerase OS=Homo sapiens GN=H4H1 PE=1 SV=2	1083	26	54.5%	57081	4.76	3.86
5	KZC1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT1 PE=1 SV=6	995	20	41.3%	65999	8.15	1.83
6	CALR_HUMAN	Calreticulin OS=Homo sapiens GN=CALR PE=1 SV=1	763	18	41.0%	48112	4.29	1.85
7	GDH_HUMAN	Rab GDP dissociation inhibitor alpha OS=Homo sapiens GN=GBI1 PE=1 SV=2	743	22	57.9%	50550	5	3.16
8	TCPE_HUMAN	T-complex protein 1 subunit epsilon OS=Homo sapiens GN=CCT5 PE=1 SV=4	717	27	50.5%	59633	5.45	3.03
9	SYIC_HUMAN	Tyrosine-tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=VARS PE=1 SV=4	683	26	45.3%	59106	6.61	3.08
11	PHH1A_HUMAN	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-1 OS=Homo sapiens GN=H4H1A PE=1 SV=2	552	11	24.2%	61011	5.7	0.81
14	PHH2_HUMAN	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha-2 OS=Homo sapiens GN=H4H2 PE=1 SV=2	440	12	26.5%	60864	5.49	0.92
15	CPNE3_HUMAN	Copine 3 OS=Homo sapiens GN=CPNE3 PE=1 SV=1	410	14	27.2%	60092	5.6	0.94
16	PDAS_HUMAN	Protein disulfide-isomerase AS OS=Homo sapiens GN=PDAS PE=1 SV=1	409	18	35.6%	59556	8.08	1.2
17	UBP1_HUMAN	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14 OS=Homo sapiens GN=USP14 PE=1 SV=3	393	17	22.9%	56033	5.2	1.31
18	TBA1B_HUMAN	Tubulin alpha-1B chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1B PE=1 SV=1	338	9	21.1%	50120	4.94	0.78
19	OKSI1_HUMAN	Serine/threonine-protein kinase OKSI1 OS=Homo sapiens GN=OKSI1 PE=1 SV=1	298	9	14.2%	57986	6.03	0.55
21	TCPE_HUMAN	T-complex protein 1 subunit zeta OS=Homo sapiens GN=CCT6 PE=1 SV=3	270	10	19.2%	57988	6.23	0.45
23	PDH3_HUMAN	Protein disulfide-isomerase A3 OS=Homo sapiens GN=PDH3 PE=1 SV=1	252	7	21.4%	56747	5.98	0.56
24	FTO_HUMAN	Alpha helix-loop-dependent oligopeptidase FTO OS=Homo sapiens GN=FTO PE=1 SV=1	248	12	24.6%	58245	5.1	0.54
25	COR1C_HUMAN	Coronin-1C OS=Homo sapiens GN=COR1C PE=1 SV=1	236	4	10.3%	53115	6.65	0.31
26	IMAH_HUMAN	Importin subunit alpha-4 OS=Homo sapiens GN=ICPNA3 PE=1 SV=2	224	4	11.5%	57775	4.8	0.28
27	HDAC2_HUMAN	Histone deacetylase 2 OS=Homo sapiens GN=HDAC2 PE=1 SV=1	222	6	15.4%	55329	5.59	0.48
28	POCD4_HUMAN	Programmed cell death 4 OS=Homo sapiens GN=POCD4 PE=1 SV=2	221	6	16.0%	51703	5.07	0.52
29	RD2B3_HUMAN	UV excision repair protein RAD23 homolog B OS=Homo sapiens GN=RD2B3 PE=1 SV=1	218	7	18.6%	43145	4.79	0.79
30	HORN_HUMAN	Hornin OS=Homo sapiens GN=HORN PE=1 SV=2	217	2	1.3%	282228	10.05	0.03
31	UGDH_HUMAN	UDP-glucose 6-dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=UGDH PE=1 SV=1	204	6	15.4%	54989	6.73	0.48
32	E1B2B_HUMAN	Translation initiation factor eIF-2B subunit delta OS=Homo sapiens GN=EIF2B4 PE=1 SV=2	201	4	10.1%	57521	9.45	0.29
33	ALBU_HUMAN	Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALB PE=1 SV=2	201	7	11.2%	69321	5.92	0.23
34	NUCB1_HUMAN	Nucleobindin-1 OS=Homo sapiens GN=NUCB1 PE=1 SV=4	191	4	9.8%	53846	5.15	0.31
35	NP1L1_HUMAN	Nucleosome assembly protein 1-like 1 OS=Homo sapiens GN=NP1L1 PE=1 SV=1	164	4	14.6%	45346	4.36	0.37
36	SAC1_HUMAN	Phosphatidylinositol phosphate SAC1 OS=Homo sapiens GN=SAC1 PE=1 SV=2	154	8	11.9%	66524	6.86	0.38
37	COCT3_HUMAN	Parafibrinon OS=Homo sapiens GN=COCT3 PE=1 SV=1	151	5	9.4%	60539	9.63	0.2
38	BGAL_HUMAN	Beta-galactosidase OS=Homo sapiens GN=GLB1 PE=1 SV=2	149	5	9.6%	76027	6.1	0.15
40	EHD3_HUMAN	EH1 domain-containing protein 3 OS=Homo sapiens GN=EHD3 PE=1 SV=2	146	4	7.9%	60849	6.12	0.19
41	HNRPK_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Homo sapiens GN=HNRPK PE=1 SV=1	144	4	11.9%	50944	5.39	0.24
42	SCES_HUMAN	Synaptonemal complex protein SCES OS=Homo sapiens GN=EFEE4 PE=1 SV=1	127	5	11.7%	50349	4.68	0.43
43	PAK2_HUMAN	Serine/threonine-protein kinase PAK 2 OS=Homo sapiens GN=PAK2 PE=1 SV=3	121	3	7.6%	58006	5.69	0.13
44	AL4A1_HUMAN	Delta 1 pyridoxal 5-carboxylate dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ALDH4A1 PE=1 SV=3	113	4	8.5%	61681	8.25	0.12
48	PP2B1_HUMAN	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit alpha isoform OS=Homo sapiens GN=PPP2CA PE=1 SV=1	102	3	6.1%	58650	5.58	0.13
49	ARSA_HUMAN	Arylsulfatase A OS=Homo sapiens GN=ARSA PE=1 SV=3	99	2	7.5%	53554	5.85	0.14
50	TRX3_HUMAN	Thyroxine 3 OS=Homo sapiens GN=PRSS3 PE=1 SV=2	96	2	9.2%	32508	7.46	0.12
52	KFIR_HUMAN	Pyruvate kinase PKLR OS=Homo sapiens GN=PKLR PE=1 SV=2	95	2	4.7%	61791	7.64	0.12
55	LS14A_HUMAN	Protein LSM14A homolog A OS=Homo sapiens GN=LSM14A PE=1 SV=3	82	1	2.2%	50499	9.55	0.07
56	LBR_HUMAN	Lamin B receptor OS=Homo sapiens GN=LBR PE=1 SV=2	76	4	6.2%	70658	9.41	0.11
57	TXNRD1_HUMAN	Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=TXNRD1 PE=1 SV=3	75	1	1.7%	70862	7.16	0.05
58	DCD_HUMAN	Dmrt domain OS=Homo sapiens GN=DCD PE=1 SV=2	74	1	10.0%	11377	6.08	0.35
59	SYIC_HUMAN	Serine-tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=VARS PE=1 SV=4	73	5	9.7%	59106	6.05	0.2
61	RS27A_HUMAN	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a OS=Homo sapiens GN=RS27A PE=1 SV=2	71	1	10.3%	17953	9.68	0.21
62	CKAP4_HUMAN	Cytoskeleton-associated protein 4 OS=Homo sapiens GN=CKAP4 PE=1 SV=2	63	2	3.2%	65983	5.63	0.06

Fraction F2 - bande 5 (~60kDa)						
Hits	Access Number	Protein description	Score	Matches	Cover	Mass
1	PDAB_HUMAN	Protein disulfide-isomerase OS=Homo sapiens GN=PDAB PE=1 SV=5	1889	47	62.0%	57081
3	CALR_HUMAN	Calreticulin OS=Homo sapiens GN=CALR PE=1 SV=1	1496	38	57.8%	49112
5	UGDH_HUMAN	UDP-glucose 6-dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=UGDH PE=1 SV=4	1245	28	65.6%	54889
6	KCTD_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT11 PE=1 SV=6	1058	25	38.7%	60999
8	TCPI1_HUMAN	T-complex protein 1 subunit beta OS=Homo sapiens GN=TCPT1 PE=1 SV=2	735	19	40.7%	59329
9	KPVM_HUMAN	Pyruvate kinase PKM OS=Homo sapiens GN=PKM PE=1 SV=4	605	14	34.5%	57900
10	PDAB_HUMAN	Protein disulfide-isomerase A3 OS=Homo sapiens GN=PDAB3 PE=1 SV=4	595	16	35.8%	56747
11	TCPL1_HUMAN	T-complex protein 1 subunit beta OS=Homo sapiens GN=TCPT1 PE=1 SV=2	498	12	25.9%	59583
12	CHSD_HUMAN	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=HSPD1 PE=1 SV=2	492	13	24.8%	60356
13	PRSL_HUMAN	26S protease regulatory subunit 4 OS=Homo sapiens GN=PRSL4 PE=1 SV=1	462	15	38.0%	49154
14	SYSC_HUMAN	Serine-3RNA ligase, cytosolic OS=Homo sapiens GN=SYSC PE=1 SV=1	433	16	33.3%	56740
15	TCPO_HUMAN	T-complex protein 1 subunit delta OS=Homo sapiens GN=TCPT4 PE=1 SV=1	432	15	27.5%	57888
16	SCS5_HUMAN	Synaptonemal complex protein SC55 OS=Homo sapiens GN=SCS5 PE=1 SV=1	413	11	25.7%	50349
17	TBA1B_HUMAN	Tubulin alpha-1B chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1B PE=1 SV=1	379	9	20.5%	50120
18	TCM1_HUMAN	Target of Myb protein 1 OS=Homo sapiens GN=TCM1 PE=1 SV=2	360	9	22.8%	53785
19	NONO_HUMAN	Non-PQ1 domain containing octamer binding protein OS=Homo sapiens GN=NONO PE=1 SV=4	350	11	32.7%	54397
20	ROSO_HUMAN	60 kDa SS-A/Ro ribonucleoprotein OS=Homo sapiens GN=ROSO PE=1 SV=1	347	11	19.7%	60681
21	TRXK1_HUMAN	Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=TRXK1 PE=1 SV=3	340	8	14.5%	70862
24	ROD3B_HUMAN	UV excision repair protein RAD3B homolog B OS=Homo sapiens GN=ROD3B PE=1 SV=1	279	9	23.2%	43345
27	VIME_HUMAN	Vimentin OS=Homo sapiens GN=VIM PE=1 SV=4	264	10	25.1%	53619
28	SYF3_HUMAN	Tyrosine-3RNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=SYF3 PE=1 SV=1	264	14	28.0%	59306
29	SPF32_HUMAN	Splicing factor 3A subunit 2 OS=Homo sapiens GN=SPF32 PE=1 SV=1	250	6	16.6%	58812
30	NCLN_HUMAN	Nucleolin OS=Homo sapiens GN=NCLN PE=1 SV=2	244	8	14.9%	62955
31	SWA1_HUMAN	Phenylalanine-tRNA ligase alpha subunit OS=Homo sapiens GN=SWA1 PE=1 SV=3	222	8	15.7%	57528
32	HNRNP_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Homo sapiens GN=HNRNP_K PE=1 SV=1	211	7	23.8%	50944
33	PP5C_HUMAN	Serine/threonine-protein phosphatase 5 OS=Homo sapiens GN=PP5C PE=1 SV=1	209	6	14.2%	56842
34	PTP2B_HUMAN	Protein tyrosine phosphatase 2 OS=Homo sapiens GN=PTP2B PE=1 SV=1	207	3	10.2%	57386
39	DFNAP_HUMAN	Non-amyloid fibrinogen precursor protein OS=Homo sapiens GN=DFNAP PE=1 SV=2	162	5	11.7%	54520
41	MCCB_HUMAN	Methylcronyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=MCCB PE=1 SV=1	146	3	6.4%	61204
42	ALBU_HUMAN	Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALBU PE=1 SV=2	144	8	11.8%	69321
45	SNTC1_HUMAN	Cytosolic beta 5-nucleotidase OS=Homo sapiens GN=SNTC1 PE=1 SV=1	139	6	11.4%	64938
46	PRP2A_HUMAN	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit alpha isoform OS=Homo sapiens GN=PRP2A PE=1 SV=1	137	5	11.1%	56550
47	COR1C_HUMAN	Coronin-3 OS=Homo sapiens GN=COR1C PE=1 SV=1	137	4	7.6%	53215
48	TAM3_HUMAN	Protein disulfide-isomerase TAM3 OS=Homo sapiens GN=TAM3 PE=1 SV=1	136	5	10.4%	51839
49	CP57_HUMAN	Chaperone and polyubiquitination specificity factor subunit 7 OS=Homo sapiens GN=CP57 PE=1 SV=1	132	3	5.6%	52018
50	HYE5_HUMAN	Bifunctional hydrolase 2 OS=Homo sapiens GN=HYE5 PE=1 SV=1	130	4	8.8%	62575
51	MPPK_HUMAN	MAGUK 3 domain family member 6 OS=Homo sapiens GN=MPPK PE=1 SV=2	128	5	10.0%	62079
55	SAC_HUMAN	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase Src OS=Homo sapiens GN=SAC PE=1 SV=3	119	5	8.7%	59797
56	GOR2_HUMAN	Golgi reassembly, stacking protein 2 OS=Homo sapiens GN=GOR2 PE=1 SV=1	119	3	11.9%	47136
58	NP1LL_HUMAN	Nucleosome assembly protein 1 like 1 OS=Homo sapiens GN=NP1LL PE=1 SV=1	115	3	10.0%	45346
59	DLDH_HUMAN	Dihydrolyipid methylase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=DLDH PE=1 SV=2	114	4	8.4%	54143
60	EF1A1_HUMAN	Elongation factor 1-alpha 1 OS=Homo sapiens GN=EF1A1 PE=1 SV=1	110	5	13.4%	50309
62	IMA7_HUMAN	Importin subunit alpha 7 OS=Homo sapiens GN=IMA7 PE=1 SV=1	107	4	9.7%	59991
64	TRYS_HUMAN	Trypsin-3 OS=Homo sapiens GN=PRSS3 PE=1 SV=2	106	1	4.7%	32508
65	RCC2_HUMAN	Protein RCC2 OS=Homo sapiens GN=RCC2 PE=1 SV=2	105	6	10.5%	56049
66	LAMP1_HUMAN	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase-like protein 1 OS=Homo sapiens GN=LAMP1 PE=1 SV=2	102	2	5.1%	56934
67	DDB9A_HUMAN	ATP-dependent RNA helicase DDB9A OS=Homo sapiens GN=DDB9A PE=1 SV=1	100	5	12.8%	53941
70	VDR_HUMAN	Vitamin D binding protein OS=Homo sapiens GN=VDR PE=1 SV=1	97	3	5.3%	52929
71	NP1LL_HUMAN	Nucleosome assembly protein 1 like 4 OS=Homo sapiens GN=NP1LL PE=1 SV=1	92	2	9.7%	42797
72	RTCB_HUMAN	TRNA-splicing leucine homolog OS=Homo sapiens GN=RTCB PE=1 SV=1	92	3	6.9%	55375
73	TUBB_HUMAN	Tubulin beta chain OS=Homo sapiens GN=TUBB PE=1 SV=2	91	4	5.5%	49639
74	TRXK1_HUMAN	Tyrosine 3 OS=Homo sapiens GN=PRSS3 PE=1 SV=1	90	2	8.1%	25841
75	CNKL_HUMAN	Golgi reassembly, stacking protein 1 OS=Homo sapiens GN=CNKL PE=1 SV=4	86	4	7.9%	55501
79	DNAU1_HUMAN	DNAI1 homolog subfamily C member 7 OS=Homo sapiens GN=DNAU1 PE=1 SV=2	79	3	6.7%	56405
80	IMDH2_HUMAN	Inosine 5'-monophosphate dehydrogenase 2 OS=Homo sapiens GN=IMDH2 PE=1 SV=2	77	2	4.7%	55730
81	GDI1_HUMAN	RAB GDP-dissociation inhibitor 1 OS=Homo sapiens GN=GDI1 PE=1 SV=2	77	3	8.3%	50550
84	MSTO1_HUMAN	Protein myo10 homolog 1 OS=Homo sapiens GN=MSTO1 PE=1 SV=1	68	2	3.5%	61796
85	TRG_HUMAN	Protein TRG OS=Homo sapiens GN=TRG PE=1 SV=2	66	1	2.5%	43421
86	LMAN1_HUMAN	Protein ERGIC3 OS=Homo sapiens GN=LMAN1 PE=1 SV=2	66	1	2.2%	57513
87	KDELL_HUMAN	KDEL motif-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=KDELL1 PE=1 SV=1	65	2	4.4%	58025
88	MMP14_HUMAN	Matrix metalloproteinase 14 OS=Homo sapiens GN=MMP14 PE=1 SV=3	64	3	1.4%	65852
89	EF2_HUMAN	Elongation factor 2 OS=Homo sapiens GN=EF2 PE=1 SV=4	64	2	2.7%	95277
91	MCE3_HUMAN	mRNA cap guanine-N7 methyltransferase OS=Homo sapiens GN=MCE3 PE=1 SV=1	63	3	6.7%	54829

Fraction F2 - bande 6 (~50kDa)						
Hits	Access Number	Protein description	Score	Matches	Cover	Mass
1	ATPE_HUMAN	ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATPE5 PE=1 SV=3	1729	33	65.6%	55525
2	PDAB_HUMAN	Protein disulfide-isomerase A3 OS=Homo sapiens GN=PDAB3 PE=1 SV=4	1139	24	40.9%	48091
4	KCT1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT11 PE=1 SV=6	631	19	28.4%	60999
6	PLIN2_HUMAN	Perilipin-2 OS=Homo sapiens GN=PLIN2 PE=1 SV=2	503	14	35.7%	48045
7	PDAB_HUMAN	Protein disulfide-isomerase OS=Homo sapiens GN=PDAB PE=1 SV=3	490	13	28.7%	57081
8	DX3B_HUMAN	Splixosome RNA helicase OS=Homo sapiens GN=DX3B PE=1 SV=1	391	11	24.1%	48960
9	SEPT1_HUMAN	Septin-1 OS=Homo sapiens GN=SEPT1 PE=1 SV=3	346	11	28.2%	49367
11	PTGS_HUMAN	Prostaglandin synthase OS=Homo sapiens GN=PTGS PE=1 SV=1	332	9	23.0%	57068
12	ALSA1_HUMAN	4-oxoethylaminobutyraldehyde dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=ALSA1 PE=1 SV=2	323	7	17.6%	53767
13	EPF1_HUMAN	Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1 OS=Homo sapiens GN=EPF1 PE=1 SV=3	316	12	28.6%	49000
14	RUVB2_HUMAN	RuvB-like 2 OS=Homo sapiens GN=RUVB2 PE=1 SV=3	306	13	27.4%	51125
15	DCTN2_HUMAN	Dynactin subunit 2 OS=Homo sapiens GN=DCTN2 PE=1 SV=4	300	9	27.2%	44204
17	ENOA_HUMAN	Alpha-enolase OS=Homo sapiens GN=ENO1 PE=1 SV=2	284	8	21.9%	47139
18	PSMD5_HUMAN	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 5 OS=Homo sapiens GN=PSMD5 PE=1 SV=3	276	7	19.0%	56160
19	KAP2_HUMAN	CAMP-dependent protein kinase type II alpha regulatory subunit OS=Homo sapiens GN=PRKAR2A PE=1 SV=2	247	6	17.6%	45490
20	NHRF1_HUMAN	Nucleolar (H+) exchange regulatory cofactor NHE-F1 OS=Homo sapiens GN=NHRF1 PE=1 SV=4	240	11	33.2%	38845
21	OFAT2_HUMAN	GDP-fucose protein O-fucosyltransferase 2 OS=Homo sapiens GN=OFAT2 PE=1 SV=3	222	9	19.1%	49944
22	EF1A1_HUMAN	Elongation factor 1-alpha 1 OS=Homo sapiens GN=EF1A1 PE=1 SV=1	220	5	14.4%	50309
24	KCCD2_HUMAN	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit delta OS=Homo sapiens GN=KCCD2 PE=1 SV=3	212	7	18.4%	56334
25	CALR_HUMAN	Calreticulin OS=Homo sapiens GN=CALR PE=1 SV=1	204	5	29.4%	48112
26	RHO2_HUMAN	Rho GTPase-activating protein 1 OS=Homo sapiens GN=ARHGAP1 PE=1 SV=1	197	7	18.0%	50404
27	TBA1B_HUMAN	Tubulin alpha-1B chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1B PE=1 SV=1	197	5	14.2%	50120
28	PSD12_HUMAN	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12 OS=Homo sapiens GN=PSMD12 PE=1 SV=1	194	9	18.6%	52871
29	TUBB_HUMAN	Tubulin beta chain OS=Homo sapiens GN=TUBB PE=1 SV=2	187	5	14.2%	49639
32	AP2M1_HUMAN	AP-2 complex subunit mu OS=Homo sapiens GN=AP2M1 PE=1 SV=2	169	7	14.0%	49623
35	PLD3_HUMAN	Phospholipase D3 OS=Homo sapiens GN=PLD3 PE=1 SV=1	151	4	8.6%	54671
37	NUCB2_HUMAN	Nucleoband-2 OS=Homo sapiens GN=NUCB2 PE=1 SV=2	143	4	13.3%	50164
38	GSS_HUMAN	Glutathione synthetase OS=Homo sapiens GN=GSS PE=1 SV=1	143	4	11.0%	52352
39	IKF1_HUMAN	Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase-interacting protein OS=Homo sapiens GN=IKF1 PE=1 SV=1	134	3	6.0%	39285
40	ADPG_HUMAN	ADP-dependent glucokinase OS=Homo sapiens GN=ADPG PE=1 SV=1	124	2	9.1%	54055
41	IF2GL_HUMAN	Putative eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3-like protein OS=Homo sapiens GN=EIF2S3L PE=1 SV=2	123	5	11.7%	51196
42	MET2L_HUMAN	S-adenosylmethionine synthase isoform type 2 OS=Homo sapiens GN=MAT2A PE=1 SV=1	120	1	3.8%	43633
46	ALBU_HUMAN	Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALBU PE=1 SV=2	110	4	9.4%	69321
49	TXND3_HUMAN	Thioredoxin domain-containing protein 5 OS=Homo sapiens GN=TXND3 PE=1 SV=2	103	5	19.3%	47599
51	TRYS_HUMAN	Trypsin-3 OS=Homo sapiens GN=PRSS3 PE=1 SV=2	97	2	7.9%	32508
53	HNRH1_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H OS=Homo sapiens GN=HNRH1 PE=1 SV=4	96	4	9.8%	49198
54	F10A1_HUMAN	HSC70-interacting protein OS=Homo sapiens GN=STI3 PE=1 SV=2	94	3	9.5%	41305
56	USP27_HUMAN	Ubl1-specific protease 2 OS=Homo sapiens GN=USP27 PE=1 SV=3	86	1	4.3%	53227
57	RPL4_HUMAN	60S ribosomal protein L4 OS=Homo sapiens GN=RPL4 PE=1 SV=5	82	2	2.6%	47667
58	ODE2_HUMAN	Lipoid acyltransferase component of branched chain alpha-keto acid dehydrogenase complex, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ODE1 PE=1 SV=3	82	3	5.0%	53453
59	RTN4_HUMAN	Reticulon-4 OS=Homo sapiens GN=RTN4 PE=1 SV=2	80	2	1.8%	12851
61	SEPT1_HUMAN	Septin-1 OS=Homo sapiens GN=SEPT1 PE=1 SV=3	74	2	4.4%	52560
62	ERGIC3_HUMAN	Endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment protein 3 OS=Homo sapiens GN=ERGIC3 PE=1 SV=1	72	1	2.1%	43194
63	POTE_HUMAN	POTE ankyrin domain family member E OS=Homo sapiens GN=POTE PE=1 SV=3	71	5	4.9%	121286
64	ODD2_HUMAN	Dihydrodipicolinate-lyase succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ODD1 PE=1 SV=4	71	3	4.2%	48724
68	SCRN1_HUMAN	Secernin-1 OS=Homo sapiens GN=SCRN1 PE=1 SV=2	62	2	4.8%	46533

Fraction F3 - bande 1 (~90kDa)								
Hits	Access Number	Protein description	Score	Matches	Cover	Mass	pl empM	
1	EB2_HUMAN	Furin OS=Homo sapiens GN=EB2 PE=1 SV=1	1177	40	50.2%	69370	5.04	8.59
2	VPB3_HUMAN	Vascular protein binding associated protein 3 OS=Homo sapiens GN=VPB3 PE=1 SV=2	1058	30	38.4%	91649	5.31	1.48
3	SC3A_HUMAN	Protein transport protein SC3A OS=Homo sapiens GN=SC3A PE=1 SV=2	915	21	12.0%	86105	6.64	1.51
4	BAK_HUMAN	Bak1 OS=Homo sapiens GN=BAK1 PE=1 SV=1	903	12	41.2%	6821	6.03	3.30
5	PLD3_HUMAN	Phospholipase C-3, cytosolic 3 OS=Homo sapiens GN=PLD3 PE=1 SV=1	867	27	39.8%	83497	6.47	1.6
6	CAN1_HUMAN	Capain-1 catalytic subunit OS=Homo sapiens GN=CAN1C1 PE=1 SV=1	849	25	13.1%	81838	5.49	1.77
7	KC21_HUMAN	Keratin, type II cytokeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT11 PE=1 SV=6	792	20	25.5%	60999	8.13	1.81
8	GRP1_HUMAN	Glutamine-fructose 6-phosphate aminotransferase (cytosolic) 1 OS=Homo sapiens GN=GFPT1 PE=1 SV=1	780	19	14.6%	78756	6.66	1.29
9	FURP2_HUMAN	Fur upstream element-binding protein 2 OS=Homo sapiens GN=HURP2 PE=1 SV=1	691	20	13.6%	79870	6.85	1.1
11	MARX_HUMAN	Myristoylated domain 4B1 C-like substrate OS=Homo sapiens GN=MARX5 PE=1 SV=1	647	8	40.1%	31536	4.47	1.21
13	MCM7_HUMAN	DNA replication licensing factor MCM7 OS=Homo sapiens GN=MCM7 PE=1 SV=2	585	15	25.5%	81257	6.08	0.87
14	PRKAM_HUMAN	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, muscle type OS=Homo sapiens GN=PFKM PE=1 SV=2	573	17	25.9%	85128	8.23	0.81
15	CALD1_HUMAN	Caldesmon OS=Homo sapiens GN=CALD1 PE=1 SV=1	541	15	19.8%	93175	5.62	0.6
16	LYRC_HUMAN	Protein LYRC OS=Homo sapiens GN=LYRC PE=1 SV=2	474	13	21.6%	61799	5.13	0.97
17	SUN2_HUMAN	SUN domain containing protein 2 OS=Homo sapiens GN=SUN2 PE=1 SV=1	414	6	11.8%	80262	6.27	0.81
18	NELC2_HUMAN	NEL repeat containing protein 2 OS=Homo sapiens GN=NELC2 PE=1 SV=1	404	12	20.8%	79393	5.83	0.13
19	ACHP_HUMAN	Acyltransferase 1 OS=Homo sapiens GN=ACHP PE=1 SV=1	395	11	15.5%	81173	5.29	0.49
20	DMN1L_HUMAN	Dynamin-1 like protein OS=Homo sapiens GN=DMN1L PE=1 SV=2	395	15	20.9%	81825	5.17	0.53
21	SRCO2_HUMAN	Src substrate cortactin OS=Homo sapiens GN=CTTN PE=1 SV=1	356	12	20.7%	64549	5.34	0.8
22	SYT2_HUMAN	Theonine-5-methyltransferase OS=Homo sapiens GN=SYT2 PE=1 SV=1	323	16	21.2%	83382	6.23	0.84
23	GRP78_HUMAN	78 kDa glucose regulated protein OS=Homo sapiens GN=GRP78 PE=1 SV=1	318	12	14.6%	72288	5.07	0.49
24	AFG3L2_HUMAN	AFG3-like protein 2 OS=Homo sapiens GN=AFG3L2 PE=1 SV=1	300	7	11.0%	88528	8.81	0.83
25	LAP2A_HUMAN	Lamina associated polypeptide 2, isoform alpha OS=Homo sapiens GN=LAP2A PE=1 SV=1	273	9	13.5%	75446	7.56	0.47
27	CLU3_HUMAN	Clu3 OS=Homo sapiens GN=CLU3 PE=1 SV=2	270	11	15.0%	88873	8.68	0.44
28	SPO1_HUMAN	Splicing factor 1 OS=Homo sapiens GN=SF1 PE=1 SV=1	269	7	14.6%	63286	9.07	0.37
29	AEGIC_HUMAN	Guanine adenylylase OS=Homo sapiens GN=AEGIC PE=1 SV=1	267	9	12.3%	79105	5.92	0.32
30	PAF1_HUMAN	RNA polymerase II-associated factor 1 homolog OS=Homo sapiens GN=PAF1 PE=1 SV=1	266	6	14.1%	59939	4.83	0.44
31	SHC1_HUMAN	Cysteine 3-rich domain containing protein OS=Homo sapiens GN=SHC1 PE=1 SV=3	264	11	17.4%	85419	6.11	0.4
33	MAO2_HUMAN	Mitochondrial ribonucleoprotein 2 OS=Homo sapiens GN=MAO2 PE=1 SV=1	258	7	15.5%	68875	5.55	0.38
34	DC12_HUMAN	Catecholase domain 1 OS=Homo sapiens GN=DC12 PE=1 SV=1	247	6	14.4%	74112	5.08	0.29
35	GFPEL_HUMAN	GTP-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=GFPEL PE=1 SV=1	215	4	9.3%	72488	8.6	0.22
36	SCB3_HUMAN	Lysosome membrane protein 3 OS=Homo sapiens GN=SCB3 PE=1 SV=1	200	5	8.8%	54255	5	0.39
37	HSP68_HUMAN	Heat shock protein HSP 68 beta OS=Homo sapiens GN=HSP68 PE=1 SV=1	193	6	8.1%	83212	4.97	0.24
38	PCSK_HUMAN	Delta-2-syringyl-5-oxalylate synthase OS=Homo sapiens GN=PCSK PE=1 SV=1	192	8	11.3%	87248	6.68	0.34
39	NCP1_HUMAN	Nuclear cap-binding protein subunit 1 OS=Homo sapiens GN=NCP1 PE=1 SV=1	187	5	6.3%	91781	5.09	0.17
41	PTDC3_HUMAN	Pentatricopeptide repeat domain containing protein 3, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=PTDC3 PE=1 SV=1	183	6	10.4%	76060	6	0.26
42	CLAS_HUMAN	Clas OS=Homo sapiens GN=CLAS PE=1 SV=1	177	11	12.4%	60987	8.08	0.38
44	HNRB1_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein B OS=Homo sapiens GN=HNRB1 PE=1 SV=1	156	4	2.3%	70899	8.23	0.23
45	HNRF1_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F1 OS=Homo sapiens GN=HNRF1 PE=1 SV=1	154	6	11.4%	90528	7.16	0.22
46	CLB3_HUMAN	Clb3 OS=Homo sapiens GN=CLB3 PE=1 SV=2	153	9	12.5%	89827	6.45	0.38
47	HMB_HUMAN	Hemoglobin subunit beta OS=Homo sapiens GN=HBB PE=1 SV=1	150	4	8.3%	68110	5.55	0.17
48	COG7_HUMAN	Conserved oligomeric gamma-domain OS=Homo sapiens GN=COG7 PE=1 SV=1	148	4	5.3%	80289	5.17	0.38
49	CLU4A_HUMAN	Clu4a OS=Homo sapiens GN=CLU4A PE=1 SV=1	146	11	12.4%	87624	8.29	0.23
50	PUBT_HUMAN	Protein tyrosine phosphatase SH-PTB OS=Homo sapiens GN=PUBT PE=1 SV=2	146	8	12.8%	79888	5.38	0.54
51	HSP7C_HUMAN	Heat shock cognate 71 kDa protein OS=Homo sapiens GN=HSP7C PE=1 SV=1	130	4	7.0%	70854	5.17	0.17
57	MRE11_HUMAN	Double strand break repair protein MRE11 OS=Homo sapiens GN=MRE11A PE=1 SV=1	125	4	7.0%	80548	5.81	0.24
58	HPAP1_HUMAN	HPA polymerase II-associated protein 1 OS=Homo sapiens GN=HPAP1 PE=1 SV=1	124	5	11.0%	75672	6.46	0.15
59	MUTA_HUMAN	Methyltransferase OS=Homo sapiens GN=MUTA PE=1 SV=1	124	6	9.7%	83862	6.48	0.19
60	ALBU_HUMAN	Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALBU PE=1 SV=2	120	6	9.2%	69221	5.82	0.23
61	EXOC3_HUMAN	Exocyst complex component 3 OS=Homo sapiens GN=EXOC3 PE=1 SV=1	118	4	5.3%	81747	5.35	0.14
62	EXOC3L_HUMAN	Exocyst complex component 3 OS=Homo sapiens GN=EXOC3L PE=1 SV=2	107	6	8.2%	86790	5.8	0.18
64	ETFA1_HUMAN	Exon junction factor 1 OS=Homo sapiens GN=ETFA1 PE=1 SV=1	107	5	12.4%	50169	9.1	0.13
65	TRX1_HUMAN	Thyroxine OS=Homo sapiens GN=TRX1 PE=1 SV=2	103	1	4.8%	37668	7.46	0.12
66	DNCC1_HUMAN	DNA helicase subunit C member 2 OS=Homo sapiens GN=DNCC1 PE=1 SV=1	102	4	6.3%	71952	8.85	0.11
68	WASF2_HUMAN	Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 2 OS=Homo sapiens GN=WASF2 PE=1 SV=1	98	2	4.8%	54250	5.38	0.14
69	STAT1_HUMAN	Signal transducer and activator of transcription 1 OS=Homo sapiens GN=STAT1 PE=1 SV=2	96	6	7.1%	87280	5.74	0.13
70	TTL12_HUMAN	Tubulin tyrosine ligase-like protein 12 OS=Homo sapiens GN=TTL12 PE=1 SV=2	96	4	6.3%	74356	5.13	0.1
71	SYM1_HUMAN	Threonine-3-glycine ligase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=SYM1 PE=1 SV=1	90	4	6.7%	80785	6.9	0.05
73	ZNF_HUMAN	Zinc finger protein OS=Homo sapiens GN=ZNF PE=1 SV=1	87	2	8.7%	61238	6.22	0.13
75	RUVF1_HUMAN	RBM and PUF domain containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=RUVF1 PE=1 SV=1	83	5	6.9%	79767	5.54	0.15
79	TBC17_HUMAN	TBC domain family member 17 OS=Homo sapiens GN=TBC17 PE=1 SV=1	74	3	4.8%	72882	5.05	0.16
80	MRO1L_HUMAN	Mitochondrial ribonucleoprotein L OS=Homo sapiens GN=MRO1L PE=1 SV=1	72	5	6.7%	70739	5.87	0.23
81	BRAT1_HUMAN	BRCA1-associated ATM substrate 1 OS=Homo sapiens GN=BRAT1 PE=1 SV=1	69	4	6.1%	88863	5.11	0.11
84	DCAP2_HUMAN	DCP1 and CLU4 associated factor 2 OS=Homo sapiens GN=DCAP2 PE=1 SV=1	68	2	4.7%	68811	5.21	0.06
85	AMBP_HUMAN	Protein AMBP OS=Homo sapiens GN=AMBP PE=1 SV=1	67	1	3.4%	38974	5.95	0.1
88	LAMP1_HUMAN	Lysosome-associated membrane glycoprotein 1 OS=Homo sapiens GN=LAMP1 PE=1 SV=1	66	4	8.4%	44854	6	0.17
94	DOX1_HUMAN	Probable ATP-dependent RNA helicase DOX1 OS=Homo sapiens GN=DOX1 PE=1 SV=1	63	7	10.7%	80222	8.33	0.15
96	GGAI_HUMAN	ADP-ribosylation factor binding protein GGAI OS=Homo sapiens GN=GGAI PE=1 SV=1	58	2	3.0%	70340	5.18	0.06

Fraction F3 - bande 2 (~70kDa)								
Hits	Access Number	Protein description	Score	Matches	Cover	Mass	pl empM	
1	RNF1_HUMAN	Dual-specific E3 ubiquitin-protein ligase OS=Homo sapiens GN=RNF1 PE=1 SV=1	1870	40	55.0%	65217	5.96	4.42
2	LAMB3_HUMAN	Lamin B3 OS=Homo sapiens GN=LAMB3 PE=1 SV=2	1555	37	56.1%	66368	5.11	3.59
3	TKT_HUMAN	Transketolase OS=Homo sapiens GN=TKT PE=1 SV=1	1477	35	49.1%	67833	7.58	2.79
4	ANNA6_HUMAN	Annexin A6 OS=Homo sapiens GN=ANNA6 PE=1 SV=3	1325	37	54.8%	67826	5.42	3.61
6	HSP71_HUMAN	Heat shock 70 kDa protein 71 OS=Homo sapiens GN=HSP71 PE=1 SV=1	1160	30	48.8%	70309	5.48	2.28
7	KC21_HUMAN	Keratin, type II cytokeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT11 PE=1 SV=6	1121	25	40.7%	60999	8.13	2.72
8	PLS1_HUMAN	Plasmin-1 OS=Homo sapiens GN=PLS1 PE=1 SV=4	1099	28	48.0%	70766	5.41	2.88
11	KRC2C_HUMAN	Krat repeat cross-complementing protein 6 OS=Homo sapiens GN=KRC2C PE=1 SV=2	794	26	33.7%	69799	6.23	1.29
12	IF2B1_HUMAN	Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3 OS=Homo sapiens GN=IF2B1 PE=1 SV=2	785	21	40.9%	63666	8.99	1.78
13	RPA1_HUMAN	Replication protein A 70 kDa DNA binding subunit OS=Homo sapiens GN=RPA1 PE=1 SV=2	778	21	40.1%	68093	6.92	1.47
14	UCP47_HUMAN	Leucine-rich repeat-containing protein 47 OS=Homo sapiens GN=UCP47 PE=1 SV=1	706	16	31.4%	63434	8.55	1.35
15	SYN1_HUMAN	Angiogenin-1 RNA ligase, cytosolic OS=Homo sapiens GN=SYN1 PE=1 SV=1	689	22	39.7%	75311	6.26	1.61
17	SDHA_HUMAN	Succinate dehydrogenase subunit A OS=Homo sapiens GN=SDHA PE=1 SV=1	544	12	26.5%	72445	7.06	0.73
18	SYR1_HUMAN	Syringonin-3-oxalyltransferase OS=Homo sapiens GN=SYR1 PE=1 SV=1	519	17	28.9%	66074	6.4	1.15
19	IF2B1_HUMAN	Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=IF2B1 PE=1 SV=2	508	14	26.9%	63441	9.26	1.1
20	CMAC2_HUMAN	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Anril2 OS=Homo sapiens GN=CMAC2 PE=1 SV=2	495	14	24.7%	74129	8.79	0.89
21	IF2B2_HUMAN	Insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 2 OS=Homo sapiens GN=IF2B2 PE=1 SV=2	492	11	26.4%	60081	8.48	0.73
22	HNRN1_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C OS=Homo sapiens GN=HNRN1 PE=1 SV=1	403	9	17.0%	69560	8.68	0.6
23	ALBU_HUMAN	Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALBU PE=1 SV=2	376	16	13.1%	69331	5.92	0.44
25	EXAF2_HUMAN	Interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase OS=Homo sapiens GN=EXAF2 PE=1 SV=1	341	11	23.2%	62656	8.58	0.79
26	AIFM1_HUMAN	Apoptosis-inducing factor 1, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=AIFM1 PE=1 SV=1	332	8	14.4%	64899	9.04	0.38
27	DOX17_HUMAN	Probable ATP-dependent RNA helicase DOX17 OS=Homo sapiens GN=DOX17 PE=1 SV=2	326	13	15.1%	80222	8.53	0.17
28	IRG4_HUMAN	Immunity-related GTPase family C protein OS=Homo sapiens GN=IRG4 PE=1 SV=1	307	9	18.0%	64278	4.81	0.59
29	CMC1_HUMAN	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Anril1 OS=Homo sapiens GN=CMC1 PE=1 SV=2	268	10	16.7%	70715	8.58	0.55
30	RBM39_HUMAN	RNA binding protein 39 OS=Homo sapiens GN=RBM39 PE=1 SV=1	260	8	16.4%	55343	10.1	0.44
32	AMPE_HUMAN	Aminopeptidase B OS=Homo sapiens GN=AMPE PE=1 SV=1	253	8	14.0%	72549	5.51	0.49
34	FUS_HUMAN	Fused protein FUS OS=Homo sapiens GN=FUS PE=1 SV=1	227	3	8.6%	33394	8.4	0.22
35	PKNOX_HUMAN	CTP synthase 2 OS=Homo sapiens GN=PKNOX PE=1 SV=1	225	9	12.0%	65346	6.45	0.39
37	KHOB1_HUMAN	Kit domain-containing, RNA binding, signal transduction-associated protein 1 OS=Homo sapiens GN=KHOB1 PE=1 SV=1	217	8	24.2%	48197	8.73	0.17
39	DPL2_HUMAN	Dihydropyrimidinase-related protein 2 OS=Homo sapiens GN=DPL2 PE=1 SV=1	200	5	10.8%	62333	5.95	0.34
40	NPL4_HUMAN	Nuclear protein localization factor 4 homolog OS=Homo sapiens GN=NPL4 PE=1 SV=3	196	6	10.0%	68077	5.94	0.3
41	COF2_HUMAN	Dihydrodipicolinate decarboxylase component of pyruvate dehydrogenase complex, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=COF2 PE=1 SV=3	190	10	15.0%	68953	7.96	0.52
42	AMM5_HUMAN	Protein arginine N-methyltransferase 5 OS=Homo sapiens GN=AMM5 PE=1 SV=1	180	10	12.6%	72588	5.88	0.42
43	LRG41_HUMAN	Leucine-rich repeat-containing protein 40 OS=Homo sapiens GN=LRG41 PE=1 SV=1	179	11	17.9%	68207	6.04	0.45
44	LAMB2_HUMAN	Lamin B2 OS=Homo sapiens GN=LAMB2 PE=1 SV=3	169	7	8.3%	67847	5.29	0.24
47	PTN11_HUMAN	Tyrosine protein phosphatase non-receptor type 11 OS=Homo sapiens GN=PTN11 PE=1 SV=2	150	6	12.1%	68993	6.87	0.3
48	COR1B_HUMAN	Coronin-1 OS=Homo sapiens GN=COR1B PE=1 SV=1	146	3	6.5%	54200	5.61	0.22
49	ETFA1_HUMAN	Exon junction factor 1 OS=Homo sapiens GN=ETFA1 PE=1 SV=1	135	3	9.7%	50209	9.1	0.24
50	TBA1B_HUMAN	Tubulin alpha-1B chain OS=Homo sapiens GN=TBA1B PE=1 SV=						

Fraction F3 - bande 3 (~65kDa)							
Hits	Access Number	Protein description	Score	Matches	Covert	Mass	
1	TCFA_HUMAN	T-complex protein 1 subunit alpha OS=Homo sapiens GN=TCFA PE=1 SV=2	1791	40	70,3%	6206	5,8
2	ZARA_HUMAN	Serine/threonine-protein phosphatase 2A OS=Homo sapiens GN=ZARA PE=1 SV=4	1343	29	48,4%	6267	5
3	CHIG_HUMAN	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=CHIG PE=1 SV=1	1341	19	41,5%	6305	5,7
4	TCF2_HUMAN	T-complex protein 1 subunit beta OS=Homo sapiens GN=TCF2 PE=1 SV=3	1335	33	51,8%	5788	6,23
5	DPY3_HUMAN	Dihydropyrimidine-related protein 3 OS=Homo sapiens GN=DPY3 PE=1 SV=2	1067	22	49,8%	6324	6,04
6	PHAI1_HUMAN	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 1 OS=Homo sapiens GN=PHAI1 PE=1 SV=1	509	16	40,8%	6301	5,7
7	KC1L_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KC1L PE=1 SV=4	726	17	23,4%	6099	8,15
8	KPVM_HUMAN	Pyruvate kinase PKM OS=Homo sapiens GN=PKM PE=1 SV=4	625	15	30,9%	5790	7,6
12	HMBP_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Homo sapiens GN=HMBP PE=1 SV=3	657	10	26,8%	5064	5,30
14	DHAK_HUMAN	Functional ATP-dependent dihydroxyacetone kinase/FAD-AMP lyase (cyclizing) OS=Homo sapiens GN=DHAK PE=1 SV=2	453	12	29,8%	5810	7,12
14	PHAI2_HUMAN	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 2 OS=Homo sapiens GN=PHAI2 PE=1 SV=1	437	13	23,9%	6064	5,49
15	UZAF2_HUMAN	Splicing factor UZAF 2 OS=Homo sapiens GN=UZAF2 PE=1 SV=1	437	8	33,1%	5347	8,19
16	ACAD9_HUMAN	Acyl-CoA dehydrogenase family member 9 mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ACAD9 PE=1 SV=1	415	11	18,5%	6817	8,16
17	COPI_HUMAN	Coatomer subunit delta OS=Homo sapiens GN=COPI PE=1 SV=1	411	15	23,9%	5714	5,89
18	DPY1_HUMAN	Dihydropyrimidine-related protein 1 OS=Homo sapiens GN=DPY1 PE=1 SV=2	374	14	22,9%	6245	6,55
19	EIF2A_HUMAN	Eukaryotic translation initiation factor 2A OS=Homo sapiens GN=EIF2A PE=1 SV=3	354	30	19,3%	4849	9
21	RPN2_HUMAN	Dolichyl-diphosphodolichosaccharide-protein glycosyltransferase subunit 2 OS=Homo sapiens GN=RPN2 PE=1 SV=1	324	5	12,7%	6824	5,44
22	INO1_HUMAN	Inositol 3-phosphate synthase 1 OS=Homo sapiens GN=INO1 PE=1 SV=1	306	8	16,3%	6323	5,52
23	CDH4_HUMAN	Cellular adhesion molecule family class IV OS=Homo sapiens GN=CDH4 PE=1 SV=1	304	10	26,5%	5838	4,76
24	TCF1_HUMAN	T-complex protein 1 subunit epsilon OS=Homo sapiens GN=TCF1 PE=1 SV=1	290	12	22,4%	5963	5,49
25	PURF0_HUMAN	Poly(U)-binding-splicing factor PUF60 OS=Homo sapiens GN=PURF0 PE=1 SV=1	266	7	18,4%	5938	5,19
26	TUBB_HUMAN	Tubulin alpha 3B chain OS=Homo sapiens GN=TUBB PE=1 SV=1	217	5	12,2%	5020	4,94
27	CACF_HUMAN	Carnitine D acetyltransferase OS=Homo sapiens GN=CACF PE=1 SV=1	203	6	8,9%	7012	8,63
29	EHD1_HUMAN	EH domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=EHD1 PE=1 SV=1	187	7	15,5%	6059	8,3
31	APH3_HUMAN	Apoptosis inhibitor 5 OS=Homo sapiens GN=APH3 PE=1 SV=3	181	7	13,4%	5866	6,09
33	ACSF_HUMAN	Acyl-CoA synthetase family member 2, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ACSF PE=1 SV=2	173	7	13,9%	6801	7,5
34	ETFO_HUMAN	Electron transfer flavoprotein-subunit oxidoreductase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ETFO PE=1 SV=1	162	4	7,5%	6842	7,31
35	URP14_HUMAN	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14 OS=Homo sapiens GN=URP14 PE=1 SV=2	160	6	11,3%	5693	5,2
36	G3BP1_HUMAN	Ran GTPase-activating protein-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=G3BP1 PE=1 SV=1	151	3	7,3%	5213	5,36
38	FUHP3_HUMAN	Fur upstream element-binding protein 3 OS=Homo sapiens GN=FUHP3 PE=1 SV=2	149	4	6,1%	6362	8,6
39	CSS_HUMAN	Cystathionine beta-synthase OS=Homo sapiens GN=CSS PE=1 SV=2	139	3	5,6%	6054	6,2
40	TKT_HUMAN	Transketolase OS=Homo sapiens GN=TKT PE=1 SV=3	128	2	5,3%	6785	7,68
42	NMT1_HUMAN	Glycylglycyl-L-homocysteinyltransferase 1 OS=Homo sapiens GN=NMT1 PE=1 SV=1	135	1	3,8%	5870	7,66
43	BGAL_HUMAN	Beta-galactosidase OS=Homo sapiens GN=BGAL PE=1 SV=2	133	5	8,9%	7607	6,1
44	RPN1_HUMAN	Dolichyl-diphosphodolichosaccharide-protein glycosyltransferase subunit 1 OS=Homo sapiens GN=RPN1 PE=1 SV=1	131	5	5,6%	6827	5,66
45	ZC3H4_HUMAN	Zinc finger CCHC domain-containing protein 15 OS=Homo sapiens GN=ZC3H4 PE=1 SV=1	125	4	10,6%	4873	5,22
46	GLM1_HUMAN	Glophilin OS=Homo sapiens GN=GLM1 PE=1 SV=2	121	5	7,2%	6816	5,24
47	ULI1_HUMAN	NEDEB activating enzyme 1 regulatory subunit OS=Homo sapiens GN=ULI1 PE=1 SV=1	120	4	7,5%	6029	5,25
48	EF1A1_HUMAN	Elongation factor 1 alpha 1 OS=Homo sapiens GN=EF1A1 PE=1 SV=1	115	5	14,3%	5019	9,1
49	TAB1_HUMAN	TGF-beta-activated kinase 2 and MAP3K-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=TAB1 PE=1 SV=1	115	2	4,6%	5460	5,31
50	POTA_HUMAN	Geranylgeranyl transferase type 2 subunit alpha OS=Homo sapiens GN=POTA PE=1 SV=2	114	7	11,8%	6950	3,46
53	LMNB1_HUMAN	Lamina B1 OS=Homo sapiens GN=LMNB1 PE=1 SV=2	111	3	8,0%	6638	5,31
54	IF2B2_HUMAN	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2 OS=Homo sapiens GN=IF2B2 PE=1 SV=2	105	3	6,3%	5681	8,48
56	NUCB1_HUMAN	Nucleobindin-1 OS=Homo sapiens GN=NUCB1 PE=1 SV=4	100	3	6,1%	5346	5,15
57	TRV3_HUMAN	Trypsin-3 OS=Homo sapiens GN=TRV3 PE=1 SV=2	98	2	6,6%	3268	7,46
59	TCPL_HUMAN	T-complex protein 1 subunit theta OS=Homo sapiens GN=TCPL PE=1 SV=4	90	4	8,6%	5983	5,42
60	CPNE3_HUMAN	Copine-3 OS=Homo sapiens GN=CPNE3 PE=1 SV=3	89	2	3,4%	6092	5,6
62	ALBU_HUMAN	Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALBU PE=1 SV=2	87	7	9,7%	6921	5,92
63	GDH_HUMAN	Rib GDP dissociation inhibitor alpha OS=Homo sapiens GN=GDH PE=1 SV=2	82	4	10,1%	5050	5
64	ASND_HUMAN	Asparagine synthase [glutamine-hydrolyzing] OS=Homo sapiens GN=ASND PE=1 SV=1	80	4	7,8%	6423	6,39
65	PAK2_HUMAN	Serine/threonine-protein kinase PAK 2 OS=Homo sapiens GN=PAK2 PE=1 SV=3	78	4	7,1%	5806	5,69
69	OPAI1_HUMAN	Glycylglycyl-L-homocysteinyltransferase 5 protein OS=Homo sapiens GN=OPAI1 PE=1 SV=2	70	3	4,2%	6780	8,16
70	HSP72_HUMAN	Heat shock 70 kDa protein 72 OS=Homo sapiens GN=HSP72 PE=1 SV=5	67	2	3,4%	7009	5,48
76	ZN207_HUMAN	BUB3 interacting and GLTB motif-containing protein ZNF207 OS=Homo sapiens GN=ZNF207 PE=1 SV=1	62	2	4,6%	5077	9,19

Fraction F3 - bande 4 (~63kDa)							
Hits	Access Number	Protein description	Score	Matches	Covert	Mass	
1	CHD0_HUMAN	60 kDa heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=CHD0 PE=1 SV=2	2719	48	61,8%	61016	5,7
2	KPVM_HUMAN	Pyruvate kinase PKM OS=Homo sapiens GN=PKM PE=1 SV=4	2444	53	66,5%	5790	7,96
5	KC21_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KC21 PE=1 SV=6	1687	47	46,7%	6599	8,15
6	TCPL_HUMAN	T-complex protein 1 subunit theta OS=Homo sapiens GN=TCPL PE=1 SV=4	1652	37	57,5%	5983	5,42
7	TCF1_HUMAN	T-complex protein 1 subunit epsilon OS=Homo sapiens GN=TCF1 PE=1 SV=1	996	26	51,4%	5963	5,45
8	PDAL_HUMAN	Protein disulfide-isomerase OS=Homo sapiens GN=PDAL PE=1 SV=3	695	19	41,2%	5701	4,76
9	UBP14_HUMAN	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 14 OS=Homo sapiens GN=UBP14 PE=1 SV=3	589	14	28,1%	5603	5,2
10	GDH_HUMAN	Rib GDP dissociation inhibitor alpha OS=Homo sapiens GN=GDH PE=1 SV=2	576	16	46,1%	5050	5
11	SYVC_HUMAN	Tyrosine-tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=SYVC PE=1 SV=4	546	23	35,8%	59106	6,61
13	CALR_HUMAN	Calreticulin OS=Homo sapiens GN=CALR PE=1 SV=1	433	9	32,9%	4812	4,29
14	ULI1_HUMAN	NEDEB activating enzyme 1 regulatory subunit OS=Homo sapiens GN=ULI1 PE=1 SV=1	418	11	27,7%	6029	5,25
15	TCF2_HUMAN	T-complex protein 1 subunit beta OS=Homo sapiens GN=TCF2 PE=1 SV=3	406	13	23,7%	5798	6,23
16	OXSR1_HUMAN	Serine/threonine-protein kinase OXSR1 OS=Homo sapiens GN=OXSR1 PE=1 SV=1	371	12	22,4%	5796	6,03
18	HDAC2_HUMAN	Histone deacetylase 2 OS=Homo sapiens GN=HDAC2 PE=1 SV=2	356	9	21,3%	5529	5,59
19	PHAI2_HUMAN	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 2 OS=Homo sapiens GN=PHAI2 PE=1 SV=1	345	11	18,5%	6064	5,49
23	FTO_HUMAN	Alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase FTO OS=Homo sapiens GN=FTO PE=1 SV=3	264	10	19,2%	5825	5,1
24	CPNE3_HUMAN	Copine-3 OS=Homo sapiens GN=CPNE3 PE=1 SV=3	243	10	16,4%	6002	5,6
25	TBA1B_HUMAN	Tubulin alpha 1B chain OS=Homo sapiens GN=TBA1B PE=1 SV=1	235	8	20,8%	50120	4,94
26	HNRPK_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Homo sapiens GN=HNRPK PE=1 SV=1	232	5	11,9%	5044	5,39
32	COR1C_HUMAN	Coronin-1C OS=Homo sapiens GN=COR1C PE=1 SV=1	183	2	6,1%	5325	6,65
35	AL4A1_HUMAN	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=AL4A1 PE=1 SV=3	165	4	9,4%	6161	8,25
36	PHAI1_HUMAN	Prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 1 OS=Homo sapiens GN=PHAI1 PE=1 SV=1	156	6	10,9%	6101	5,7
38	RDX2B_HUMAN	UV excision repair protein RAD23 homolog B OS=Homo sapiens GN=RDX2B PE=1 SV=1	153	5	12,2%	43145	4,79
39	DCTN4_HUMAN	Dynactin subunit 4 OS=Homo sapiens GN=DCTN4 PE=1 SV=1	150	3	8,7%	52304	7,1
41	NP11_HUMAN	Nucleosome assembly protein 1-like 1 OS=Homo sapiens GN=NP11 PE=1 SV=1	147	3	11,8%	43346	4,36
42	EF1A1_HUMAN	Elongation factor 1 alpha 1 OS=Homo sapiens GN=EF1A1 PE=1 SV=1	146	4	11,9%	5019	9,1
43	FILAZ_HUMAN	Filaggrin-2 OS=Homo sapiens GN=FILAZ PE=1 SV=1	140	3	1,3%	24728	8,45
44	CDC73_HUMAN	Parafibrinon OS=Homo sapiens GN=CDC73 PE=1 SV=1	139	4	7,9%	6059	9,63
45	SYSC_HUMAN	Serine-tRNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=SYSC PE=1 SV=3	139	5	13,8%	58740	6,05
47	KPVR_HUMAN	Pyruvate kinase PKLR OS=Homo sapiens GN=PKLR PE=1 SV=2	138	4	4,7%	61791	7,64
49	LSI4A_HUMAN	Protein LSM14 homolog A OS=Homo sapiens GN=LSI4A PE=1 SV=3	130	3	8,2%	50499	9,55
50	PDAS5_HUMAN	Protein disulfide-isomerase AS OS=Homo sapiens GN=PDAS5 PE=1 SV=1	122	7	11,6%	59556	8,08
51	PDCD4_HUMAN	Programmed cell death protein 4 OS=Homo sapiens GN=PDCD4 PE=1 SV=2	120	3	8,5%	51703	5,07
52	PAK2_HUMAN	Serine/threonine-protein kinase PAK 2 OS=Homo sapiens GN=PAK2 PE=1 SV=3	117	9	11,5%	5806	5,69
56	SAC1_HUMAN	Phosphatidylinositol phosphatase SAC1 OS=Homo sapiens GN=SAC1 PE=1 SV=2	114	3	4,6%	66924	6,66
59	YES_HUMAN	Tyrosine-protein kinase Yes OS=Homo sapiens GN=YES1 PE=1 SV=3	104	5	7,9%	60763	6,32
60	NUCB1_HUMAN	Nucleobindin-1 OS=Homo sapiens GN=NUCB1 PE=1 SV=4	103	5	10,6%	53846	5,15
61	IMA3_HUMAN	Importin subunit alpha-3 OS=Homo sapiens GN=KPNAA4 PE=1 SV=1	101	3	9,6%	57851	4,8
62	TRV3_HUMAN	Trypsin-3 OS=Homo sapiens GN=TRV3 PE=1 SV=2	99	2	10,9%	3258	7,46
63	EHD1_HUMAN	EH domain-containing protein 1 OS=Homo sapiens GN=EHD1 PE=1 SV=2	98	6	11,4%	6059	8,35
64	TBB3_HUMAN	Tubulin beta chain OS=Homo sapiens GN=TUBB PE=1 SV=2	97	5	14,0%	49639	4,78
65	PP2B_HUMAN	Serine/threonine-protein phosphatase 2B catalytic subunit beta isoform OS=Homo sapiens GN=PPP3CB PE=1 SV=2	95	3	7,1%	5897	5,6
69	BGAL_HUMAN	Beta-galactosidase OS=Homo sapiens GN=BGAL PE=1 SV=2	91	3	5,5%	76027	6,1
71	IMA4_HUMAN	Importin subunit alpha-4 OS=Homo sapiens GN=KPNAA3 PE=1 SV=2	85	3	4,2%	5775	4,8
74	DPY2_HUMAN	Dihydropyrimidine-related protein 2 OS=Homo sapiens GN=DPY2 PE=1 SV=1	79	3	3,0%	6255	5,95
75	SAH3_HUMAN	Putative adenosylhomocysteinase 3 OS=Homo sapiens GN=SAH3 PE=1 SV=1	79	6	6,7%	66678	7,13
78	PURF0_HUMAN	Poly(U)-binding-splicing factor PUF60 OS=Homo sapiens GN=PURF0 PE=1 SV=1	77	6	7,9%	5938	5,19
85	CASP6_HUMAN	Caspase 14 OS=Homo sapiens GN=CASP14 PE=1 SV=2	71	2	9,1%	2762	5,44

Fraction F3 - bande 5 (~60kDa)							
Hits	Access Number	Protein description	Score	Matches	Cover	Mass	gi
1	FOA4_HUMAN	Protein disulfide-isomerase OS=FOA4 PE=1 SV=3	2537	43	57.5%	57081	4.76
2	CAUR_HUMAN	Calreticula OS=Homo sapiens GN=CAUR PE=1 SV=1	1168	22	51.3%	48112	4.29
3	TCDF_HUMAN	T-complex protein 1 subunit delta OS=Homo sapiens GN=CTCF PE=1 SV=4	1161	30	51.7%	58129	7.55
5	VIME_HUMAN	Vimentin OS=Homo sapiens GN=VIM PE=1 SV=4	1024	26	55.2%	53619	5.06
6	KCCL1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT11 PE=1 SV=4	952	25	39.6%	60999	5.51
7	TCDF_HUMAN	T-complex protein 1 subunit delta OS=Homo sapiens GN=CTCF PE=1 SV=4	907	34	47.7%	57888	7.86
9	KPNA_HUMAN	Pyrimidine kinase PNA OS=Homo sapiens GN=KPNM PE=1 SV=4	813	23	44.1%	57900	7.56
11	UGDH_HUMAN	UDP-glucose 4-epimerase OS=Homo sapiens GN=UGDH PE=1 SV=3	709	16	48.3%	54089	6.73
12	KOHL2_HUMAN	Nan POZ domain-containing actuator binding protein OS=Homo sapiens GN=KOH2 PE=1 SV=4	670	19	48.4%	54197	9.01
13	TCDF_HUMAN	T-complex protein 1 subunit delta OS=Homo sapiens GN=CTCF PE=1 SV=4	598	13	26.5%	59583	5.42
14	PRK4_HUMAN	30S prokaryotic ribosomal protein L4 OS=Homo sapiens GN=PRK4 PE=1 SV=1	566	15	39.8%	49554	5.87
15	CHD3_HUMAN	IQ domain heat shock protein, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=CHD3 PE=1 SV=2	499	10	26.9%	61018	5.7
16	FOA4_HUMAN	Protein disulfide-isomerase AS OS=Homo sapiens GN=FOA4 PE=1 SV=3	451	15	29.5%	56747	5.98
17	HNRNP_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K OS=Homo sapiens GN=HNRNPK PE=1 SV=2	442	10	28.5%	58944	5.49
18	SLDHA_HUMAN	Dihydroxyacetone dehydrogenase, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=SLDHA PE=1 SV=2	422	10	22.8%	54141	7.95
19	RP124_HUMAN	Nucleosome assembly protein 1 subunit 4 OS=Homo sapiens GN=RP124 PE=1 SV=1	398	10	24.0%	42797	4.6
20	KCC2_HUMAN	Protein KCC2 OS=Homo sapiens GN=KCC2 PE=1 SV=2	395	16	28.7%	56049	9.02
21	TP53_HUMAN	Serine-HDNA ligase, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=TP53 PE=1 SV=1	379	16	35.4%	58740	6.05
22	PFBP1_HUMAN	Polypyrroline t-acyl-binding protein 1 OS=Homo sapiens GN=PFBP1 PE=1 SV=1	393	8	20.9%	57186	3.22
23	CD151A_HUMAN	ATP-dependent RNA helicase CD151A OS=Homo sapiens GN=CD151A PE=1 SV=1	357	12	21.3%	53941	6.19
24	MAP2B_HUMAN	Lamins-associated polypeptide 2, isoform beta OS=Homo sapiens GN=MAP2B PE=1 SV=2	356	8	22.9%	50639	9.39
25	TRXK_HUMAN	Thioredoxin reductase 1, cytoplasmic OS=Homo sapiens GN=TRXK1 PE=1 SV=3	339	8	17.4%	70862	7.18
26	PP5S_HUMAN	Acetylphosphate phosphatase 1 OS=Homo sapiens GN=PP5S PE=1 SV=1	330	10	21.2%	56842	5.88
27	TBA1B_HUMAN	Tubulin alpha 1B chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1B PE=1 SV=2	322	10	26.0%	50120	4.34
28	TBA1A_HUMAN	Tubulin alpha 1A chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1A PE=1 SV=2	320	10	26.4%	50104	4.94
30	RP124_HUMAN	Nucleosome assembly protein 1 subunit 4 OS=Homo sapiens GN=RP124 PE=1 SV=1	303	8	17.1%	45348	4.36
31	KDHA_HUMAN	Rib GTP dissociation inhibitor alpha OS=Homo sapiens GN=KDHA PE=1 SV=2	280	9	26.9%	50550	5
32	HDZB_HUMAN	UV excision repair protein RAD3 homolog B OS=Homo sapiens GN=HDZB PE=1 SV=1	279	12	24.9%	49145	4.79
33	SYA_HUMAN	Phenylalanine-HDNA ligase alpha subunit OS=Homo sapiens GN=SYA PE=1 SV=1	275	12	20.1%	57528	7.31
34	RC3H1_HUMAN	IQ domain 55A/56A/56B/56C/56D/56E OS=Homo sapiens GN=RC3H1 PE=1 SV=1	270	13	38.4%	49631	8.27
35	SCS3_HUMAN	Synaptosomal complex protein 3 OS=Homo sapiens GN=SCS3 PE=1 SV=1	248	7	17.8%	50549	4.88
36	SPAN1_HUMAN	Spring factor 1A subunit OS=Homo sapiens GN=SPAN1 PE=1 SV=1	243	6	14.2%	58812	5.27
37	ALBU_HUMAN	Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALBU PE=1 SV=2	245	6	11.5%	61922	5.92
38	ITIC_HUMAN	ITIH4-binding protein R3B homolog OS=Homo sapiens GN=ITIC PE=1 SV=1	233	9	22.2%	55175	6.77
39	TBR1_HUMAN	Tubulin beta 1 chain OS=Homo sapiens GN=TUBB1 PE=1 SV=2	225	8	29.4%	49639	4.78
40	NCLN_HUMAN	Nucleolin OS=Homo sapiens GN=NCLN PE=1 SV=2	216	8	11.7%	61932	6.4
41	OSNL1_HUMAN	COP9 signalosome complex subunit 1 OS=Homo sapiens GN=OSNL1 PE=1 SV=1	207	7	18.3%	55501	6.3
42	BAFP1_HUMAN	Brain acid soluble protein 1 OS=Homo sapiens GN=BAFP1 PE=1 SV=2	199	5	46.5%	22880	4.84
43	DCCL1_HUMAN	Chaperonin domain 1, mitochondrial chaperonin 1 OS=Homo sapiens GN=DCCL1 PE=1 SV=3	182	9	23.0%	56544	6.01
44	GORX2_HUMAN	Golgi assembly stacking protein 2 OS=Homo sapiens GN=GORX2 PE=1 SV=1	180	6	36.4%	47116	4.73
46	IAA3_HUMAN	Importin beta 3 OS=Homo sapiens GN=IAA3 PE=1 SV=1	172	7	35.3%	59991	4.89
47	CAP1_HUMAN	Adenyl cyclase-associated protein 1 OS=Homo sapiens GN=CAP1 PE=1 SV=1	168	5	12.8%	51689	8.24
48	CPST2_HUMAN	Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 2 OS=Homo sapiens GN=CPST2 PE=1 SV=1	160	6	14.9%	52918	7.82
50	CDK2C_HUMAN	Cyclin-DC OS=Homo sapiens GN=CDK2C PE=1 SV=1	145	2	5.9%	53215	6.85
52	DNK1_HUMAN	DNA homolog subfamily 1 member B OS=Homo sapiens GN=DNK1 PE=1 SV=2	142	6	12.3%	56405	6.56
53	SRK_HUMAN	Protein serine/threonine kinase SRK OS=Homo sapiens GN=SRK PE=1 SV=1	140	5	8.0%	58797	7.1
54	EUP3_HUMAN	Elongation factor 3 OS=Homo sapiens GN=EUP3 PE=1 SV=2	134	7	36.3%	62219	9.04
59	EF3A1_HUMAN	Elongation factor 3 subunit 1 OS=Homo sapiens GN=EF3A1 PE=1 SV=1	126	5	13.0%	50109	9.1
60	TBL1A_HUMAN	T-box (T-box) repeat-containing protein TBL1A OS=Homo sapiens GN=TBL1A PE=1 SV=2	125	2	6.8%	55560	5.28
64	TOML1_HUMAN	Target of Myb protein 1 OS=Homo sapiens GN=TOML1 PE=1 SV=2	123	3	6.7%	55785	4.59
66	TM6D_HUMAN	Protein disulfide-isomerase TM6D OS=Homo sapiens GN=TM6D PE=1 SV=2	123	5	8.0%	51839	4.8
68	PUR1_HUMAN	Adenylphosphorylation-dependent kinase OS=Homo sapiens GN=ADPK1 PE=1 SV=1	120	2	4.8%	57162	8.3
67	MSTO1_HUMAN	Protein tyrosine kinase OS=Homo sapiens GN=MSTO1 PE=1 SV=1	108	2	4.2%	61796	5.7
69	PP2B_HUMAN	Serine/threonine protein phosphatase 2B catalytic subunit alpha isoform OS=Homo sapiens GN=PPP3CA PE=1 SV=1	103	3	6.3%	58650	5.58
70	GLK_HUMAN	Glutamate kinase isoform, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=GLK PE=1 SV=1	103	3	3.6%	73414	7.85
71	DNNA3_HUMAN	Non-syndromic hearing impairment protein 3 OS=Homo sapiens GN=DNNA3 PE=1 SV=2	102	4	7.9%	54520	5.03
81	SYA_HUMAN	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase OS=Homo sapiens GN=SYA PE=1 SV=1	84	1	2.9%	56614	6.29
83	TBR1_HUMAN	Tubulin beta 1 chain OS=Homo sapiens GN=TUBB1 PE=1 SV=2	81	1	4.3%	51268	7.46
88	IFT1_HUMAN	Elongation factor 2 OS=Homo sapiens GN=IFT1 PE=1 SV=1	71	3	2.3%	95177	6.41
93	FASMA_HUMAN	Protein FAM58B OS=Homo sapiens GN=FASMA PE=1 SV=1	60	2	5.0%	55366	9.15

Fraction F3 - bande 6 (~50kDa)							
Hits	Access Number	Protein description	Score	Matches	Cover	Mass	gi
1	ATFB_HUMAN	ATP synthase subunit beta, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=ATFB PE=1 SV=1	2613	44	70.7%	56225	5.26
3	FOA4_HUMAN	Protein disulfide-isomerase AC OS=Homo sapiens GN=FOA4 PE=1 SV=3	1076	19	38.4%	48991	4.95
4	KCCL1_HUMAN	Keratin, type II cytoskeletal 1 OS=Homo sapiens GN=KRT11 PE=1 SV=4	941	24	36.5%	60999	8.15
6	HNRH1_HUMAN	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H OS=Homo sapiens GN=HNRH1 PE=1 SV=4	857	12	32.7%	49196	5.89
7	DM1_HUMAN	Eukaryotic preinitiation complex release factor subunit 1 OS=Homo sapiens GN=DM1 PE=1 SV=3	636	15	44.2%	49000	5.51
8	TBR1_HUMAN	Tubulin beta 1 chain OS=Homo sapiens GN=TUBB1 PE=1 SV=2	600	16	44.4%	49639	4.78
9	IF2I_HUMAN	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 3 OS=Homo sapiens GN=IF2I PE=1 SV=2	545	13	37.9%	51077	8.66
10	PCID1_HUMAN	20S proteasome activator 1 regulatory subunit 12 OS=Homo sapiens GN=PCID1 PE=1 SV=3	542	16	30.9%	52871	7.51
11	TBR1C_HUMAN	Tubulin alpha 1C chain OS=Homo sapiens GN=TBR1C PE=1 SV=1	540	12	36.7%	49663	4.96
12	DXS3B_HUMAN	Spirochete RNA helicase DXS3B OS=Homo sapiens GN=DXS3B PE=1 SV=1	527	10	37.9%	48960	4.44
13	TBA1A_HUMAN	Tubulin alpha 1A chain OS=Homo sapiens GN=TUBA1A PE=1 SV=2	526	13	36.6%	50104	5.94
14	OSB_HUMAN	Glutathione synthetase OS=Homo sapiens GN=OSB PE=1 SV=1	511	13	33.3%	52352	5.67
16	DCTN2_HUMAN	Dynactin subunit 2 OS=Homo sapiens GN=DCTN2 PE=1 SV=1	492	11	33.6%	44204	5.1
17	RUVBL1_HUMAN	RuvB-like 1 OS=Homo sapiens GN=RUVBL1 PE=1 SV=3	472	14	30.0%	51125	5.49
19	SEPL1_HUMAN	Septin-1 OS=Homo sapiens GN=SEPL1 PE=1 SV=3	441	10	27.0%	49367	6.16
21	EMD1_HUMAN	Alpha enolase OS=Homo sapiens GN=EMD1 PE=1 SV=2	394	10	25.0%	47139	7.01
23	PI3Z_HUMAN	Phosphoinositide 3-kinase OS=Homo sapiens GN=PI3Z PE=1 SV=2	393	13	32.0%	48945	6.14
24	PUR1_HUMAN	Tetrahymena protein biosynthesis protein adenosine-3 OS=Homo sapiens GN=ADPK1 PE=1 SV=1	360	9	31.0%	137999	6.26
25	ALB1_HUMAN	4-tetrahydroxyphenylaldolase OS=Homo sapiens GN=ALB1 PE=1 SV=1	352	11	24.9%	53767	5.69
26	KA2P_HUMAN	CAH1-dependent protein kinase type 2 regulatory subunit OS=Homo sapiens GN=KA2P PE=1 SV=2	325	9	26.2%	45490	4.96
28	NHR1_HUMAN	Nucleosome remodeling factor OS=Homo sapiens GN=NHR1 PE=1 SV=1	307	6	22.9%	38845	5.55
30	ADPC4_HUMAN	Adiponectin OS=Homo sapiens GN=ADPC4 PE=1 SV=1	284	5	16.7%	54055	5.77
31	METK2_HUMAN	5-adenosylmethionine synthase type 2 OS=Homo sapiens GN=METK2 PE=1 SV=1	280	4	13.7%	43933	6.02
32	AP2M1_HUMAN	AP-2 complex subunit mu OS=Homo sapiens GN=AP2M1 PE=1 SV=1	268	13	23.2%	49623	9.57
33	UC12_HUMAN	Putative RNA binding protein UC12 OS=Homo sapiens GN=UC12 PE=1 SV=2	267	5	15.5%	46486	10.02
35	ITPA_HUMAN	Uridine 5'-monophosphatase OS=Homo sapiens GN=ITPA PE=1 SV=3	257	8	9.7%	129851	4.43
36	UAP1_HUMAN	Uridine 5'-monophosphatase OS=Homo sapiens GN=UAP1 PE=1 SV=1	257	7	17.7%	52189	8.31
37	PSMD3_HUMAN	20S proteasome non-ATPase regulatory subunit 3 OS=Homo sapiens GN=PSMD3 PE=1 SV=1	243	10	23.4%	56140	6.85
38	RHO1_HUMAN	Rho GTPase-activating protein 1 OS=Homo sapiens GN=RHO1 PE=1 SV=1	240	10	28.0%	50044	5.85
39	ODD2_HUMAN	Oxidation-reduction domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens GN=ODD2 PE=1 SV=1	229	8	36.0%	48724	8.11
41	PCOL1_HUMAN	Protein collagenase OS=Homo sapiens GN=PCOL1 PE=1 SV=1	224	3	9.5%	54096	6.84
42	UBA3_HUMAN	UBA3 OS=Homo sapiens GN=UBA3 PE=1 SV=2	209	4	9.8%	51819	5.3
44	CHL2_HUMAN	CHL2 OS=Homo sapiens GN=CHL2 PE=1 SV=3	207	7	21.4%	49944	6.15
45	ELF1A_HUMAN	Elongation factor 1 alpha OS=Homo sapiens GN=ELF1A PE=1 SV=1	197	7	22.0%	50109	9.1
46	ZNFX1_HUMAN	Zinc finger protein 1 OS=Homo sapiens GN=ZNFX1 PE=1 SV=1	183	6	14.5%	51650	5.82
46	RIBP1_HUMAN	Protein biosynthesis factor 1 OS=Homo sapiens GN=RIBP1 PE=1 SV=1	174	5	10.8%	47790	4.89
48	PLE1_HUMAN	Phospholipase D OS=Homo sapiens GN=PLE1 PE=1 SV=1	160	8	30.4%	54671	6.02
52	NECB2_HUMAN	Nucleobindin 2 OS=Homo sapiens GN=NECB2 PE=1 SV=2	145	6	16.2%	50164	5.03
53	SEPL1_HUMAN	Septin-1 OS=Homo sapiens GN=SEPL1 PE=1 SV=3	139	3	7.5%	52360	6.15
54	DHE3_HUMAN	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=DHE3 PE=1 SV=2	134	4	7.3%	61359	7.56
55	TXN2S_HUMAN	Thioredoxin domain-containing protein 2 OS=Homo sapiens GN=TXN2S PE=1 SV=2	126	6	11.3%	47599	5.63
57	PA2B_HUMAN	Phosphatase 2 OS=Homo sapiens GN=PA2B PE=1 SV=1	117	3	7.9%	47448	6.9
58	MNA_HUMAN	Mitochondrial nucleoside diphosphate and triphosphate hydrolase MNA OS=Homo sapiens GN=MNA PE=1 SV=1	113	2	4.9%	52767	6.23
59	ALBU_HUMAN	Serum albumin OS=Homo sapiens GN=ALBU PE=1 SV=2	109	3	5.4%	61922	5.92
60	RLB_HUMAN	60S ribosomal protein L4 OS=Homo sapiens GN=RLB1 PE=1 SV=5	108	3	8.7%	47667	11.07
62	CAUR_HUMAN	Calreticula OS=Homo sapiens GN=CAUR PE=1 SV=1	100	2	6.0%	48112	4.29
64	NDA1_HUMAN	Nucleoside diphosphate (ubiquinone) epimerase 1, mitochondrial OS=Homo sapiens GN=NDA1 PE=1 SV=4	97	4	7.8%	50785	8.51
66	TRX1_HUMAN	Thioredoxin OS=Homo sapiens GN=TRX1 PE=1 SV=2	92	3	7.0%	52508	7.46
68	P2X4_HUMAN	P2X4 nucleotide-gated cation channel OS=Homo sapiens GN=P2X4 PE=1 SV=2	90	4	12.2%	41395	5.18
70	GOSK1_HUMAN	Glycogen synthase kinase 3 OS=Homo sapiens GN=GOSK1 PE=1 SV=2	87	2	5.0%	50949	8.95
71	FOA4_HUMAN	Protein disulfide-isomerase OS=Homo sapiens GN=FOA4 PE=1 SV=3	83	4	6.9%	57981	4.76
72	SCN1L_HUMAN	Scoerone-1 OS=Homo sapiens GN=SCN1L PE=1 SV=2	83	2	5.3%	46353	4.66
76	PABP1_HUMAN	Polypyridyl-binding protein 2 OS=Homo sapiens GN=PABP1 PE=1 SV=2	75	2	7.8%	52729	5.54
79	TCDF_HUMAN	T-complex protein 1 subunit delta OS=Homo sapiens GN=CTCF PE=1 SV=4	71	2	6.1%	58129	7.55
84	PACN3_HUMAN	Protein kinase C and casein kinase substrate 3 OS=Homo sapiens GN=PACN3 PE=1 SV=2	67	1	2.0%	48457	5.83
85	LUZIL1_HUMAN	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1 OS=Homo sapiens GN=LUZIL1 PE=1 SV=2	66	1	2.8%	52231	6.81
89	DNRP1_HUMAN	Asparagine aminopept					

Table des illustrations

Figure 1 : Structure du système nerveux	4
Figure 2 : Propagation de l'influx nerveux suite à un stimulus du récepteur sensoriel à l'effecteur	5
Figure 3 : Disque embryonnaire à j19 vue dorsale.....	6
Figure 4 : Formation de la chorde	7
Figure 5 : Neurulation	8
Figure 6 : Mécanismes moléculaires impliqués dans la formation du tube neural coupe transversale (entre j9 et j25).....	9
Figure 7 : Gradients d'expression de différentes molécules aidant à l'élaboration de l'identité cellulaire au sein du tube neural axe dorso ventral (coupe transversale).....	10
Figure 8 : Facteurs moléculaires influençant le développement antéro-postérieur du tube neural pendant le développement embryonnaire.....	11
Figure 9 : Voie de signalisation du Sonic Hedgehog.....	12
Figure 10 : Voie de signalisation du TGF- β (Transforming Growth Factors β).....	14
Figure 11 : Voie de signalisation des BMPs (Bone Morphogenetic Proteins).....	15
Figure 12 : Voie de signalisation du Wnt.....	16
Figure 13 : Voie de signalisation du FGF	18
Figure 14 : Voie de signalisation de l'acide rétinoïque.....	19
Figure 15 : Voie de signalisation de Notch.....	21
Figure 16 : Mécanismes moléculaires et cellulaires guidant la différenciation neurale dans le neurectoderme	23
Figure 17 : Développement segmentaire de la moelle épinière à 10 semaines.....	24
Figure 18 : Evolution de la moelle épinière entre 8 semaines et l'âge adulte.....	25
Figure 19 : Structure du nerf périphérique	26
Figure 20 : Structure du neurone.....	27
Figure 21 : Innervation par les motoneurones du fuseau musculaire.....	30
Figure 22 : Maturation des cellules de Schwann d'après (Jessen and Mirsky 2005).....	32
Figure 23 : Réseau mitochondrial et structure de la mitochondrie	33
Figure 24 : Cycle de vie mitochondrial.....	35
Figure 25 : Schéma général de la production d'énergie de la cellule	35
Figure 26 : Hélice de Lynen ou β -oxydation.....	37

Figure 27 : Chaîne respiratoire de la membrane interne mitochondriale.....	38
Figure 28 : Stress oxydant.....	39
Figure 29 : Formation et maturation des autophagosomes dans les neurones	41
Figure 30 : Représentation schématique des principales protéines impliquées dans la dynamique mitochondriale.....	45
Figure 31 : Organisation schématique d'une MAM.....	46
Figure 32 : Représentation schématique de GDAP1	49
Figure 33 : Localisation des gènes impliqués dans les CMT	58
Figure 34 : Coupes longitudinales de biopsies de nerf humain (contrôle et patient GDAP1) observées en microscopie électronique à différents grossissements	61
Figure 35 : Les différents types de cellules souches	69
Figure 36 : Différentes méthodes de reprogrammation de cellules somatiques en cellule iPS	77
Figure 37 : Voie de signalisation impliquée dans l'établissement de la pluripotentialité.....	80
Figure 38 : Colonies de cellules iPS humaines cultivées sur un tapis de cellules nourricières	83
Figure 39 : Caractéristiques des cellules iPS humaines	84
Figure 40 : Potentiel thérapeutique des cellules iPS et des organoïdes	85
Figure 41 : Voies de différenciation des ESCs et des iPSs et leurs principaux facteurs.....	86
Figure 42 : Molécules utilisées dans la différenciation des iPS en MN.....	91
Figure 43 : Schéma général d'un canal de séparation de FFF	92
Figure 44 : Principe général de séparation cellulaire par SdFFF en mode inertiel	94
Figure 45 : Profil d'élution (fractogramme) d'astrocytes à partir de cerveaux de rats nouveaux nés.....	95
Figure 46 : Prototype de phase 1 (gauche) et de phase 2 (droite)	96
Figure 47 : Diffraction d'un rayon lumineux.....	97
Figure 48 : Tache de Airy	98
Figure 49 : Potentiel d'action comprenant les phases de dépolarisation, repolarisation et hyperpolarisation.....	101
Figure 50 : Principe général du patch-clamp	102
Figure 51 : Schématisation des différentes configurations de patch clamp	103
Figure 52 : Photographie en microscopie optique de patch clamp de neurone.....	103
Figure 53 : Chronologies générales de ce travail et articles en relation.....	106
Figure 54 : Chronologie de la reprogrammation des fibroblastes dermiques en cellules iPSc	111

Table des tableaux

Tableau 1 : Comparaison entre les motoneurones supérieurs et inférieurs.....	29
Tableau 2 : Principales pathologies associées aux protéines composant les MAM.....	47
Tableau 3 : Classification des CMT selon le type de l'atteinte nerveuse	57
Tableau 4 : Classification des CMT (Tazir et al. 2014).....	59
Tableau 5 : Aspects cliniques des CMT-GDAP1.....	60
Tableau 6 : Drogues testées contre les CMT1A.....	65
Tableau 7 : Concentration ionique [Ion], des milieux intracellulaires et extracellulaires d'une cellule musculaire squelettique de mammifère	100
Tableau 8 : Patch clamp, avantages et inconvénients des différentes configurations.....	102

Titre : Cellules souches pluripotentes induites (iPSc) différenciées en motoneurons spinaux : vers des modèles cellulaires de neuropathies périphériques d'origine génétique

Résumé

Les cellules souches induites à la pluripotence (iPSc) apparaissent comme une solution très intéressante pour créer et observer le comportement de cellules spécifiques et inaccessibles d'un patient. Notre équipe travaille sur les pathologies génétiques des nerfs périphériques et en particulier la maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT). Un de nos objectifs est le développement de modèles de motoneurons de patients utilisant la stratégie des iPSc afin de mieux comprendre la physiopathologie des neuropathies liées au gène *GDAP1*. Ce gène a été décrit en 1998 pour être responsable d'une forme axonale de CMT ; il code une protéine de la membrane externe mitochondriale dont la fonction précise reste encore méconnue. Des fibroblastes dermiques (FD) ont été obtenus après une biopsie de peau d'une personne saine (témoin) et d'un patient homozygote porteur de la mutation non-sens p.Gln163* dans le gène *GDAP1*. Par la suite, les FDs ont été reprogrammés en cellules iPSc en utilisant le cocktail de Yamanaka (plasmides non intégratifs composés d'Oct4, Sox2, Klf4 et I-Myc). Après amplification, tous les contrôles ont été effectués pour conclure que nos iPSc avaient les mêmes propriétés et les mêmes capacités que les cellules souches embryonnaires ainsi qu'un caryotype normal. Enfin, nous avons optimisé le protocole de différenciation avec succès de manière à obtenir à partir des iPSc des rosettes (structures pleines de progéniteurs neuronaux), puis des neurones et finalement des motoneurons pour le contrôle et le patient. Les premières différences entre le contrôle et le patient ont été observées lors de l'obtention de rosettes. Les cellules du patient présentaient de nombreuses gouttelettes lipidiques et la proportion de rosettes obtenue était plus faible. Une fois les motoneurons obtenus, des tests de microscopie confocale et électroniques ont montré des différences du réseau mitochondrial entre le témoin et le patient, ainsi qu'une morphologie des mitochondries se rapprochant de celle observée lors de biopsie de nerf de patient (rondes / accumulées). De manière à réduire la durée de différenciation, une méthode de tri cellulaire a été utilisée la SdFFF. Cette méthode nous a permis de trier différents progéniteurs (neuraux / endothéliaux). La génération de motoneurons à partir de fibroblastes dermiques de patient atteint de CMT axonale via les iPSc était une première étape cruciale pour mieux comprendre le rôle de *GDAP1* dans cette pathologie. Ce modèle cellulaire de CMT4A est un premier pas pour réaliser des tests précliniques de médicaments afin d'identifier de futurs candidats pharmacologiques.

Mots clés : Charcot-Marie-Tooth type axonal ; GDAP1 ; mitochondrie ; hiPSc ; motoneurons

Titre: Spinal motor neurons from Induced Pluripotent Stem Cells (iPSc): cellular models of genetic peripheral neuropathies

Abstract

Induced pluripotent stem cells (iPSc) are a highly interesting tool to create and observe the behavior of specific and unattainable cells from a patient. Our team is interested in genetic peripheral nerves disorders and especially in Charcot-Marie-Tooth disease (CMT). One of our objectives is the development of motor neurons models from patients using the iPSc strategy in order to better understand the pathophysiology of *GDAP1*-related neuropathies. This gene was found in 1998 to be mutated in an axonal form of CMT and encodes a mitochondrial outer membrane protein, which function remains unclear. We first obtained dermal fibroblasts (DF) from skin biopsies of a healthy person and of a homozygous patient carrying *GDAP1* non-sense mutation (p.Gln163*). Then, we reprogrammed DFs into iPSc using non-integrative plasmids (Oct4, Sox2, Klf4 and I-Myc). After amplification, all quality controls were performed to conclude that our iPSc had the same properties and capacities than embryonic stem cells and a normal karyotype. Finally, we optimized protocols to successfully differentiate these iPSc into rosettes (structures full of neural progenitors), then into neurons and finally into motor neurons for control and *GDAP1* patients. The first differences between control and patient cells were observed during the rosette formation, where a lot of patient cells were full of lipid droplets, and the rosette proportion was lower than the control cells. Mitochondria morphology was totally different in motor neurons between control and patient, where mitochondria had the same morphology than the mitochondria observed in patient nerve biopsies (round and accumulated). In order to reduce the time of differentiation, a cell sorting method was used (SdFFF). It allowed us to sort different progenitors (neural / endothelial). Generation of motor neurons using axonal CMT-patient-derived iPSc was a first crucial step to better understand the role of *GDAP1* in this pathology. This cellular model of CMT4A should ultimately allow us to perform preclinical drug screening in order to identify candidate pharmacological treatments for CMT patients.

Keywords: axonal Charcot-Marie-Tooth ; GDAP1 ; mitochondria ; hiPSc ; motor neurons