



**HAL**  
open science

# Modélisation du syndrome d'Andersen dans les cellules souches pluripotentes induites : implication du canal potassique Kir2.1 dans la morphogenèse osseuse

Jonathan Pini

► **To cite this version:**

Jonathan Pini. Modélisation du syndrome d'Andersen dans les cellules souches pluripotentes induites : implication du canal potassique Kir2.1 dans la morphogenèse osseuse. Sciences agricoles. Université Nice Sophia Antipolis, 2016. Français. NNT : 2016NICE4042 . tel-01435457

**HAL Id: tel-01435457**

**<https://theses.hal.science/tel-01435457>**

Submitted on 14 Jan 2017

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

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



**UNIVERSITE NICE SOPHIA-ANTIPOLIS – UFR SCIENCES**

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé (ED-85)

LABORATOIRE DE PHYSIOMEDECINE MOLECULAIRE, LP2M-CNRS-UMR 7370

**THESE**

**Présentée pour obtenir le titre de  
Docteur en Sciences de la vie**

Soutenue le 13 Juillet 2016 par

**Jonathan PINI**

Modélisation du syndrome d'Andersen dans les cellules  
souches pluripotentes induites : implication du canal  
potassique Kir2.1 dans la morphogenèse osseuse.

Devant le jury composé de :

**Dr Ez-Zoubir AMRI**

**Dr Jean-Marc LEMAITRE**

**Dr Ariane BERDAL**

**Dr Saïd BENDAHHOU**

**Président**

**Rapporteur**

**Rapporteur**

**Directeur de thèse**



## Modélisation du syndrome d'Andersen dans les cellules souches pluripotentes induites : implication du canal potassique Kir2.1 dans la morphogenèse osseuse.

Le syndrome d'Andersen est une maladie rare, caractérisée par une triade de symptômes : paralysies périodiques, des arythmies ventriculaires et des défauts de développement. Une seule protéine a été associée à cette pathologie, le canal potassique à rectification entrante Kir2.1, codée par le gène *KCNJ2*. Ce canal est impliqué principalement dans le maintien du potentiel de repos dans les tissus excitables.

Afin d'étudier la physiopathologie du syndrome d'Andersen, nous avons généré des cellules souches pluripotentes induites (iPS) à partir de biopsies d'individus sains et de patients. Les cellules iPS générées présentent toutes les caractéristiques des cellules souches embryonnaires : expression des marqueurs de la pluripotence et capacité de différenciation en cellules des trois feuillets embryonnaires (Stem Cells Dev 25: 151-159).

Nous avons ensuite différencié les cellules iPS générées en cellules souches mésenchymateuse (MSC). Ces MSC présentent une forte expression des marqueurs typiques des MSC, une absence d'expression des marqueurs hématopoïétiques ainsi que la capacité de se différencier en adipocytes. Cependant, les cellules MSC de patients présentent une capacité de différenciation en ostéoblastes diminuée. En effet, la production de matrice extracellulaire est réduite chez les patients par rapport aux cellules contrôles. De plus, au cours de la différenciation, les cellules de patients ont une expression de *RUNX2* et d'*Osterix* (les gènes « master » de la différenciation ostéoblastique) très fortement réduite par rapport aux contrôles, ce qui entraîne une expression très faible des gènes sous le contrôle de ces deux master genes, et donc une efficacité de différenciation réduite.

Nous avons également étudié la différenciation chondrocytaires des cellules MSC contrôle et Andersen. De manière surprenante, les MSC de patients se différencient moins en chondrocytes par rapport aux cellules contrôles, avec une faible production de matrice cartilagineuse et une expression des marqueurs chondrocytaires réduite.

L'ensemble de mes travaux de thèse montre que le canal potassique Kir2.1 n'est pas important pour la reprogrammation en cellules iPS, ni pour la différenciation en cellules mésodermiques telles que les MSC et les adipocytes. En revanche, la faible capacité des MSC de patients à se différencier en ostéoblastes et en chondrocytes montre qu'un canal Kir2.1 fonctionnel est essentiel au développement osseux. Ces défauts de différenciation ostéoblastique et chondrocytaire observés avec les cellules de patients pourraient expliquer les dysmorphies associées avec le syndrome d'Andersen.



## Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse.

Je tiens également à remercier le directeur du laboratoire, le docteur Jacques Barhanin, de m'avoir accueilli en thèse au sein de l'unité. Merci d'avoir été présent pendant toutes ces années.

Je tiens ensuite à remercier mon chef, le docteur Saïd Bendahhou, pour m'avoir permis de réaliser ma thèse dans son équipe. On ne savait pas trop où tout cela aller nous mener, main on a réussi à faire du bon travail et je suis content d'avoir contribué à ce projet.

Je remercie également tous les membres du laboratoire, avec qui j'ai interagit au cours de ma thèse. Merci à tous pour votre disponibilité et votre patience.

Avant de m'attaquer à ceux qui restent dans le labo, je voudrais remercier Nico, le whisky sur le coca comme il dirait, pour toutes ces heures de galères passées au labo et surtout ces apéros de l'autre monde qui nous auront permis d'oublier la galère de la thèse.

A ceux qui vont rester dans le labo, je vous souhaite bonne chance et je vous remercie tous pour ces années passer à vos côtés. Vous êtes enfin libéré de ma présence. Comme je suis super à la bourre sur ce manuscrit, je ne vais pas tout vous citer mais sachez que j'ai adoré tous les moments que j'ai partagé avec vous. Je remercie Jonas, Auréa, Nourhène, Lidia, Agathe et tous ceux qui m'ont aidé pendant ma thèse. Je veux remercier également Séréna pour toutes nos discussions scientifiques, ou pas, autour d'un café ou dans le bureau. Tu m'as initié à l'art obscur de la protéomique, et même si je ne comprends pas tout, j'ai vraiment apprécié de travailler avec toi. Je remercie également Julia, ma petite esclave stagiaire car tu m'as vraiment aidé pendant que j'écrivais mon petit tome d'Harry Potter. Merci pour ta bonne humeur, et même si tu es beaucoup trop familière, j'espère que tu réussiras à faire ce dont tu as envie.

Je tiens également à remercier le 11<sup>ème</sup> étage et particulièrement Didier. Tu as été mon principal fournisseur au cours de ma thèse, et je t'en remercie. Je pense que tu ne voudras plus jamais qu'un étudiant de notre étage vienne te parler mais je te remercie vraiment pour tout ce que tu as fait, aussi bien au niveau scientifique que autres. Tu as toujours été de très bon conseil et nos pauses café vont me manquer.

En dehors du labo mais toujours dans la science, je tiens à remercier mes copains de galère Yann, Nico et Chrichri. Vous avez toujours été au top et nos nombreux apéros/soirées/cuites et débats scientifiques nous ont été d'une grande aide pour supporter la thèse. On ne sait pas de quoi l'avenir est fait mai je suis très heureux d'avoir partager le master et la thèse avec vous. Yann, merci pour ces grands moments de n'importe quoi, tu restes le seul que je connaisse à avoir abusé de la grosse dame. Chrichri, merci pour toutes ces soirées mémorables, nos débats scientifiques, nos parties de call of arrosé par du whisky, et ces pauses café de longueur variable sur pasteur. Nico, merci pour tout, tu as toujours été là, avec ta philosophie particulière, mais je n'oublierai jamais les moments passés avec toi, que ça soit consolesque (oui ce mot n'existe pas), ou piclesque (oui celui la aussi n'existe pas). Merci pour toutes ces soirées zombies, et autres, et même si tu n'aimes pas le culs secs, on s'est pris des bonnes caisses ensemble.

Merci également à Antho et Sab, et Angel et Guillaume, pour tous ces bons moments, qui m'ont permis d'oublier le temps d'une soirée ou d'un weekend à Milan le travail et la science.

Gaëlle, je ne vais pas m'étendre sur ces remerciements, car il y aurait jamais assez de place pour te dire tout ce que je pense. Merci d'avoir été là pendant les bons comme les mauvais (voire très mauvais) moments. Tu as été d'un soutien indescriptible et c'est grâce à toi que j'ai pu tout surmonter au cours de ma thèse.... Merci pour tout et je t'aime

Enfin, je voudrais remercier mes parents, sans qui tout cela n'aurait pas été possible. Merci d'avoir toujours été là pour moi, de m'avoir soutenu, encouragé à continuer quand j'avais envie d'arrêter. Vous êtes au top et tous les mots du monde ne suffiraient pas pour vous dire à quel point je vous suis reconnaissant pour tout.

## Sommaire

Remerciements .....	4
Sommaire .....	6
Table des illustrations .....	9
Liste des abréviations .....	13
Introduction .....	18
I. Le Syndrome d'Andersen.....	19
A. Manifestation cardiaque .....	20
B. Manifestations musculaires : paralysies périodiques .....	24
C. Anomalies du développement osseux.....	27
D. Phénotypes additionnels .....	29
E. Traitements actuels.....	30
1. Traitements des arythmies cardiaques .....	30
2. Traitements des faiblesses musculaires et paralysies périodiques .....	31
F. Gènes et mutations associés au syndrome d'Andersen .....	32
II. Les canaux potassiques à rectification entrante Kir2.x.....	33
A. Généralité sur les canaux Kir. ....	35
B. Structure des canaux Kir2.x.....	37
C. Rectification et activation des canaux Kir2.x. ....	40
1. Les polyamines et le Magnésium ( $Mg^{2+}$ ) intracellulaire.....	40
2. Régulation des canaux Kir2.x par les phosphoinositides.....	44
D. Trafic et localisation des canaux Kir2.x.....	47
E. Rôles physiologiques des canaux Kir2.x.....	49
1. Cœur .....	49
2. Vaisseaux sanguins.....	52
3. Rôle des canaux Kir2.x dans les neurones.....	53
4. Rôle des canaux Kir2.x dans le muscle squelettique.....	54
5. Rôle du canal Kir2.1 dans le tissu osseux .....	56
F. Pathologies liées à une dysfonction du canal Kir2.1 .....	57
1. Perte de fonction : syndrome d'Andersen de type I .....	57
2. Gain de fonction : syndrome du QT court et fibrillation auriculaire.....	59
G. Pharmacologie.....	59

H.	Modèles d'étude <i>in vivo</i> .....	60
1.	Zebrafish.....	60
2.	Drosophile .....	61
3.	Souris .....	63
III.	Les tissus osseux et cartilagineux.....	65
A.	Le tissu osseux.....	67
1.	L'ossification intra-membranaire ou directe. ....	69
2.	L'ossification endochondrale .....	71
B.	Le tissu cartilagineux.....	74
C.	Acteurs de l'ostéogenèse.....	76
1.	Cellules Souches Mésenchymateuses (MSC) .....	76
2.	Ostéoblastes et ostéocytes.....	78
3.	Chondrocytes .....	89
D.	Les voies de signalisation ostéogénique.....	96
1.	La voie des Bone Morphogenetic Protein (BMP).....	97
2.	La voie de signalisation Wnt.....	102
IV.	Les cellules souches pluripotentes induites (iPS).....	108
A.	Cellules souches embryonnaires.....	110
B.	Généralité sur les cellules iPS. ....	112
C.	Facteurs et mécanismes de la reprogrammation.....	113
D.	Génération des cellules iPS.....	116
1.	Reprogrammation par méthode transgénique.....	117
2.	Reprogrammation sans utilisation de transgène .....	119
E.	Caractérisation des cellules iPS.....	121
1.	Intégrité génomique.....	122
2.	Expression génique et membranaire.....	122
3.	Statut épigénétique.....	125
4.	Pluripotence.....	127
F.	Utilisation des cellules iPS.....	131
1.	Criblage de composés à visée thérapeutique .....	132
2.	Modélisation de maladie et gene editing.....	134
	Résultats .....	144
	Article 1 : Modeling Andersen's syndrome in human induced Pluripotent Stem cells ..	146

Article 2 : The inward rectifier potassium channel Kir2.1 drives master genes expression during osteoblastogenesis.....	157
Article 3 : Kir2.1 channel controls the chondrogenic differentiation of human iPS derived Mesenchymal Stem Cells. ....	192
Discussion .....	203
Bibliographie .....	219

## Table des illustrations

<u>Figure 1</u> : Représentation schématique du coeur .....	20
<u>Figure 2</u> : Représentation schématique d'un tracé d'électrocardiogramme .....	21
<u>Figure 3</u> : Représentation schématique de l'élongation de l'intervalle QT.....	22
<u>Figure 4</u> : Manifestations cardiaques observées chez les patients atteints par le syndrome d'Andersen.....	23
<u>Figure 5</u> : Evaluations électromyographiques des patients Andersen.....	26
<u>Figure 6</u> : Anomalies développementales chez les patients Andersen.....	29
<u>Figure 7</u> : Représentation des mutations sur le canal Kir2.1 associé avec le syndrome d'Andersen.....	33
<u>Figure 8</u> : Transport de l'ion potassium et établissement du potentiel de repos .....	34
<u>Figure 9</u> : Courbes représentant l'intensité en fonction du voltage (I/V) des courants à rectification sortante et entrante.....	36
<u>Figure 10</u> : Phylogénie des canaux Kir.....	37
<u>Figure 11</u> : Structure basique d'une sous-unité d'un canal Kir.....	38
<u>Figure 12</u> : Architecture moléculaire des canaux Kir.....	39
<u>Figure 13</u> : Représentation schématique du mécanisme de la rectification des canaux Kir. ....	40
<u>Figure 14</u> : Structure des polyamines endogènes.....	41
<u>Figure 15</u> : Agrandissement de la région transmembranaire, avec l'acide aspartique (Asp ou D) « contrôleur de rectification » (D172) pour le canal Kir2.1, le filtre de sélectivité (vert), et la zone de croisement (bundle crossing, rouge).....	42
<u>Figure 16</u> : Agrandissement du domaine cytoplasmique, où deux anneaux de charge sont identifiés (« upper ring » en jaune et « lower ring » en vert). ....	43
<u>Figure 17</u> : Métabolisme des phosphoinositides.....	44
<u>Figure 18</u> : La fixation du PI(4,5)P <sub>2</sub> au niveau du domaine transmembranaire des canaux Kir provoque un changement conformationnel qui ouvre celui-ci .....	45
<u>Figure 19</u> : Schéma du mécanisme d'ouverture du canal Kir2.1 par le PI(4,5)P <sub>2</sub> .....	46
<u>Figure 20</u> : Potentiel d'action cardiaque ventriculaire, et courants ioniques associés (rouge : entrant, bleu : sortant). ....	49
<u>Figure 21</u> : Excitabilité des cardiomyocytes .....	50
<u>Figure 22</u> : Représentation schématique de la courbe I/V du courant IK <sub>1</sub> .....	51

<u>Figure 23</u> : Formation du muscle .....	55
<u>Figure 24</u> : Représentation en cartoon d'une sous unité du canal Kir2.1 montrant les deux résidus importants pour le blocage du canal par le Ba <sup>2+</sup> .....	60
<u>Figure 25</u> : L'invalidation du canal Irk2 chez la drosophile provoque un défaut de développement de l'aile .....	62
<u>Figure 26</u> : L'invalidation simultanée de Irk2 et de la voie Dpp aggrave la malformation de l'aile.....	63
<u>Figure 27</u> : Les souris Ko pour le canal Kir2.1 présentent une fente palatine .....	64
<u>Figure 28</u> : Les souris KO pour le canal Kir2.1 présentent des anomalies digitales.....	65
<u>Figure 29</u> : Représentation schématique du cycle du remodelage osseux.....	67
<u>Figure 30</u> : Diagramme illustrant la contribution de la crête neurale, des somites et du mésoderme de la plaque latérale, pour la squelettogénèse.....	68
<u>Figure 31</u> : Représentation schématique des os formés par ossification directe et dérivés de la crête neurale chez l'homme.....	69
<u>Figure 32</u> : Représentation schématique des différentes étapes de l'ossification directe .....	70
<u>Figure 33</u> : Représentation schématique des différentes étapes l'ossification endochondrale.....	72
<u>Figure 34</u> : Représentation schématique de l'organisation de la plaque de croissance chez les mammifères .....	73
<u>Figure 35</u> : Topographie du cartilage chez l'homme adulte .....	75
<u>Figure 36</u> : Les cellules MSC sont capables de se différencier en cellules d'origine mésodermique mais également non-mésodermique.....	78
<u>Figure 37</u> : La différenciation des MSC en ostéoblastes nécessite plusieurs étapes.....	80
<u>Figure 38</u> : Régulation de la différenciation ostéoblastique par RUNX2.....	85
<u>Figure 39</u> : La différenciation des MSC en chondrocytes se fait en plusieurs étapes.....	90
<u>Figure 40</u> : Régulation de la différenciation chondrocytaire par Sox9 et RUNX2 .....	96
<u>Figure 41</u> : Schéma de la transduction du signal BMP.....	99
<u>Figure 42</u> : Le BMP induit l'expression de RUNX2 et d'OSX <i>via</i> les Smad.....	101
<u>Figure 43</u> : La voie de signalisation canonique Wnt.....	104
<u>Figure 44</u> : Représentation schématique de l'implication de la voie canonique de Wnt au cours de l'ossification.....	106
<u>Figure 45</u> : Les différents types de cellules souches.....	109

<u>Figure 46</u> : Représentation d'un blastocyste, avec la masse cellulaire interne d'où proviennent les cellules ES. ....	109
<u>Figure 47</u> : Obtention et capacité de différenciation des cellules souches embryonnaires .....	111
<u>Figure 48</u> : Morphologie des cellules ES (à gauche) et iPS (à droite) <i>in vitro</i> .....	113
<u>Figure 49</u> : Génération des cellules iPS à partir de cellules adultes.....	114
<u>Figure 50</u> : Représentation schématique des différentes techniques utilisées pour générer des cellules iPS.....	117
<u>Figure 51</u> : Tableau comparant les différentes méthodes de génération des cellules iPS, ainsi que l'efficacité du processus de reprogrammation.....	121
<u>Figure 52</u> : Comparaison du profil d'expression génique entre les cellules ES et iPS. ...	123
<u>Figure 53</u> : Caractérisation phénotypique des cellules iPS.....	124
<u>Figure 54</u> : Formation de tératomes <i>in vivo</i> , avec la présence de structures des trois feuillets embryonnaires. ....	128
<u>Figure 55</u> : Formation de corps embryoïdes et expression de marqueurs des trois feuillets embryonnaires. ....	130
<u>Figure 56</u> : Utilisation des cellules iPS, qu'elles soient spécifiques de différentes pathologies, ou issues d'un donneur sain.....	132
<u>Figure 57</u> : Stratégie de criblage de drogues, à partir de cellules iPS. ....	133
<u>Figure 58</u> : Représentation des différentes maladies qui ont été modélisées, par utilisation des cellules de patients ou les techniques de gene editing.....	135
<u>Figure 59</u> : Représentation schématique d'un potentiel d'action cardiaque, des gènes associés aux différents courants des différentes phases de ce potentiel d'action (A) et du LQTS associé à la perte de fonction de chacun d'entre eux (B).....	136
<u>Figure 60</u> : Gene editing dans les cellules ES, par la technique de la recombinaison homologe spontanée.....	138
<u>Figure 61</u> : Gene editing dans les cellules ES et iPS, par des techniques de cassure spécifique de l'ADN .....	138
<u>Figure 62</u> : La combinaison des techniques de gene editing et de cellules iPS peut être utilisée pour évaluer l'implication d'un <i>locus</i> particulier dans la maladie.....	140
<u>Figure 63</u> : Utilisation des iPS en thérapie humaine.....	143



<u>Figure 64</u> : Les cellules iPS-MSC contrôle peuvent se différencier en chondrocytes fonctionnels, tandis que les cellules iPS-MSC Andersen présentent une capacité de différenciation réduite.....	193
<u>Figure 65</u> : L'expression des marqueurs chondrocytaire est réduite lorsque le canal Kir2.1 est non fonctionnel.....	195
<u>Figure 66</u> : L'inhibition du canal Kir2.1 dans les cellules iPS-MSC diminue la quantité de matrice cartilagineuse produite. ....	197
<u>Figure 67</u> : L'inhibition du canal Kir2.1 dans les cellules iPS-MSC contrôles entraîne une forte diminution dans l'expression des marqueurs chondrocytaires.....	198
<u>Figure 68</u> : La réexpression d'un canal Kir2.1 sauvage dans les cellules iPS-MSC Andersen restaure leur capacité à se différencier en chondrocytes. ....	199
<u>Figure 69</u> : La réexpression d'un canal Kir2.1 sauvage dans les cellules iPS-MSC Andersen permet une forte augmentation de l'expression des marqueurs chondrocytaires.....	200
<u>Figure 70</u> : Le canal Kir2.1 est essentiel à l'expression de <i>RUNX2</i> et de <i>Sox9</i> au cours de la morphogenèse osseuse. ....	212
<u>Figure 71</u> : Mécanisme moléculaire hypothétique des conséquences de la perte de fonction du canal Kir2.1, pendant l'ostéogenèse.....	215
<u>Figure 72</u> : Principales voies régulant <i>Sox9</i> et <i>RUNX2</i> lors de la chondrogenèse .....	216
<u>Figure 73</u> : Régulation de la différenciation ostéoblastique par les miRNA. ....	217

## Liste des abréviations

A1AT : Alpha1 Anti-Trypsin

ADN : Acide désoxyribonucléique

AFP : Alpha FoetoProtein

ALS : sclérose latérale amyotrophique

AMPc : Adénosine Monophosphate cyclique

AP-1 : activator protein-1

AP : phosphatase alcaline

APC : Adenomatous Polyposis Coli

ARNm : Acide Ribonucléique messenger

ATF : activating transcription factor

ATP : Adénosine Tri Phosphate

AZA : acetazolamide

Ba<sup>2+</sup> : Barium

β-TrCP : β-Transducin-repeat Containing Protein

BMP : Bone Morphogenetic Protein

Ca<sup>2+</sup> : Calcium

CAI : inhibiteurs de l'anhydrase carbonique

CAMK : calcium calmodulin-dependent protein kinase

Cas9 : CRISPR Associated protein 9

CBFβ : core binding factor β

C/EBP : CCAAT-enhancer-binding proteins

Cl<sup>-</sup> : Chlore

Cs<sup>+</sup> : Césium

cav-1 : Cavéoline 1

cav-3 : cavéoline 3

CK1 : Casein Kinase 1

COOH : Carboxy

Coll1A1 : Collagène de type 1 alpha 1

COMP : Cartilage Oligomeric Matrix Protein

Co-Smad : common partner Smad

D : Asparagine

DAG : diacylglycérol

DCPA : dichlorphenamide

DIM : domaine d'homodimérisation

Dkk-1 : Dickkopf related protein-1

DPI : diagnostic préimplantatoire

Dpp : Decapentaplegic

Dsh : Dishvelled

E : glutamate ou acide glutamique

ECG : électrocardiogramme

EMG : électromyogramme

$E_k$  : potentiel d'équilibre du potassium

$E_{res}$  : potentiel de repos des cellules

ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase

ES : cellules souches embryonnaires

FGF : Fibroblast Growth Factor

FIV : fécondation in vitro

Fzd : Frizzled

GAGs : glycosaminoglycans

GCAP : Germ Cells Alkaline Phosphatase

GLS : sphingolipides

GMPc : Guanosine Monophosphate

GSDIa : Glycogen Storage Disease type Ia

GSK3 $\beta$  : Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$

GS : Domaine riche en Glycine/Sérine

HAT : Histone Acetyl Transferase

HDAC : Histone DeAcetylase

HDR : Homology-Direct Repair

HIF1 $\alpha$  : hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$

Hh : Hedgehog

HMG : high-mobility-group

hyperKPP : hyperkaliémique

hypoPP : hypokaliémique

IAP : intestinal alkaline phosphatase

IP<sub>3</sub> : inositol 1,4,5-triphosphate

iPS : cellules souches pluripotentes induites

I-Smad : Inhibitory Smad

JNK : c-Jun N-terminal kinase

K<sup>+</sup> : Potassium

Kir : courant potassique à rectification entrante

Klf4 : Kruepel-type-zinc-finger transcription factor 4

KO : Knock Out

Krm1/2 : Kremen 1/2

LEF/TCF : Lymphoid Enhancer –binding Factor 1/T Cell specific transcription Factor

LQT : syndrome du QT long

Lrp : Low-density lipoprotein Receptor-related Protein

MAF : musculoaponeurotic fibrosarcoma

MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase

MBD : Methyl-CpG Binding Domain

Mg<sup>2+</sup> : Magnésium

MEF-2 : myocyte enhancer factor 2

MEC : Matrice extracellulaire

MH1 : Mad Homology 1

MH2 : Mad Homology 2

miRNA : micro ARN ou miR

MSC : Cellule stromale mésenchymateuse ou cellule souche mésenchymateuse

Na<sup>+</sup> : Sodium

NES : signal d'export nucléaire

NFATc : Nuclear Factor of Activated T-cells

NFκB : nuclear factor kappa B

NF1 : nuclear factor 1

NH<sub>2</sub> : Amino

NHEJ : Non-Homologous End Joining

NLS : signal de localisation nucléaire

NO : Oxyde d'azote

OCN : Ostéocalcine

Oct4 : Octamer binding protein 4

OPPG : syndrome d'ostéoporose pseudogliome

OPN : Ostéopontine

ORF : cadre ouvert de lecture

OSE2 : osteoblast-specific element 2

OSX : Ostérix

PGC-1α : peroxisome proliferator activator receptor γ coactivator-1α

PI(4,5)P<sub>2</sub> : phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate

PKA : Protein Kinase A

PKC : Protein Kinase C

PLA<sub>2</sub> : phospholipase A<sub>2</sub>

PLC : phospholipase C

PLAP : Placental Alkaline Phosphatase

Prx1 : paired-related homeodomain

PSD93 : chapsyne 110

PSD95 : Post Synaptic Density 95

PST : domaine riche en Proline-Sérine-Thréonine

PtdIns : phosphatidylinositol

PTH : ParaThyroid Hormon

PVC : contractions ventriculaires prématurées

PVT : tachycardies ventriculaires polymorphiques

Py : pyrimidine

QA : domaine riche en glutamine et alanine

RANKL : Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand

RE : réticulum endoplasmique

RHD : Runt Homolgy Domaine

R-Smad : Receptor regulated Smad

RUNX : runt-related transcription factor

SAP : Synapse Associated Protein

siRNA : small interfering RNA

Smad : SMA and Mother Against Decapentaplegic

Smurf : Smad Regulatory Factor

SOST : Sclerostin

Sox : SRY-related hig mobility group-box gene

SSEA4 : Stage Specific Embryonic Antigen 4

TAK1 : TGF $\beta$  Activation Kinase

TALEs : Transcription Activator-like Effectors

Tbx-3 : T-box 3

TCIRG1 : T cell immune regulator 1

TGF $\beta$  : Transforming Growth Factor

TIP60 : tat-interacting protein 60

TLE2 : transducin-like Enhancer of split 2

TM : Transmembranaire

TNAP : Tissu Non specific Alkaline Phosphatase

TNF $\alpha$  : Tumor-Necrosis Factor

TSAP : Tissu specific alkaline phosphatase

T : Thréonine

UTR : non traduit

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

ZNF : protéines à doigt de zinc

# Introduction

---

## I. Le Syndrome d'Andersen.

Le syndrome d'Andersen est une maladie génétique rare à mode de transmission autosomique dominant. Cette pathologie présente une triade caractéristique de symptômes : arythmie ventriculaire, paralysie périodique et anomalies dysmorphiques.

La prévalence exacte du syndrome d'Andersen est inconnue, mais une estimation de 1 cas sur 1 000 000 a été faite (Rajakulendran et al., 2010; Schulze-Bahr, 2012). Le degré de manifestation des symptômes associés au syndrome d'Andersen est extrêmement variable. En effet, la pénétrance est réduite, signifiant que tous les patients atteints par le syndrome d'Andersen n'ont pas les mêmes symptômes et certaines personnes pouvant porter la mutation ne développent jamais la maladie. De même, des membres de la même famille portant donc la même mutation n'ont pas forcément les mêmes manifestations cliniques (Plaster et al., 2001). La première description clinique des combinaisons de symptômes associés avec le syndrome d'Andersen fut publiée en 1963. Le patient souffrait de paralysies périodiques et d'arythmie ventriculaire. Cependant, les malformations osseuses associées au syndrome d'Andersen n'y sont pas été décrites (Klein et al., 1963).

La première description complète de la triade de symptômes fut reportée en 1971 par le docteur Ellen Damgaard Andersen et ses confrères. Chez un enfant de 8 ans, plusieurs anomalies développementales furent reportées peu après la naissance : un crâne large et mou avec une minéralisation incomplète des os frontaux et pariétaux, un défaut de formation du palais (fente palatine), ainsi que des anomalies au niveau de l'extrémités des membres (Andersen et al., 1971). Trois mois après la naissance, des extrasystoles furent détectées sans autres problèmes cardiaques notables. A l'âge de 7 ans, le patient fut admis à l'hôpital pour des épisodes de paralysie périodique. Il présentait également des signes d'un développement anormal. En effet, l'enfant était plus petit que la moyenne, avait une implantation des oreilles basses, une hypoplasie des mandibules ainsi qu'un front allongé. Ces mains étaient petites et il souffrait de clinodactylie et de syndactylie (Andersen et al., 1971). Cependant, ce n'est qu'en 1994 que les symptômes complets associés à cette pathologie furent décrits par le docteur Tawil et ses collègues, grâce à la description de nombreux patients (Tawil et al., 1994). En 2003, il a été suggéré de renommer le syndrome d'Andersen en syndrome



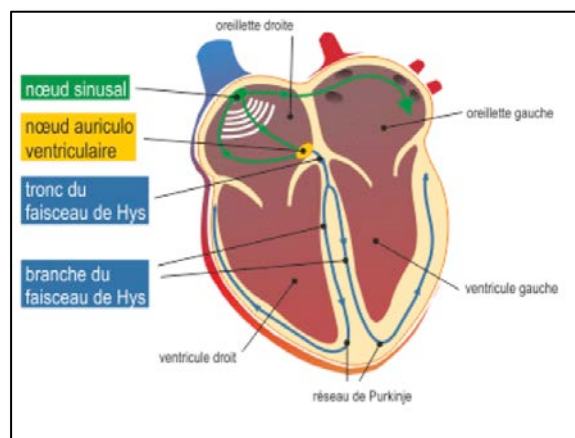
d'Andersen-Tawil, en reconnaissance du travail clinique de Tawil dans cette pathologie (Bendahhou et al., 2003). Aujourd'hui, l'appellation de syndrome d'Andersen-Tawil a été largement accepté, bien que syndrome d'Andersen soit également utilisé.

Les caractéristiques phénotypiques associées au syndrome d'Andersen incluent des anomalies crâniennes, faciales, des anomalies du muscle squelettique ainsi que des manifestations cardiaques (ondes U proéminentes) (Tristani-Firouzi and Etheridge, 2010).

### A. Manifestation cardiaque

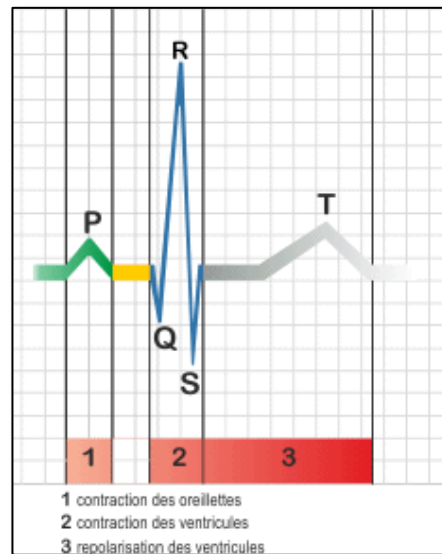
Le cœur est un muscle spécialisé dont la fonction est de permettre la circulation sanguine dans tout le corps le corps à travers ses contractions rythmiques. Comme pour tous les muscles, la contraction mécanique dépend de l'activité électrique des cellules. Pour assurer un fonctionnement normal, le cœur doit enchaîner une séquence d'événements appelée cycle cardiaque (Westbury, 1971).

Les évènements électriques du début du cycle cardiaque commencent au niveau d'une cellule pacemaker dans le nœud sinusal, situé au sommet de l'oreillette droite. Le potentiel d'action généré se propage alors lentement dans les cellules atriales provoquant la contraction des oreillettes. Le potentiel d'action se propage ensuite à travers le nœud auriculo-ventriculaire, puis le faisceau de Hys et le réseau de Purkinje, jusqu'à la pointe du cœur, provoquant la contraction des ventricules (Figure 1 ; Westbury, 1971).



**Figure 1: Représentation schématique du cœur**

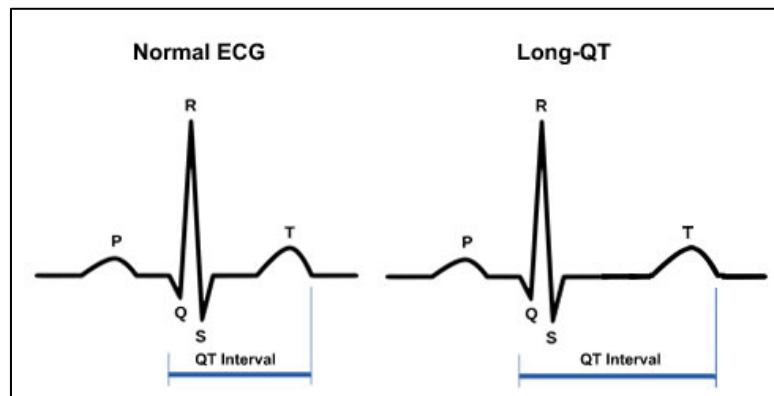
Il est possible d'enregistrer l'activité électrique du cœur grâce à un électrocardiogramme (ECG). Grâce à des électrodes, l'ECG permet d'enregistrer une succession de séquence électrique du cœur, représenté par des ondes nommées P, QRS et T. L'onde P est celle des oreillettes au moment de leur contraction ; l'onde QRS correspond à la contraction des ventricules et l'onde T reflète la repolarisation (retour à la phase de repos) des ventricules (Figure 2).



**Figure 2: Représentation schématique d'un tracé d'électrocardiogramme**

Une onde U, intervenant après l'onde T ou fusionné avec celle-ci est également présente, mais sa signification n'est pas bien connue; elle pourrait correspondre à l'onde T de repolarisation des cellules de Purkinje (repolarisation plus longue que celle des cellules ventriculaires), à la repolarisation tardive des cellules du myocarde-moyen ou dans certains cas à des post-dépolarisations tardives (Ritsemavaneck et al., 2005). Lorsque la formation ou la conduction de l'excitation électrique sont perturbées, on parle alors d'arythmie.

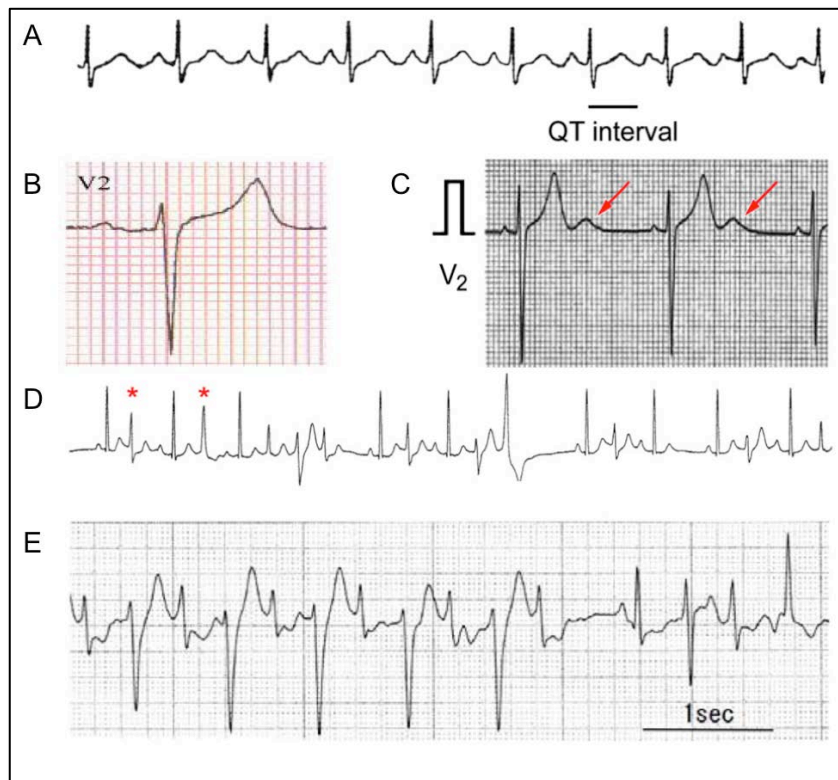
La première observation d'un problème cardiaque chez les patients Andersen a été une élongation de l'intervalle QT (Figure 3), retrouvée sur l'ECG des patients (Figure 4A). Du fait de cette élongation, le syndrome d'Andersen a d'abord été classé comme étant un syndrome du long QT (LQT7). Cependant, chez la majorité des patients, l'intervalle QT est en fait faiblement prolongé. De plus, tous les patients ne présentent pas un intervalle QT supérieur à la normale (Zhang, 2005).



**Figure 3 : Représentation schématique de l'élongation de l'intervalle QT.**

Une analyse approfondie des ECG des patients Andersen a montré que ces derniers présentaient plutôt une onde U proéminente, par rapport à des individus sains (figure 4B, 4C). Cette onde U proéminente est visible dans le nœud précordial antérieur de l'ECG. Même si de telles ondes U sont observables chez des individus sains à des fréquences cardiaques faibles, leur présence à des hautes fréquences cardiaques est considérée comme un symptôme associé à la maladie (Tristani-Firouzi et al., 2002). Dans une étude de 96 patients atteints du syndrome d'Andersen et issus de 33 familles différentes, 41% des patients ont montré des arythmies cardiaques sur leur ECG (Zhang, 2005). Cependant, un problème de l'onde T-U a été observé dans 91% des cas, que ce soit un prolongement terminal de l'onde T, une jonction T-U large, des ondes U biphasiques ou des ondes U élargies. Ces patterns montrent que le problème cardiaque majoritaire chez les patients atteints du syndrome d'Andersen touche la phase finale de repolarisation du potentiel d'action cardiaque, à travers une modification de l'onde U (Nguyen et al., 2013). La première classification du syndrome d'Andersen en syndrome du QT long était en fait due à l'inclusion de l'onde U dans la mesure de l'intervalle QT (Yoon et al., 2006).

D'autres anomalies cardiaques peuvent être retrouvées chez les patients, avec une sévérité variable. Des extrasystoles ou des contractions ventriculaires prématurées (PVC) peuvent avoir lieu occasionnellement, ou en alternance avec des battements cardiaques normaux (Figure 4C ;(Zhang, 2005). Des tachycardies ventriculaires polymorphiques (PVT) peuvent également être observées chez les patients (Figure 4D), ainsi que des torsades de pointe dans de rares cas.



**Figure 4 : Manifestations cardiaques observées chez les patients atteints par le syndrome d'Andersen**

A : ECG démontrant la prolongation de l'intervalle QT, chez un patient Andersen

B : ECG normal observé chez un individu sain

C : Onde U proéminente observée pendant le deuxième nœud précordial (flèche) chez les patients

D : Alternation entre battement cardiaque normal et contraction ventriculaire prématurée (astérisques)

E : Tachycardie ventriculaire bidirectionnelle. Notez l'alternance du complexe QRS tous les battements cardiaques

(Adaptée de Nguyen, 2013)

Chez les patients Andersen, les ectopies ventriculaires et les tachycardies sont généralement bidirectionnelles, signifiant que l'axe de l'onde QRS s'inverse après chaque complexe QRS, et non soutenues, ce qui signifie que cette tachycardie dure moins de 30 secondes (Tristani-Firouzi and Etheridge, 2010). De plus, il y a une différence entre la sévérité des manifestations observées sur l'ECG et les symptômes clinique des patients. En effet, les anomalies retrouvées sur l'ECG des patients peuvent être complètement asymptomatiques, accompagnées par des palpitations et des épisodes de syncopes, voire associées à des arrêts cardiaques (Donaldson et al., 2004). Cependant, contrairement aux autres types de syndrome du QT long, la fréquence des crises cardiaques est relativement faible, due à une faible fréquence de torsades de pointe (Donaldson et al., 2004; Sacher et al., 2006; Zhang, 2005).

Les symptômes cardiaques associés au syndrome d'Andersen sont relativement modérés, ce qui explique que le diagnostic des patients se fait tardivement. Par ailleurs, les ectopies ventriculaires bidirectionnelles sont des formes d'ectopies extrêmement rares décrites dans uniquement trois maladies : le syndrome d'Andersen, les intoxications digitaliques (à la digoxine) et la tachycardie ventriculaire polymorphique catécholaminergique (Yoon et al., 2006), ce qui rend le syndrome d'Andersen difficile à diagnostiquer uniquement sur le phénotype cardiaque.

## **B. Manifestations musculaires : paralysies périodiques**

Les paralysies périodiques sont des maladies rares, qui affectent principalement le muscle squelettique. Ces maladies sont des canalopathies, ce qui signifie qu'elles sont dues à des mutations dans des gènes codant pour des canaux ioniques. Ces canaux sont responsables de l'activité électrique des cellules excitables, et permettent la contraction musculaire. Les paralysies périodiques sont caractérisées par des faiblesses musculaires et peuvent être associées ou non à des variations de la concentration sérique en ions potassiums ( $K^+$ ): les paralysies périodiques hyperkaliémiques, hypokaliémiques et normokaliémiques (Bendahhou, 2009).

La paralysie périodique hyperkaliémique (hyperKPP) est un trouble musculaire caractérisé par des épisodes de faiblesse musculaire associés à une augmentation du taux de potassium sérique. La prévalence est estimée à 1/200 000. La transmission est autosomique dominante avec une pénétrance presque complète. Les attaques de faiblesse musculaire débutent généralement pendant l'enfance (avant 10 ans). Elles touchent généralement les muscles des bras et des jambes et épargnent les muscles faciaux et respiratoires. Les paralysies périodiques hyperKPP peuvent être associées à des myotonies (contractions involontaires des muscles).

La paralysie périodique hypokaliémique (hypoPP) est caractérisée par des accès de paralysie musculaire de durée variable (de quelques heures à 24-48 heures) s'accompagnant d'une chute du taux de potassium sanguin. La prévalence de la maladie est de l'ordre de 1/100 000. La paralysie touche le plus souvent les quatre membres aboutissant alors une tétraplégie. La maladie débute en général au cours de la seconde décennie. Le mode de transmission de l'hypoKPP est autosomique dominant; sa pénétrance est incomplète, particulièrement chez la femme. Des cas sporadiques ainsi que des néo-mutations ont été rapportées.

Ces différentes formes de paralysies périodiques sont retrouvées chez les patients Andersen. Les paralysies périodiques associées à cette pathologie correspondent à des faiblesses musculaires épisodiques de durée variable (quelques heures à quelques jours) survenant à des intervalles de 1-2 semaines à 1-2 mois. Deux tiers des patients Andersen présentent des paralysies périodiques hypoKPP (Bendahhou, 2009).

Plusieurs facteurs déclencheurs ont été identifiés tels que des exercices physiques, un repos prolongé après exercices et le stress (Nguyen et al., 2013). De plus, il a été rapporté qu'une exposition au froid ou à la chaleur pouvaient également déclencher les épisodes paralytiques (Haruna et al., 2007; Yoon et al., 2006).

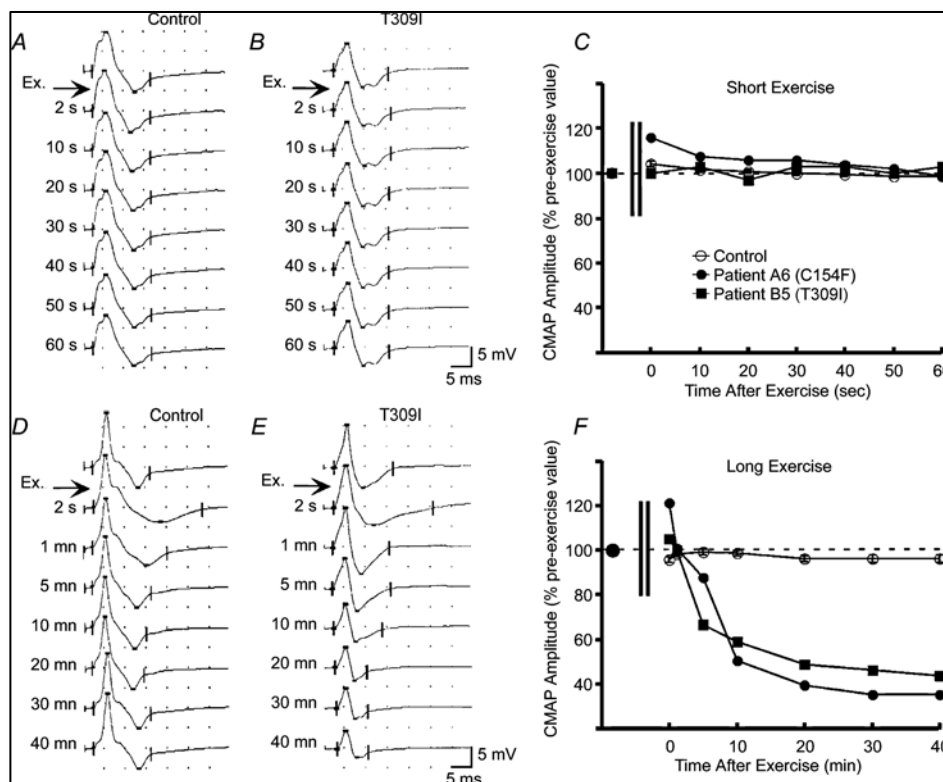
L'étude de plusieurs patients Andersen ainsi que de leur famille a révélé que les épisodes paralytiques apparaissaient généralement pendant la première ou seconde décennie de la vie (Canún et al., 1999; Tawil et al., 1994; Yoon et al., 2006). Les faiblesses musculaires affectent les membres supérieurs et inférieurs. De plus, chez de nombreux patients, des faiblesses au niveau de l'épaule ou de la ceinture pelvienne ont été observées (Sansone et al., 1997). Les reflexes sont généralement normaux mais dans certains cas une augmentation ou une diminution voire absence de reflexes ont été observées (Sansone et al., 1997). En revanche, les paralysies périodiques retrouvées chez les patients atteints du syndrome d'Andersen ne sont jamais associées à des myotonies (Meola et al., 2009; Tawil et al., 1994).

Des atrophies ainsi que des pertes de masse musculaire ont été rapportées dans un faible nombre de patients et les muscles affectés sont différents entre les patients (Sansone et al., 1997). D'autres études ont mentionné pour certains patients une perte de masse musculaire au niveau des muscles supérieurs des pectoraux ainsi que du muscle sternocléidomastoïdien (Child et al., 2013).

Le développement musculaire est donc normal chez la majorité des patients atteints par le syndrome d'Andersen. Cependant, l'étude de biopsie musculaire a révélé que des agrégats tubulaires étaient présents chez de nombreux patients. Ces agrégats peuvent être retrouvés dans des sections de muscles squelettiques, et provoquent une perturbation de l'homéostasie calcique. Ces agrégats sont des caractéristiques non spécifiques de très nombreuses pathologies musculaires telles que les paralysies périodiques (Schubert et al., 2007). Aucune corrélation entre ces agrégats et les faiblesses musculaires retrouvées chez les patients Andersen n'a pu être faite car un

patient avec des faiblesses musculaires considérables présentait une biopsie musculaire tout à fait normale (Sansone et al., 1997).

Des évaluations électromyographiques (EMG) ont révélé que les patients Andersen présentaient les mêmes troubles de contractilité musculaire que des patients avec des mutations dans les canaux calciques. En effet, lors de tests à l'effort, l'enregistrement des potentiels d'action musculaires montre qu'après un exercice court, l'amplitude des potentiels d'action ne change pas entre les individus sains et les patients Andersen (Figure 5A, B et C). Cependant, après un exercice long, une diminution de l'amplitude des potentiels d'action est observée chez les patients Andersen ; alors que celle-ci est absente chez des individus sains (Figure 5D, E et F ; Bendahhou et al., 2005).



**Figure 5 : Evaluations électromyographiques des patients Andersen**

Les potentiels d'action (PA) des muscles abducteurs du petit orteil (*abductor digiti minimi ADM*) ont été enregistrés après stimulation du nerf ulnaire, avant et après exercices physiques. Les enregistrements pré (trace du haut) et post-exercices (traces en dessous) effectués après la stimulation (Ex) sont montrés à différents temps

A-B : Test de l'ADM gauche chez un individu sain (A) et un patient Andersen (B) après un exercice court

D-E : test de l'ADM droit chez un individu sain (D) et un patient Andersen (E) après un exercice long.

Echelle entre deux points : 5ms, 5mV

C-F : Changement dans l'amplitude des PA du muscle ADM, après exercices courts (C) ou longs (D). (Adapté de Bendahhou, 2005)

Ce profil électromyographique est caractéristique des patients atteints de paralysie périodique, et qui présentent des mutations dans les gènes *CACNA1S* et *SCN4A*, codant pour le récepteur à la dihydropyridine et le canal sodique voltage dépendant Nav1.4, spécifiques du muscle squelettique (Bendahhou et al., 2005; Fournier et al., 2004).

Les paralysies périodiques ainsi que les arythmies cardiaques sont dues à des mutations dans des canaux ioniques, ce qui altère les propriétés électriques des cellules excitables. Cependant, les mutations responsables des paralysies périodiques sont retrouvées dans des canaux spécifiques du muscle ou du cœur. En effet, il existe des isoformes différents des canaux ioniques du muscle et du cœur. Cependant, les mutations dans ces canaux n'expliquaient pas les problèmes développementaux retrouvés chez les patients Andersen.

### **C. Anomalies du développement osseux**

Un autre symptôme associé avec le syndrome d'Andersen est les dysmorphies que l'on retrouve chez les patients (Haruna et al., 2007; Yoon et al., 2006). Ces dysmorphies sont dues à des déformations squelettiques qui peuvent être observées dès l'enfance.

La première description clinique du syndrome d'Andersen mentionnait que le patient était plus petit que la moyenne, plus maigre, avait un crâne allongé (scaphocéphalie ou dolichocéphalie), avec des yeux écartés (hypertélorisme) et un nez large, une hypoplasie mandibulaire, une ptose bilatérale, et des cheveux fins (Andersen et al., 1971).

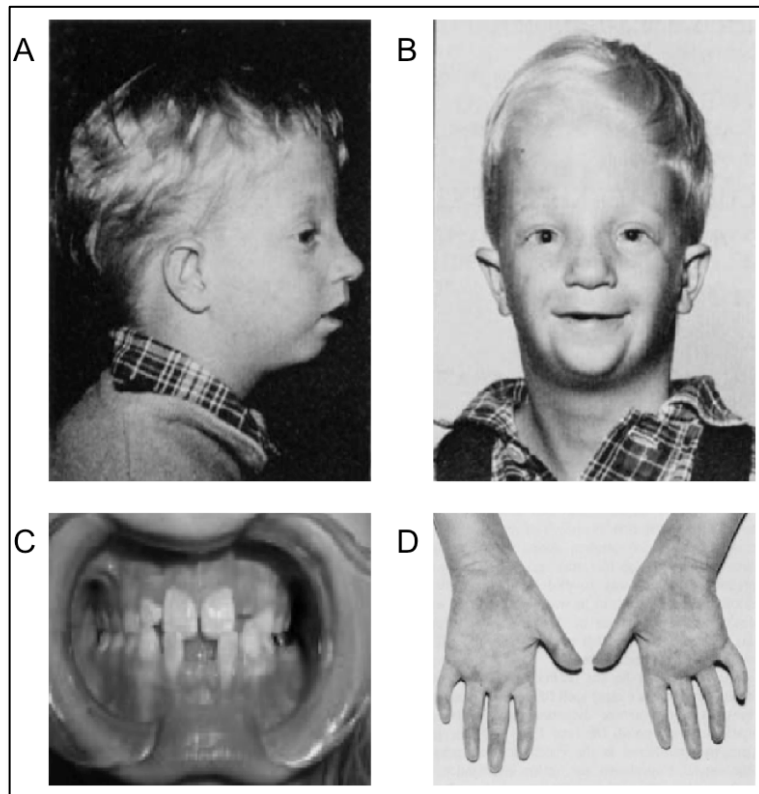
En 2006, les anomalies développementales, associées au syndrome d'Andersen furent élargies afin d'y inclure les dysmorphies craniofaciales (Yoon et al., 2006). Celles-ci se traduisent par une petite tête (microcéphalie) avec des yeux écartés (hypertélorisme), un crâne allongé (dolichocéphalie), un front large avec une minéralisation incomplète des os pariétaux, des défauts du palais (palais ogival, fente palatine), une implantation des oreilles basse, un long nez, une chute de la paupière supérieure (ptose), des cheveux fins et un petit menton (micrognathie). Un retard du développement des dents de lait ou une absence de certaines dents (hypoplasie) et une mâchoire rejetée en arrière (rétrognathisme) peuvent être observés chez les patients (Plaster et al., 2001).



Ces derniers sont en général de petite taille due à un retard de croissance du squelette, et peuvent présenter une scoliose et des côtes graciles (de forme élancée et fines) (Yoon et al., 2006). Les membres sont de petite taille (phocomélie) et les doigts ou orteils peuvent être accolés (syndactylie), déviés latéralement (clinodactylie), absents (aplasie), ou encore raccourcis (brachydactylie) (Yoon et al., 2006). Les syndactylies sont généralement observées entre les orteils 2 et 3, et les clinodactylies sont présentes sur les cinq doigts (Nguyen et al., 2013).

La dolichocéphalie, due à une inhibition de la croissance latérale du crâne en raison d'une fusion prématurée de la suture sagittale, a été rapportée dans le premier patient décrit. Cependant, les études suivantes n'ont jamais mentionnée de telle anomalie chez les patients, sauf pour des cas isolés. La majorité des patients présentent un front large, phénotype retrouvé chez les patients dolichocéphaux (Haruna et al., 2007; Yoon et al., 2006). D'autres symptômes ont été décrits dans des patients isolés, comme les cheveux fins (Andersen et al., 1971), un décollement de l'omoplate (Yoon et al., 2006), et des index courts (Canún et al., 1999; Sansone et al., 1997).

D'après toutes les études menées sur les cohortes de patients, il apparaît que 71% des patients Andersen ont des clinodactylies, un front large, une microcéphalie et une micrognathie, une hypoplasie mandibulaire, un hypertélorisme, une implantation basse des oreilles, des clinodactylies et des syndactylies (Figure 6; Sansone and Tawil, 2007).



**Figure 6 : Anomalies développementales chez les patients Andersen**

A-B : Patient Andersen ayant une implantation basse des oreilles, un hypertélorisme, une micrognathie, une hypoplasie mandibulaire et un crâne large.

C : Anomalies dentaires retrouvées chez les patients

D : Clinodactylie des cinq doigts retrouvée chez les patients. (Adapté d'Andersen, 1971)

Tout comme pour les arythmies cardiaques et les paralysies périodiques, la présence de dysmorphies chez les patients Andersen est hétérogène, allant de multiples anomalies à l'absence totale de phénotype développemental. Cette variabilité peut se manifester entre des patients issus de familles différentes ou au sein de la même famille, ce qui rend le diagnostic de la pathologie encore plus complexe. Dans tous les cas, l'identification des anomalies de développement, en association avec les phénotypes cardiaques ou musculaires rend le diagnostic clinique plus facile.

#### **D. Phénotypes additionnels**

Nous ne disposons à nos jours que de peu d'informations sur les complications psychologiques et cognitives chez les patients Andersen. Quelques études montrent, cependant, que les patients atteints par le syndrome d'Andersen ont des atteintes

neurologiques. La première d'entre elle a été conduite au Royaume-Uni, par Davies et ses collaborateurs. Ils décrivent trois patients qui ont des difficultés d'apprentissage (Davies et al., 2005). Dans une autre étude, quatre patients ont mentionné avoir des problèmes de mémoire ou de concentration. De plus, deux d'entre eux se sont plaints de sauts d'humeur (Tan et al., 2012). Enfin, dans une étude des troubles neurocognitifs, il a été rapporté que les patients Andersen avaient des difficultés pour compléter des tâches nécessitant une organisation, des problèmes complexes ou abstraits, des difficultés d'attention et de concentration, ainsi que des problèmes de gestion du temps (Yoon et al., 2006). Malgré un QI normal, les patients ont de grandes difficultés à l'école, comparé à des individus sains, notamment en mathématiques et en science (Yoon et al., 2006). L'ataxie est un autre problème neurologique rencontré chez quelques patients. En effet, des cas de mouvements involontaires ont été décrits (Davies et al., 2005). Quelques patients souffrent de convulsions, et de dysfonction de la thyroïde (Haruna et al., 2007).

A l'heure actuelle, deux études ont identifié des problèmes rénaux chez les patients Andersen, tels qu'une hypoplasie rénale unilatérale chez un patient (Andelfinger et al., 2002) et des défauts tubulaires chez un autre (Davies et al., 2005). D'autre part, des malformations cardiaques ou cardiovasculaires ont également été associées au syndrome d'Andersen (Davies et al., 2005). Enfin, des anomalies de la phonation (voix aiguë) ont été décrites chez des patients, sans qu'aucune anomalie du palais n'y soit associée (Davies et al., 2005). Tous ces phénotypes restent cependant rares et ont été observés dans un faible nombre de patients. D'autres études incluant un plus grand nombre de patients doivent être menées avant d'inclure ces phénotypes aux symptômes du syndrome d'Andersen.

## **E. Traitements actuels**

Le traitement du syndrome d'Andersen est axé sur la réduction du nombre d'arythmies, et la prévention des épisodes de paralysie.

### **1. Traitements des arythmies cardiaques**

Les arythmies cardiaques sont traitées avec des bloquant  $\beta$  adrénergiques ( $\beta$  bloquant), comme le propranolol. Cependant, le traitement par des  $\beta$  bloquants est dans de nombreux cas inefficace (Junker et al., 2002). C'est pourquoi, de la flécaïnide est souvent administrée, en association avec les  $\beta$  bloquants (Fox et al., 2008; Pellizzón et

al., 2007) . La flécaïnide est un inhibiteur non sélectif du canal sodique cardiaque Nav1.5. Celui ci est responsable de l'entrée de sodium pendant le potentiel d'action cardiaque. Ainsi, la flécaïnide réduit la fréquence des arythmies chez les patients Andersen lors de traitement courts, mais permet également de traiter les tachycardies ventriculaires polymorphiques, lors de traitement long (Fox et al., 2008; Pellizzón et al., 2007).

D'autres inhibiteurs des canaux ioniques peuvent être utilisés pour traiter les arythmies. En effet, le traitement avec l'inhibiteur des canaux calciques vérapamil permet de supprimer les tachycardies ventriculaires bidirectionnelles et diminue la fréquence des contractions ventriculaires prématurées (Kannankeril et al., 2004; Sumitomo et al., 2008).

## 2. Traitements des faiblesses musculaires et paralysies périodiques

Les inhibiteurs de l'anhydrase carbonique (CAI), tels que les sulphonamides, l'acétazolamide (AZA) et le dichlorphenamide (DCPA) sont utilisés de manière efficace pour traiter toutes les formes de paralysies périodiques, retrouvées chez les patients Andersen ou d'autres pathologies (Rajakulendran et al., 2010; Sansone and Tawil, 2007). Il semblerait que les traitements avec les CAIs traitent les paralysies périodiques par un autre moyen que l'inhibition des anhydrases carboniques. En effet, les CAIs sont capables d'activer les canaux potassiques activés par le calcium (canaux BK) retrouvés dans le muscle squelettique (Airey et al., 2009). Malheureusement, les CAIs ne peuvent pas être administrés à des patients souffrant d'allergies, et avec des risques de développer des problèmes rénaux.

Le phénotype clinique du syndrome d'Andersen est complexe. D'une part, les patients peuvent présenter différents phénotypes associés à la pathologie. D'autre part, tous les patients ne présentent pas les mêmes symptômes cliniques. En effet, le syndrome d'Andersen est caractérisé par un haut degré de variabilité phénotypique et un fort degré clinique de non-pénétrance. Ceci rend le diagnostique clinique difficile dans certains cas, notamment lorsque les patients ne présentent qu'un seul des trois symptômes associés à la pathologie. En se basant sur ces données, un diagnostique de syndrome d'Andersen est fait si un individu possède 1) deux des trois symptômes typiques du syndrome d'Andersen : paralysie périodique, symptômes cardiaques typiques ou dysmorphies caractéristique de la pathologie ou 2) un des trois symptômes

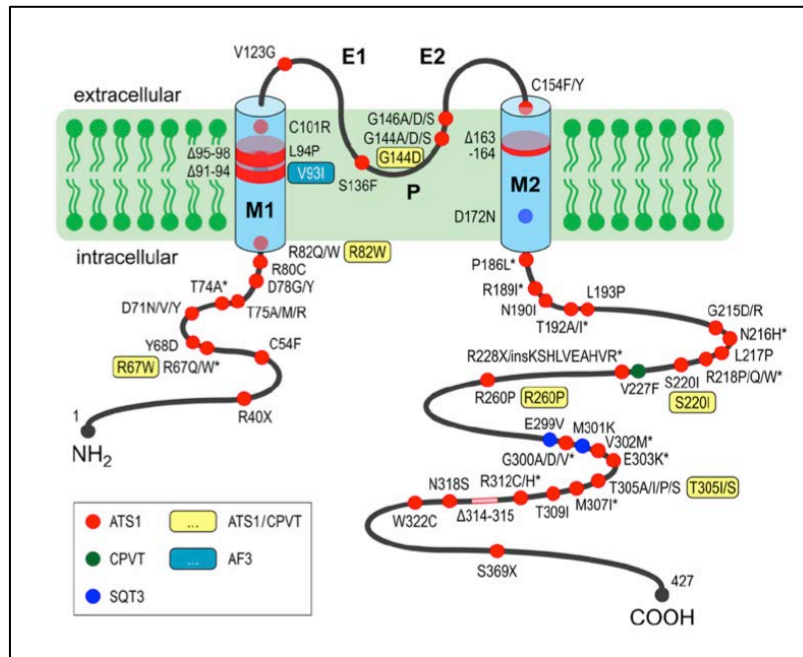
et une histoire familiale avec les autres symptômes (Donaldson et al., 2003; Tristani-Firouzi et al., 2002). La nécessité de traiter deux types d'affections (paralysies périodiques et arythmie) rend le syndrome d'Andersen difficile à soigner car les différentes médications ne doivent pas interférer les unes avec les autres.

#### **F. Gènes et mutations associés au syndrome d'Andersen**

La coexistence de symptômes musculaires, cardiaques et développementaux chez les patients Andersen, a d'abord fait penser que cette maladie était multigénique et affectait la fonction de plusieurs protéines (Sansone et al., 1997). En effet, chaque tissu possède un isoforme particulier d'un canal ionique, ce qui favorisait l'hypothèse d'une maladie multigénique. De plus, des mutations du canal sodique Nav1.4 et du gène *HSPG2*, codant pour la perlecan qui est le principal composant de la matrice cellulaire, ont été identifiés dans le syndrome de Schwartz-Jampel, une pathologie similaire au syndrome d'Andersen car elle combine des anomalies musculaires, et des anomalies de développement (Rüdel et al., 1989).

En 2001, le gène *KCNJ2*, codant pour le canal potassique à rectification entrante Kir2.1, a été identifié comme étant associé au syndrome d'Andersen (Plaster et al., 2001). Le gène *KCNJ2* est localisé sur le bras long du chromosome 17. Ce gène contient 2 exons, mais c'est uniquement l'exon 2 qui contient la séquence codante pour le canal Kir2.1.

Des mutations dans ce gène ont été retrouvées dans 70% des patients. Ces patients ont été classés en syndrome d'Andersen de type I (Yoon et al., 2006). Aujourd'hui, plus de cinquante mutations ont été identifiées sur ce canal (Figure 7) et toutes ces mutations conduisent à une perte de fonction, avec un effet dominant négatif (Bendahhou et al., 2007; Plaster et al., 2001).



**Figure 7 : Représentation des mutations sur le canal Kir2.1 associé avec le syndrome d'Andersen.**

Les astérisques représentent les mutations dans les résidus important pour la liaison avec le PIP<sub>2</sub>

Les mutations associées avec le syndrome d'Andersen (rouge), la mutation associée avec la tachycardie polymorphique ventriculaire catécholaminergique (CPVT, en vert), et en les mutations associées avec le syndrome du QT court (bleu), conduisant à un gain de fonction du canal Kir2.1. (Adapté de Nguyen, 2013).

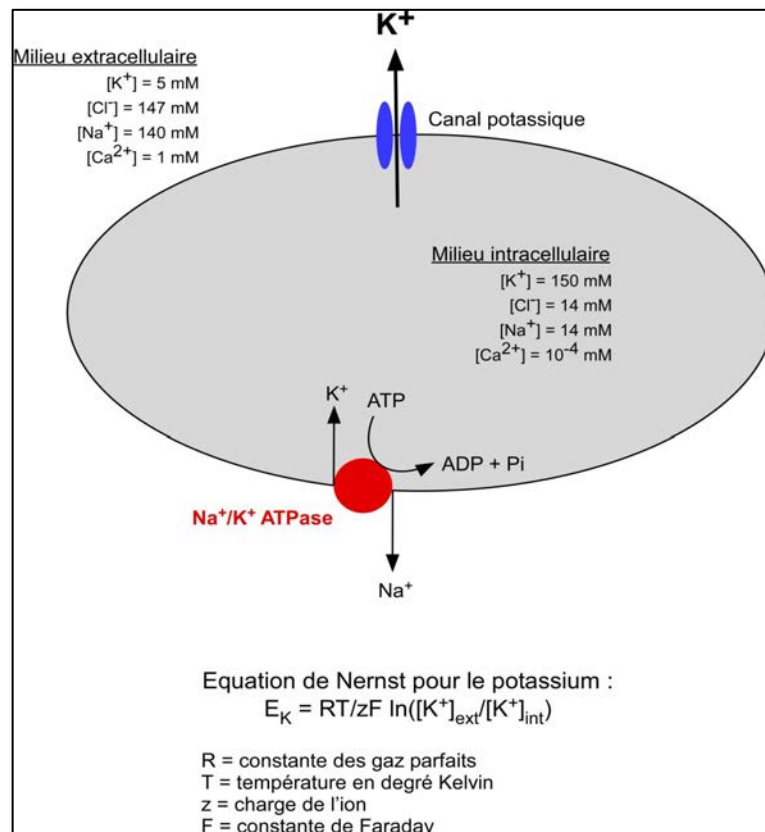
Cependant, dans 30% des patients, aucune mutation sur le canal Kir2.1 n'a pu être identifiée, suggérant que d'autres protéines peuvent être impliquées dans la physiopathologie de cette maladie. Ces patients ont été classés en syndrome d'Andersen de type II (Yoon et al., 2006).

Récemment, une mutation sur le gène *KCNJ5*, codant pour le canal potassique à rectification entrante activé par des protéines G Kir3.4, a été associée au syndrome d'Andersen. Cependant, cette mutation a un effet inhibiteur sur le canal potassique Kir2.1 (Kokunai et al., 2014). Le canal potassique Kir2.1 est donc la protéine centrale, dont le dysfonctionnement est responsable du syndrome d'Andersen.

## II. Les canaux potassiques à rectification entrante Kir2.x.

Lors de l'ouverture de canaux sélectifs pour les ions potassium, la différence de concentration de cet ion chargé positivement crée un gradient électrochimique

favorable à leur sortie. Ceci crée ainsi un déficit de charges positives à l'intérieur de la cellule appelée hyperpolarisation. Progressivement l'accumulation de charges négatives à l'intérieur de la cellule s'oppose à la sortie du potassium. La sortie massive d'ions potassium continue jusqu'à ce que le gradient chimique favorable soit compensé par le gradient électrostatique défavorable. La différence de potentiel générée par cet équilibre peut être calculée par l'équation de Nernst (Figure 8).



**Figure 8 : Transport de l'ion potassium et établissement du potentiel de repos**

La pompe Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase transporte les ions K<sup>+</sup> à l'intérieur de la cellule grâce à l'hydrolyse de l'ATP, et est ainsi responsable de sa forte concentration intracellulaire. L'ion K<sup>+</sup> sort de la cellule par l'intermédiaire des canaux ioniques selon son gradient électrochimique.

Il existe une multitude de courants potassiques présentant des cinétiques, une pharmacologie et pour certains des seuils d'activation très variés. Il est cependant possible de distinguer deux grandes classes de courants potassiques à partir de leur sensibilité au potentiel de membrane : les courants sensibles aux variations du potentiel et les courants ne dépendant pas du potentiel de membrane.

Contrairement aux courants dépendant du potentiel, les courants ne dépendant pas du potentiel de membrane ne présentent pas de cinétique d'activation et sont responsables du potentiel de repos. On distingue deux types de courants potassiques indépendants du potentiel :

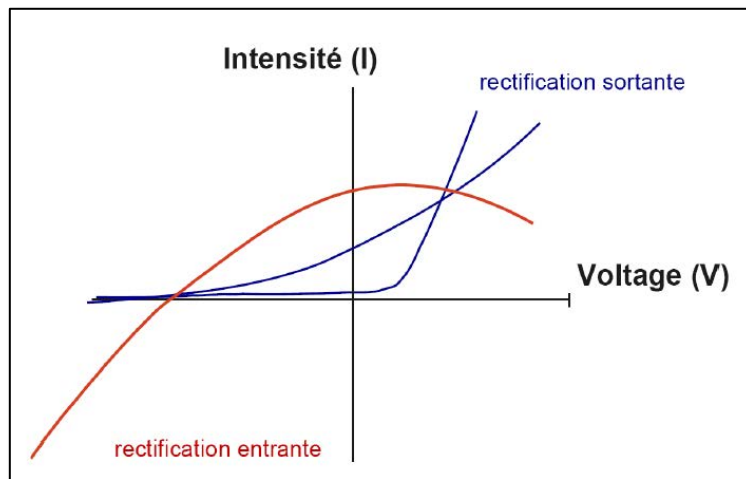
- Les courants potassiques à rectification entrante, laissant plus facilement passer les ions potassium dans le sens entrant dans la cellule en conditions physiologiques.
- Les courants de fond qui sont ouverts à tous les potentiels de membrane.

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé aux courants potassiques à rectification entrante. C'est pourquoi, je ne vais aborder ni les canaux potassiques sensibles au voltage, ni les canaux de fond.

#### **A. Généralité sur les canaux Kir.**

Les courants potassiques à rectification entrante (Kir) furent premièrement identifiés dans le muscle squelettique (Katz, 1949). Au lieu d'une rectification sortante prédite par l'équation de Nernst, ces courants ont montré une forte entrée de potassium à l'intérieur de la cellule plutôt qu'à l'extérieur de celle-ci. Les courants Kir ont ainsi été décrits comme des courants potassiques anormaux. En effet, leur relation avec le potentiel de membrane suit le gradient électrochimique du potassium (Hagiwara et al., 1976a). Ainsi, en conditions physiologiques, les canaux Kir génèrent une large conductance potassique à des potentiels inférieurs au potentiel d'équilibre du potassium ( $E_K = -80$  mV), mais cette conductance est réduite à des potentiels supérieurs à  $E_K$  (Figure 9 ; Hagiwara et al., 1976; Miyazaki et al., 1974; Noble, 1965; Sakmann and Trube, 1984).





**Figure 9 : Courbes représentant l'intensité en fonction du voltage (I/V) des courants à rectification sortante et entrante.**

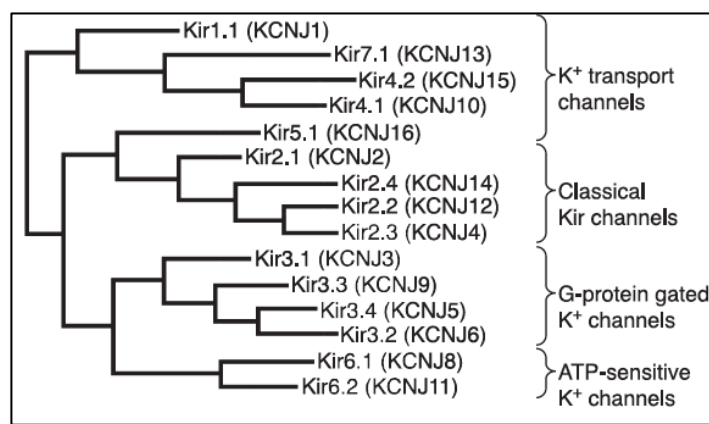
Les courbes en bleu représentent un courant à rectification sortante : plus la membrane plasmique est dépolarisée plus l'intensité de l'efflux de potassium est importante. La courbe rouge représente un courant à rectification entrante : plus la membrane plasmique est dépolarisée, plus l'efflux de potassium diminue.

Les cellules exprimant une forte conductance  $K_{ir}$  ont un potentiel de repos ( $E_{res}$ ) proche de  $E_k$  et ne présentent aucune activité électrique. Ceci, ainsi que leur indépendance au voltage permet aux canaux  $K_{ir}$  de jouer un rôle clé dans le maintien du potentiel de repos ( $E_{res}$ ) et la régulation de la durée du potentiel d'action dans les cellules excitables (Hagiwara et al., 1976a; Miyazaki et al., 1974; Sakmann and Trube, 1984). L'augmentation du courant après une hyperpolarisation est ainsi affiliée à l'activation. De la même manière, la diminution du courant à des potentiels positifs (dépolarisation) a généralement été décrite comme la désactivation ou rectification (Nichols and Lopatin, 1997). La rectification signifie que la conductance du canal change en fonction du voltage membranaire. Ces caractéristiques des courants  $K_{ir}$  résultent d'un blocage de l'ouverture du pore du canal par des cations ( $Mg^{2+}$ ) intracellulaires ainsi que d'autres molécules (polyamines).

Les canaux  $K_{ir}$  sont exprimés dans de très nombreuses cellules : myocytes cardiaques (Beeler and Reuter, 1970), neurones (Brown et al., 1990), cellules sanguines (Lewis et al., 1991), ostéoclastes (Sims and Dixon, 1989), ostéoblastes (Sacco et al., 2015), cellules endothéliales (Silver and DeCoursey, 1990), cellules gliales (Kuffler and Nicholls, 1966), et oocytes (Hagiwara et al., 1978). A l'heure actuelle, 15 gènes codant

pour des sous-unités des canaux Kir ont été identifié et classé en 7 sous-familles qui peuvent elles-mêmes être classées en 4 groupes fonctionnels (Figure 10) :

- Les canaux Kir classiques Kir2.x qui sont constitutivement actifs,
- Les canaux Kir activés par des protéines G Kir3.x/K<sub>G</sub> qui sont régulés par des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR),
- Les canaux potassiques sensibles à l'ATP Kir6.x/K<sub>ATP</sub> qui sont étroitement lié au métabolisme cellulaire,
- Les canaux transporteurs de potassium Kir1.x, Kir4.x, Kir5.x, Kir7.x.



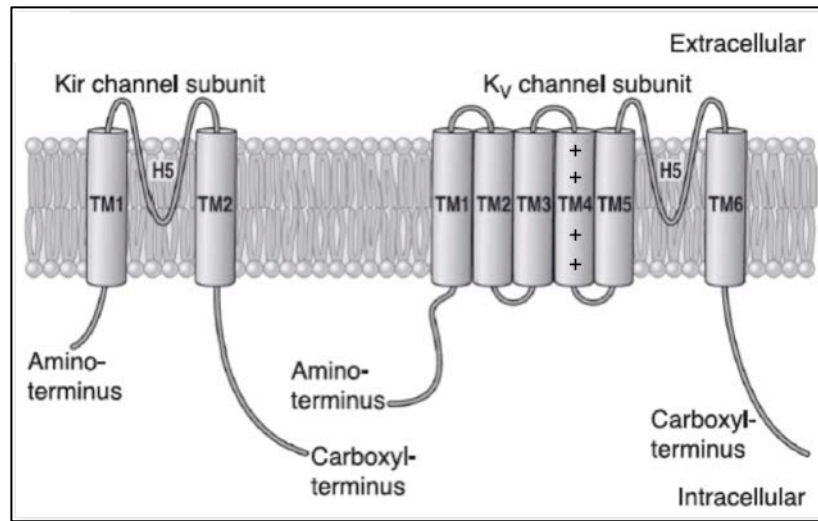
**Figure 10 : Phylogénie des canaux Kir**

Les canaux Kir n'ont donc pas seulement un simple rôle dans le maintien du potentiel de repos des cellules. Ils orchestrent les propriétés électriques de la cellule, mais ils sont aussi impliqués dans la signalisation des récepteurs couplés aux protéines G (GPCR), ainsi que dans le lien entre l'état métabolique des cellules et l'excitabilité membranaire *in vivo*.

### **B. Structure des canaux Kir2.x.**

Les premiers canaux Kir furent clonés en 1993. Le canal ATP-dépendant ROMK1/Kir1.1 (Ho et al., 1993) et le canal Kir2.1 (Kubo et al., 1993) furent isolés respectivement de la médulla rénale de rats et d'une lignée de macrophage murin. Comparée aux autres canaux potassiques, la structure des canaux Kir est relativement simple (Figure 11). Leur structure primaire possède deux segments transmembranaires,

TM1 et TM2, liés par une région extracellulaire formant le pore du canal (H5), ainsi que deux domaines amino (NH<sub>2</sub>) et carboxy (COOH)-terminaux (Figure 11).



**Figure 11 : Structure basique d'une sous-unité d'un canal Kir.**

Chaque sous-unité contient deux domaines transmembranaires (TM1 et TM2), une boucle extracellulaire formant le pore (H5) et un domaine cytosolique NH<sub>2</sub> et COOH terminal. En comparaison, une sous-unité du canal potassique voltage dépendant (K<sub>v</sub>) possède six régions transmembranaires (TM1 à TM6). Adapté de Hibino, 2010.

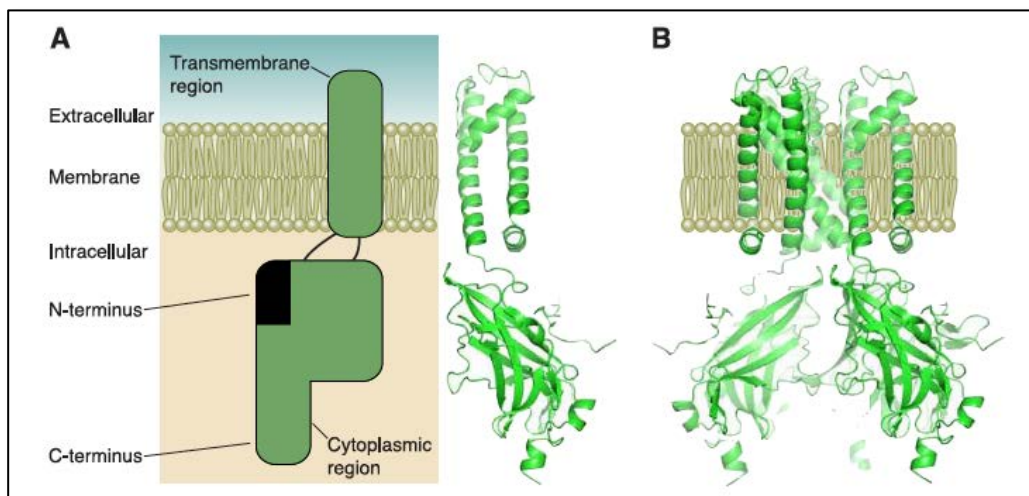
Cette structure primaire est commune à tous les canaux Kir. La région H5 sert de filtre de sélectivité ionique (Heginbotham et al., 1994). Tous les canaux potassiques partagent une même séquence pour le filtre de sélectivité, à savoir la séquence [T-X-G-Y(F)-G] (Bichet et al., 2003).

Il est important de noter que les canaux Kir2.x n'ont pas de segment S4 dans leur structure. Ce segment S4 est appelé le segment « voltage senseur », et est conservé dans les canaux Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, et K<sup>+</sup> sensibles au voltage. En effet, ce segment détecte la dépolarisation et permet l'ouverture du canal. Ainsi, en l'absence de ce segment, les canaux Kir sont insensibles aux variations de potentiel membranaire, activant ces canaux à tous les potentiels de membranes, sauf intervention de mécanismes de régulation particuliers (ATP fermant les canaux K<sub>ATP</sub> ou les protéines G activant les canaux K<sub>G</sub> par exemple).

Pour former un canal fonctionnel, la structure primaire des deux segments transmembranaires est insuffisante et nécessite donc l'assemblage de quatre sous-unités (Figure 12B) (Glowatzki et al., 1995; Yang et al., 1995). La simplicité et la forte homologie de la sous-unité de base des canaux Kir permettent donc un assemblage du

canal en homo ou hétéro tétramère. Cependant, l'hétéromérisation ne se fait en général qu'entre les membres d'une même sous-famille. Ainsi, Kir2.1 peut s'associer avec les autres membres de la sous-famille Kir2.x à savoir Kir2.2, Kir2.3 ou Kir2.4 (Preisig-Müller et al., 2002; Schram et al., 2002).

Depuis, la cristallographie aux rayons X a fourni de plus amples détails sur la structure tridimensionnelle des canaux Kir, au niveau atomique (Inanobe et al., 2007; Kuo et al., 2003; Nishida and MacKinnon, 2002; Pegan et al., 2005). Une vue générale de la structure des canaux Kir est montrée dans la figure 12A et 12B.



**Figure 12 : Architecture moléculaire des canaux Kir.**

A : Représentation schématique de la structure générale des canaux Kir. Les canaux Kir possèdent une région transmembranaire et un domaine cytoplasmique. Les domaines NH<sub>2</sub> et COOH terminaux sont cytosoliques et contribuent ensemble à la formation du domaine cytoplasmique.

B : Assemblage en tétramère des canaux Kir, représenté en cartoon. Seulement deux sous unités ont été représentées pour plus de clarté. L'organisation en tétramère permet la formation du pore du canal.

Adapté de Hibino, 2010

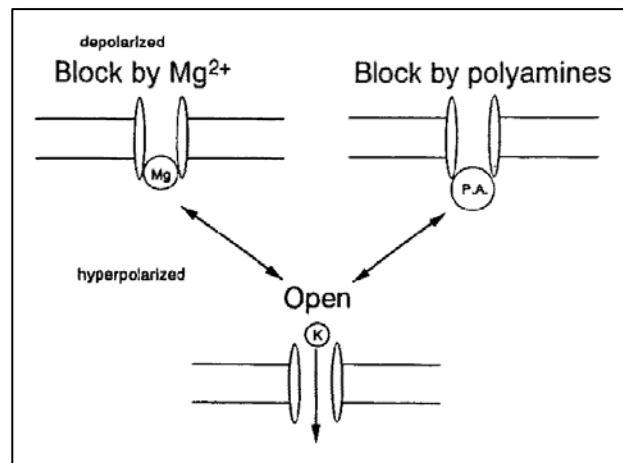
Les domaines NH<sub>2</sub> et COOH terminaux des sous-unités des canaux Kir sont associés ensemble pour former le domaine cytoplasmique, lui-même lié avec le domaine transmembranaire (Figure 12A). Celui-ci est majoritairement responsable de la sélectivité aux ions et de l'ouverture des canaux Kir. Le domaine cytoplasmique joue un rôle de régulation de l'ouverture du pore.

### C. Rectification et activation des canaux Kir2.x.

Les canaux Kir ont un rôle dans le maintien du potentiel de repos des cellules. Leur ouverture étant insensible au voltage membranaire, plusieurs molécules interviennent afin de réguler la fonction de ces canaux.

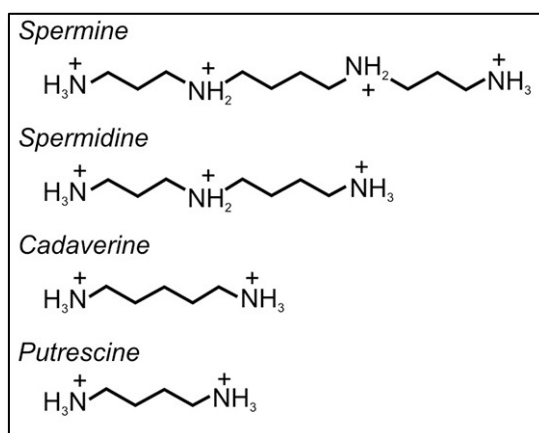
#### 1. Les polyamines et le Magnésium ( $Mg^{2+}$ ) intracellulaire

La rectification entrante observée dans le courant des canaux Kir est le résultat d'un blocage du canal par le Magnésium ( $Mg^{2+}$ ) et les polyamines lorsque le potentiel de membrane est plus dépolarisé que le potentiel d'équilibre du potassium. Cette interaction bloque physiquement le passage des ions  $K^+$  (Figure 13). Les résidus responsables de ce blocage sont retrouvés dans le domaine transmembranaire et cytoplasmique des canaux Kir2.x.



**Figure 13 : Représentation schématique du mécanisme de la rectification des canaux Kir.**

Les polyamines (spermine, spermidine, putrescine et cadaverine) (Figure 14) sont des métabolites polyvalents, de longueur variable et flexibles. Elles possèdent deux groupements amines ou plus et sont présentes dans quasiment toutes les cellules. Elles ont un rôle important dans la synthèse protéique, la division et la prolifération cellulaire. La synthèse, l'incorporation et la dégradation des polyamines sont des processus très contrôlés (Pegg, 1986; Tabor and Tabor, 1984).



**Figure 14 : Structure des polyamines endogènes**

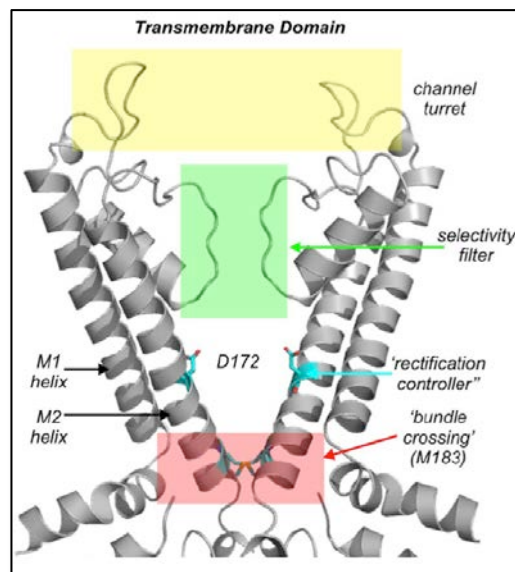
Les polyamines ont une origine endogène, mais elles peuvent également être apportées par l'alimentation.

Les premières études sur les canaux Kir ont permis de mettre en évidence que la rectification entrante était une propriété extrinsèque (Lopatin et al., 1994). En effet, la force de la rectification peut être réduite ou complètement abolie lorsque ces canaux sont retirés de leur environnement cellulaire. Cette rectification peut être restaurée par l'ajout de polyamines à des concentrations de l'ordre du submicromolaire, du côté intracellulaire (Fakler et al., 1995; Ficker et al., 1994; Lopatin et al., 1994; Yamada and Kurachi, 1995). Ainsi, il est aujourd'hui admis que le mécanisme de gating des canaux Kir est dû au blocage et déblocage lent du pore des canaux par les polyamines. En effet, celles-ci peuvent entrer dans le pore du canal et réduire le flux ionique (Baronas and Kurata, 2014).

Les polyamines provoquent une rectification réversible et dépendante du voltage des canaux Kir. L'affinité du canal ainsi que la rectification change en fonction de la charge de la polyamine. Ainsi, la spermine (une tétramine) est plus puissante que la spermidine (une triamine), et considérablement plus puissante que la putrescine (une diamine). De nombreux résidus impliqués dans ce blocage ont été identifiés dans le domaine transmembranaire et cytoplasmique des canaux Kir2.x (Fujiwara and Kubo, 2006; Guo and Lu, 2003).

Des études de structure-fonction ont démontré qu'un seul résidu dans le domaine transmembranaire était crucial pour la grande affinité et le blocage voltage dépendant des canaux Kir par la spermine et les autres polyamines. Pour le canal Kir2.1, il s'agit

d'un acide aspartique (D) en position 172. La mutation de cet acide aminé provoque une diminution de l'affinité pour la spermine et donc une diminution de la rectification. Le rôle important de ce résidu dans la rectification lui a valu le nom de « contrôleur de rectification » (Lopatin and Nichols, 1996). La localisation spécifique de ce « contrôleur de rectification » est maintenant connue grâce à l'analyse de la structure cristallographique de plusieurs canaux Kir. Celui-ci se situe au centre de la cavité centrale, entre le filtre de sélectivité et la zone de croisement (Figure 15).



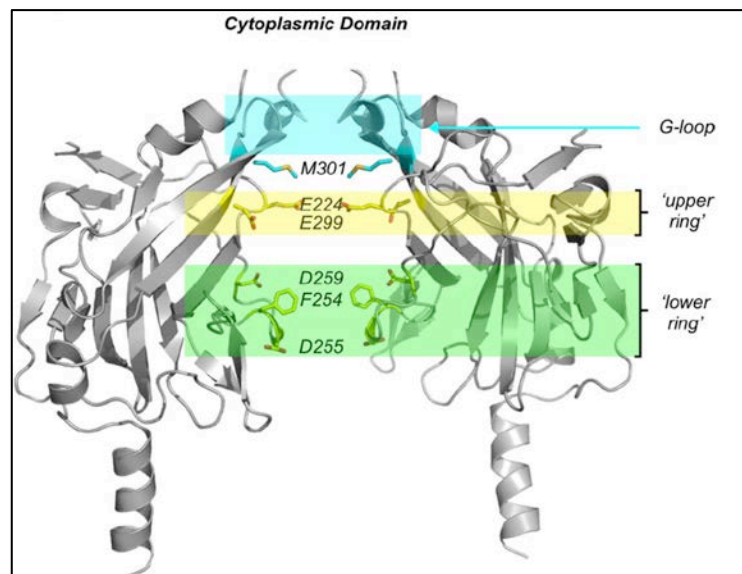
**Figure 15 : Agrandissement de la région transmembranaire, avec l'acide aspartique (Asp ou D) « contrôleur de rectification » (D172) pour le canal Kir2.1, le filtre de sélectivité (vert), et la zone de croisement (bundle crossing, rouge).**

Adapté de (Baronas and Kurata, 2014)

Un acide aspartique de chacune des quatre sous unités créait ainsi un anneau de charge négative avec lequel une ou plusieurs polyamines peuvent interagir (Baronas and Kurata, 2014).

Malgré sa forte influence sur les propriétés de rectification, le « contrôleur de rectification » n'a pas un effet tout ou rien. En effet, le remplacement de l'acide aspartique 172 par une asparagine électro-neutre (D172N) diminue la rectification mais ne l'abolit pas. Ainsi, d'autres résidus sont importants pour la liaison avec les polyamines (Xu et al., 2009).

Des études de protéines chimériques ont permis de mettre en évidence que des résidus dans le domaine cytoplasmique sont également importants pour le blocage du canal par les polyamines. En effet, l'échange du domaine cytoplasmique du canal Kir2.1 avec le canal Kir1.1 (à faible rectification) permet à ce dernier d'avoir une rectification plus forte (Tagliatela et al., 1994). Des études plus approfondies ont permis d'identifier deux anneaux de charges ayant un rôle important pour la rectification (Figure 16 ; Fujiwara and Kubo, 2006; Guo and Lu, 2003; Tagliatela et al., 1995).



**Figure 16 : Agrandissement du domaine cytoplasmique, où deux anneaux de charge sont identifiés (« upper ring » en jaune et « lower ring » en vert).**

Adapté de (Baronas and Kurata, 2014)

Les deux anneaux de charge « upper ring », constitué par E224/E299, et « lower ring », formé par D255/D259/F254, contrôlent la cinétique de blocage par la spermine. Cependant, seuls les résidus E224 et E299 sont capables d'influencer la stabilité de la liaison de la spermine (par l'intermédiaire de l'interaction avec le « contrôleur de rectification » du domaine transmembranaire). Cette caractéristique est due à la proximité du « upper ring » avec le domaine transmembranaire (Robertson et al., 2008).

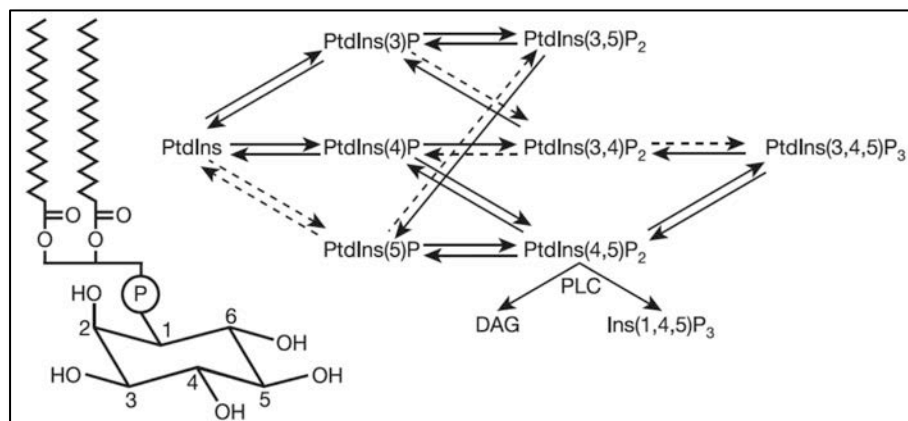
Les ions  $Mg^{2+}$  ont également été décrits pour avoir un rôle important sur la rectification. En effet, ces cations intracellulaires sont capables de se lier aux mêmes résidus que les polyamines, et de ce fait ont le mode d'action (Stanfield et al., 1994) .



Le blocage par les polyamines et le magnésium intracellulaire est un mécanisme capable de générer une forte dépendance au voltage des canaux ioniques dans les tissus excitables. Des mutations dans des sites de fixations des polyamines ont un fort effet sur la rectification des canaux Kir, et affecte les propriétés électriques des cellules excitables. Cependant d'autres molécules sont capables d'interagir avec les canaux Kir, afin de réguler leur fonction, telles que les phosphoinositides.

## 2. Régulation des canaux Kir2.x par les phosphoinositides

Les phosphoinositides sont des dérivés phosphorylés du phosphatidylinositol (PtdIns). Le PtdIns est un phospholipide, composé d'un acide phosphatique (deux acides gras estérifiant une molécule de glycérol, elle-même liée à un acide phosphorique) dont le groupement phosphate est associé à une molécule volumineuse *myo*-inositol. La phosphorylation réversible de ce groupement en position 3, 4 ou 5 résulte en la formation de sept phosphoinositides différents (Figure 17) (Di Paolo and De Camilli, 2006).



**Figure 17 : Métabolisme des phosphoinositides**

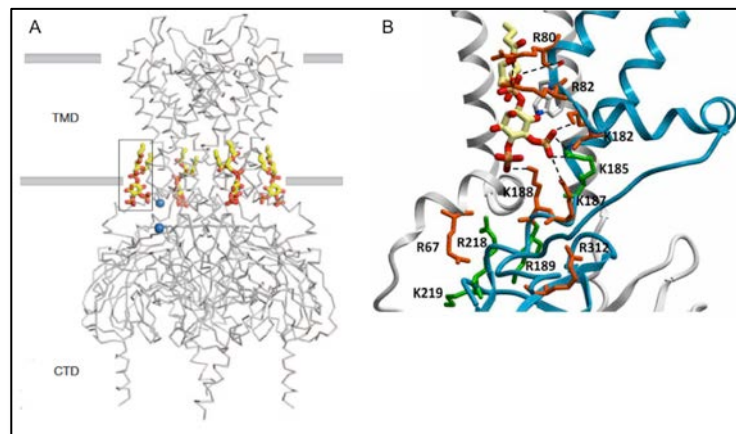
A gauche, structure générique d'un PtdIns

A droite, réaction métaboliques conduisant à la génération des sept espèces de phosphoinositides. DAG= diacylglycérol

De tous les phosphoinositides, le phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> ou PI(4,5)P<sub>2</sub>) est le modulateur de l'activité des canaux ioniques le mieux caractérisé. Ce phosphoinositide, chargé négativement, contient trois groupements

phosphate et son clivage par la phospholipase C (PLC) en second messager inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) et diacylglycérol (DAG)) peut affecter la fonction de canaux par l'activation de voie de signalisation ou le recrutement de protéines spécifiques. Cependant, le PI(4,5)P<sub>2</sub> a un effet direct sur la fonction des canaux Kir (Fürst et al., 2014). En effet, lors d'expérience de patch clamp, l'activité des canaux Kir diminue progressivement lorsque celui-ci est sorti de son environnement membranaire. Ceci est connu comme étant le « run-down ». L'ajout d'ATP et de Mg<sup>2+</sup> du côté intracellulaire permet de restaurer le pool de PI(4,5)P<sub>2</sub>, restaurant l'activité du canal. Le PI(4,5)P<sub>2</sub> est donc nécessaire pour que les canaux Kir fonctionnent (Fürst et al., 2014; Hansen, 2015).

L'analyse de la structure cristallographique du canal Kir2.2 a révélé qu'il existait un site de fixation du PI(4,5)P<sub>2</sub> à l'interface du domaine cytoplasmique et du domaine transmembranaire (Figure 18A). Le PI(4,5)P<sub>2</sub> ne se fixe pas à l'intérieur du canal, comme les polyamines, mais il interagit avec le site de fixation situé vers l'extérieur du canal (Figure 18A).



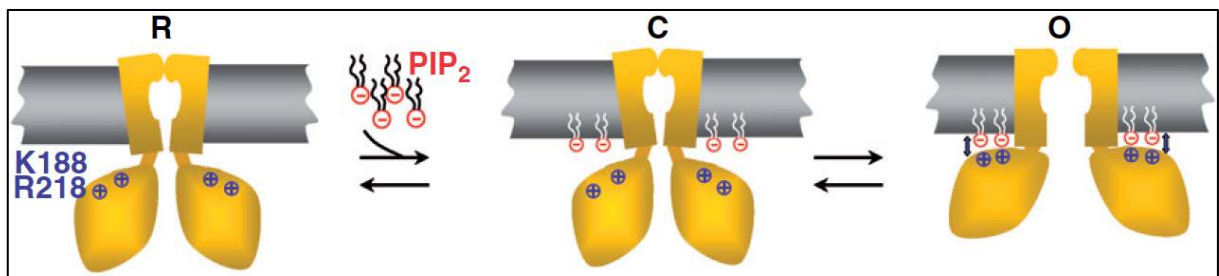
**Figure 18 : La fixation du PI(4,5)P<sub>2</sub> au niveau du domaine transmembranaire des canaux Kir provoque un changement conformationnel qui ouvre celui-ci**

A : Structure cristallographique au rayon X du canal Kir2.2 (en gris), lié avec le PIP<sub>2</sub>. La bicouche lipidique est représentée par les deux traits gris. Quatre molécules de PI(4,5)P<sub>2</sub> sont représentées en bâton et colorée par atome : rouge : oxygène, jaune : carbone, orange : phosphate. L'aspartate 172 et la lysine 220 sont représentées par les boules bleues

B : vue détaillée du site de liaison au PI(4,5)P<sub>2</sub>. La fixation du PI(4,5)P<sub>2</sub> est coordonnée par des résidus situés à l'interface des domaines cytoplasmique et transmembranaire. Les résidus chargés positivement, impliqués dans la liaison au PI(4,5)P<sub>2</sub>, sont indiqués en bleus, et numéroté selon la numérotation du canal Kir2.1. Les résidus en vert sont impliqués dans la liaison énergétique tandis que les résidus en rouge sont impliqués dans les transitions d'état du canal. (D'après Hansen, 2015)

Ce site de fixation est composé d'acides aminés chargés positivement, tels que des lysines (K) ou des arginines (R), ce qui forme une bande de charges positives, juste en dessous de l'hélice TM2 (Figure 18B). Une molécule de PI(4,5)P<sub>2</sub> se lie à chacune des quatre sous unités (Hansen et al., 2011).

Le site de fixation du PI(4,5)P<sub>2</sub> comprend des acides aminés des deux structures principales du canal : le groupement inositol interagit avec le domaine cytoplasmique, tandis que le reste de la molécule interagit avec le domaine transmembranaire (Hansen et al., 2011). Cette fixation provoque un changement conformationnel en faisant bouger le domaine cytoplasmique vers le domaine transmembranaire (Figure 19) (Hansen et al., 2011).



**Figure 19 : Schéma du mécanisme d'ouverture du canal Kir2.1 par le PI(4,5)P<sub>2</sub>**

Les canaux Kir perdent progressivement leur activité lorsqu'ils sont sortis de leur environnement membranaire : c'est le run-down (R). Ce run-down continue jusqu'à la fermeture des canaux (C=closed). L'ajout de PI(4,5)P<sub>2</sub>, ou le PI(4,5)P<sub>2</sub> membranaire interagit avec des acides aminés chargé positivement dans le domaine cytoplasmique, provoquant un changement conformationnel de celui-ci, et l'ouverture du canal (O=Open). (D'après Xie, 2007).

En absence de PI(4,5)P<sub>2</sub>, le domaine cytoplasmique des canaux Kir est éloigné de la slide helix et la structure servant à lier l'hélice TM2 et le domaine cytoplasmique (linker) est allongé. Dans cette conformation, les résidus nécessaires à la liaison du PIP<sub>2</sub> sont trop éloignés pour permettre cette fixation. Lorsque le PI(4,5)P<sub>2</sub> se fixe, le linker se contracte et devient organisé en hélice  $\alpha$ , ce qui permet au domaine cytoplasmique de se déplacer vers le domaine transmembranaire, ouvrant ainsi le pore du canal (Hansen et al., 2011). Le mécanisme d'ouverture du canal est schématisé sur la figure 19.

Le PI(4,5)P<sub>2</sub> active les canaux Kir par une interaction directe avec ces derniers. Il n'agit donc pas comme un second messager activant une voie de signalisation particulière mais comme un ligand dont l'interaction directe avec le canal est nécessaire

à son ouverture. Une molécule est considérée comme un ligand lorsque la liaison de celle-ci à une protéine est réversible, spécifique et dose-dépendante. La fixation du PI(4,5)P<sub>2</sub> avec les canaux Kir a toutes les caractéristiques d'un ligand. En effet, le pool de PI(4,5)P<sub>2</sub> est finement régulé : une cascade de signalisation peut rapidement changer la concentration en PI(4,5)P<sub>2</sub>, afin d'ouvrir ou de fermer un canal (Murata and Okamura, 2007; Rossignol and Jones, 2006). Des mutations dans les sites de fixation du PI(4,5)P<sub>2</sub> provoquent la perte de fonction du canal et sont associées à différentes pathologies, dont le syndrome d'Andersen.

Plusieurs études ont montré que dans les cellules de mammifères, le PI(4,5)P<sub>2</sub> étaient concentrés dans les fractions membranaires de faible densité, suggérant que celui-ci se trouvaient dans les zones riches en cholestérol (Casey, 1996; Rosenhouse-Dantsker et al., 2014). Le cholestérol est le principal lipide retrouvé dans les membranes plasmiques et celui-ci est capable d'inhiber l'activité des canaux Kir, possiblement en les maintenant dans un état fermé (D'Avanzo et al., 2011; Romanenko et al., 2004). Certains des résidus importants pour la fixation du PI(4,5)P<sub>2</sub> sont également importants pour la fixation du cholestérol, suggérant un mécanisme commun de régulation des canaux Kir (Rosenhouse-Dantsker et al., 2014).

L'activité des canaux Kir est finement régulée, par des processus contrôlés. Cependant, les canaux étant des structures membranaires, différentes protéines sont également impliquées dans le transport et la répartition spatiale des canaux Kir2.x.

#### **D. Trafic et localisation des canaux Kir2.x**

Les canaux Kir2.x, comme toutes les protéines, sont synthétisés dans le réticulum endoplasmique (RE). Ils possèdent une séquence en acides aminés qui est responsable de leur recrutement à la sortie du RE, jusqu'à la membrane plasmique. Ce signal d'export du RE est conservé à travers tous les canaux Kir2.x et correspond à la séquence phénylalanine (F)-cystéine (C)-tyrosine (Y)-glutamate (E)- asparagine (N)-glutamate (E), au niveau de la région C-terminale du domaine cytoplasmique (Stockklausner and Klocker, 2003; Zerangue et al., 1999). La mutation de ces motifs provoque la rétention des canaux Kir2.x dans le cytosol.

Après leur synthèse dans le RE, la majorité des protéines membranaires sont transportées vers l'appareil de Golgi afin de subir les modifications post-traductionnelles nécessaires à leur fonctionnement, avant d'être transportées à la

membrane. Pour le canal Kir2.1, une région particulière de la région N-terminale du domaine cytoplasmique a été identifiée comme étant responsable de l'export du canal du Golgi vers la membrane. En effet, la double mutation de l'acide aminé arginine (R) en position 44 et 46 provoque une absence du canal Kir2.1 de la membrane, et sa rétention dans le Golgi (Stockklausner et al., 2001). En plus de séquences particulières, le repliement du canal dans le Golgi est également important pour son export jusqu'à la membrane plasmique. En effet, la structure tertiaire du canal Kir2.1 présente un ensemble de résidus (incluant les résidus R44 et R46), situés au niveau de l'interface entre les régions N- et C-terminales du domaine cytoplasmique, qui créaient un site d'interaction pour le complexe adaptin AP1. Ce site particulier permet aux canaux Kir correctement assemblés d'être incorporés dans des vésicules de clathrines au niveau du *trans*-Golgi, afin d'être exportés à la membrane (Ma et al., 2011). Des mutations altérant ce site de fixation provoquent la rétention du canal au niveau du cytoplasme.

Comme décrit précédemment, les canaux Kir sont situés dans des régions membranaires riches en cholestérol. Cette localisation membranaire particulière fait intervenir différents partenaires, afin de positionner les canaux Kir correctement au sein de la membrane plasmique. Cette localisation dans des domaines membranaires est assurée par l'interaction des canaux Kir2.1 avec des protéines partenaires. En effet, il a récemment été montré que les canaux Kir2.1 peuvent interagir avec la cavéoline-1 (cav-1) et la cavéoline-3 (cav-3). Ces canaux possèdent deux séquences consensus de liaison avec les cavéolines. Le premier est situé à l'interface entre l'hélice externe transmembranaire TM1 et la région N-terminale du domaine cytoplasmique ; le deuxième est situé proche de la région extracellulaire du canal. L'interaction avec les cavéolines permet au canal de se retrouver exprimé au sein des cavéoles, région membranaire riche en cholestérol (Han et al., 2014; Vaidyanathan et al., 2013).

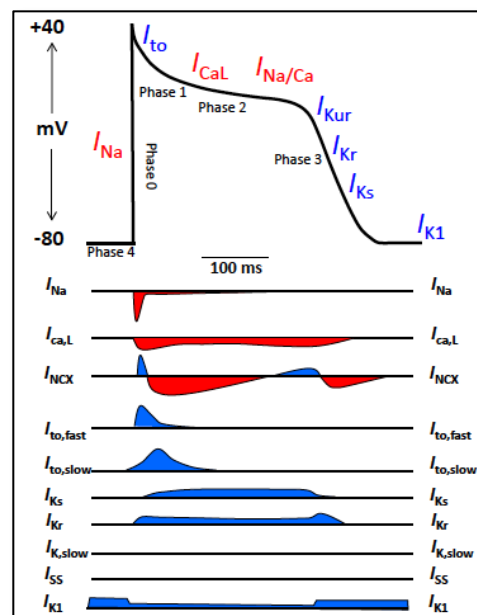
La localisation cellulaire des canaux Kir est également assurée par l'interaction avec des protéines chaperonnes. Ainsi, la localisation des canaux Kir2.x au sein des cellules est assurée par leur interaction avec des protéines à domaines PDZ. Ce domaine particulier est constitué de différents acides aminés, et leur séquence définit différents types de domaines PDZ. Les canaux Kir2.x possèdent un site PDZ de type I, ce qui leur permet d'interagir avec des protéines telles que Post Synaptic Density 95 (PSD95), la chapsyne 110 (PSD93) ou encore Synapse Associated Protein (SAP) 97 (Cohen et al., 1996; Leyland and Dart, 2004; Nehring et al., 2000; Vaidyanathan et al., 2010).

L'interaction des canaux Kir2.1 avec ses protéines chaperonnes est donc primordiale afin d'assurer une bonne localisation et un bon fonctionnement du canal, au sein de l'organisme. En effet, les canaux Kir2.x sont exprimés dans de très nombreux tissus, et leur rôle primordial dans le maintien du potentiel de repos des cellules est nécessaire au bon fonctionnement des tissus excitables mais également non excitables.

## E. Rôles physiologiques des canaux Kir2.x

### 1. Cœur

Comme décrit brièvement au début de ce manuscrit, le cœur est un organe dont la contraction dépend de l'activité électrique des cellules qui le composent dans les différents compartiments. Cette activité électrique conduit à la génération de potentiel d'action cardiaque. Celui-ci est composé de cinq phases dans le compartiment ventriculaire, chacune d'entre elles étant caractérisée par un courant ionique (Figure 20).

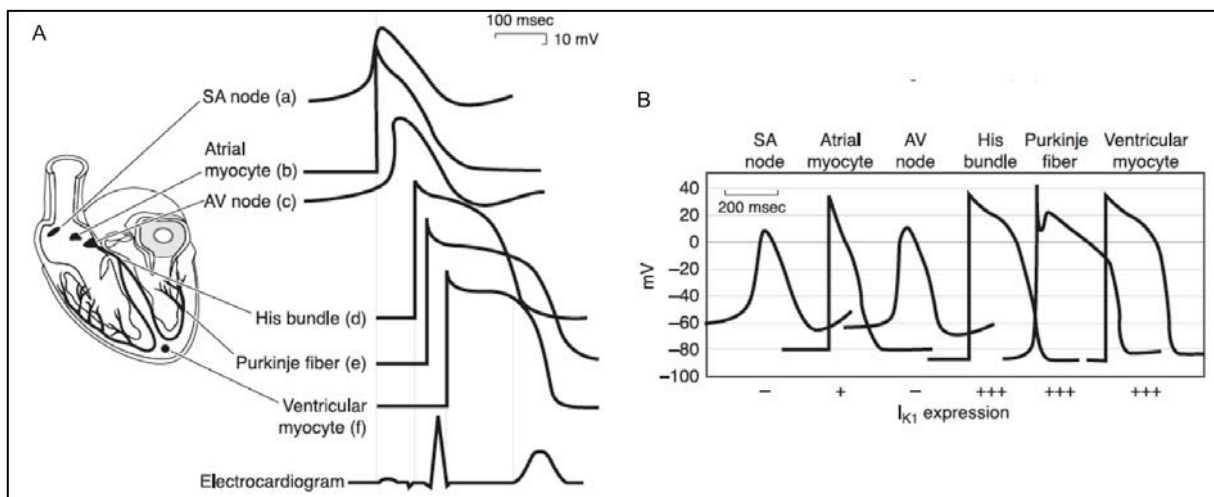


**Figure 20 : Potentiel d'action cardiaque ventriculaire, et courants ioniques associés (rouge : entrant, bleu : sortant).**

Lorsqu'elle est stimulée (par l'influx électrique produit au niveau du tissu nodal), la cellule cardiaque se dépolarise c'est-à-dire que la membrane du cardiomyocyte va devenir positive à l'intérieur et négative à l'extérieur : c'est la phase 0 portée par

l'ouverture des canaux sodiques, ce qui provoque une entrée massive d'ions sodium  $\text{Na}^+$  ( $I_{\text{Na}}$ ) à l'intérieur de la cellule. La phase 1 correspond à la repolarisation initiale, due à l'inactivation rapide des canaux  $\text{Na}^+$ . En phase 2 ou plateau, la repolarisation est ralentie par l'ouverture des canaux calciques  $\text{Ca}^{2+}$  ( $I_{\text{CaL}}$ ,  $I_{\text{Na/Ca}}$ ). Ce calcium sera nécessaire à la contraction des cardiomyocytes. La phase 3 correspond à la repolarisation : les canaux  $\text{Ca}^{2+}$  se ferment et les canaux potassiques sensibles au voltage s'activent, permettant la sortie d'ions potassium  $\text{K}^+$ . La phase 4 correspond au retour rapide au potentiel de repos, dû au canaux  $\text{Kir2.x}$ , responsable du courant  $\text{IK}_1$  (Dhamoon and Jalife, 2005; Nichols and Lopatin, 1997).

L'allure et la durée des potentiels d'action enregistrés entre les oreillettes et les ventricules sont assez distinctes. Ces différences sont attribuées à une expression différentielle des courants ioniques, incluant le courant  $\text{IK}_1$  (Figure 21A ; Dhamoon and Jalife, 2005).



**Figure 21 : Excitabilité des cardiomyocytes**

A : Variation régionale des potentiels d'action cardiaque. Leur relation avec un ECG classique est représentée en bas.

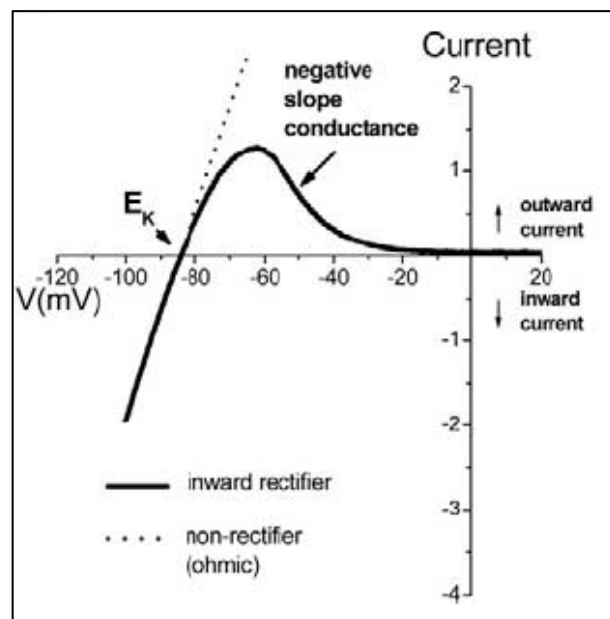
B : Comparaison des potentiels d'action dans différentes régions du cœur. (D'après Hibino, 2010).

Le courant  $\text{IK}_1$  est pratiquement absent dans les cellules du nœud sinusal. Le potentiel de repos dans les nœuds sinusal (SA) et auriculo-ventriculaire (AV) n'est pas autant hyperpolarisé que dans les autres régions cardiaques. En effet, ces cellules ont un potentiel de membrane d'environ -50 mV tandis que les cellules des ventricules, où le courant  $\text{IK}_1$  est fort, ont un potentiel de repos de -80 mV (Figure 21B, (Schram et al., 2002). Dans le

nœud sinusal, l'absence du courant  $I_{K1}$  permet un petit courant entrant, ce qui dépolarise lentement la membrane pendant la diastole (décontraction du cœur). Le potentiel de membrane dans le nœud sinusal présente une phase 4 de dépolarisation qui permet d'initier le potentiel d'action suivant (Hibino et al., 2010).

A l'inverse du nœud sinusal, les cardiomyocytes auriculaires et ventriculaires présentent un courant  $I_{K1}$  (Figure 22B). Cependant, les propriétés de ce courant sont différentes entre les oreillettes et les ventricules (Lopatin and Nichols, 2001). En effet, l'intensité du courant  $I_{K1}$  est plus importante dans les ventricules que dans les oreillettes, ce qui entraîne un potentiel de repos plus hyper polarisé et une repolarisation en phase trois plus rapide (Dhamoon and Jalife, 2005).

La conductance des canaux Kir2.x est donc responsable du maintien du potentiel de repos dans le tissu cardiaque. Cette conductance présente un large courant entrant à des potentiels inférieurs à  $E_K$  et un courant sortant lorsque le potentiel de membrane est supérieur à  $E_K$  (Figure 22).



**Figure 22 : Représentation schématique de la courbe I/V du courant  $I_{K1}$**

La conductance du potassium est forte à des potentiels inférieurs à  $E_K$  et faible à des potentiels supérieurs à  $E_K$ . Les canaux Kir présentent plus de courants entrants que de courants sortants. (D'après Dhamoon, 2005).

Cette caractéristique est nécessaire afin de stabiliser le potentiel de repos des cardiomyocytes proches de  $E_K$ . La rectification entrante des canaux Kir2.x provoque une diminution progressive du courant  $I_{K1}$  lors de la dépolarisation. Cette diminution



progressive permet de maintenir la dépolarisation pendant la phase de plateau du potentiel d'action cardiaque (Dhamoon and Jalife, 2005). Lorsque la repolarisation s'initie, le retour au potentiel de repos est rapide grâce à l'action combinée des canaux potassiques sensibles au voltage et des canaux Kir2.x (Hibino et al., 2010). Ainsi, les canaux Kir2.x et le courant  $IK_1$  sont essentiels au bon déroulement du potentiel d'action cardiaque car ils maintiennent le potentiel de repos et provoquent un retour rapide à ce potentiel, lors de la phase tardive de la repolarisation cardiaque, permettant la mise en place du potentiel d'action suivant.

## 2. Vaisseaux sanguins.

Les constituants majoritaires du système vasculaire sont les cellules endothéliales et les cellules du muscle lisse. Des études électrophysiologiques ont révélé que ces deux types de cellules expriment les canaux Kir2.x (Adams and Hill, 2004; Nilius and Droogmans, 2001). Dans les cellules vasculaires endothéliales, les canaux Kir2.x sont les canaux les plus importants. L'expression de ces canaux impose aux cellules endothéliales un potentiel de repos négatif, ce qui permet l'influx de calcium au travers des canaux calciques. En effet, le blocage des canaux Kir2.x inhibe l'influx de calcium, mais également la vasodilatation causée par la production d'oxyde d'azote (NO) induite par le calcium (Kwan et al., 2003; Wellman and Bevan, 1995). En effet, l'augmentation de la concentration intracellulaire de  $Ca^{2+}$  active des enzymes telles que la NO synthase et la phospholipase  $A_2$  (PLA<sub>2</sub>), ce qui induit la sécrétion de facteurs vasoactifs. Ainsi, le contrôle du potentiel de membrane par les canaux Kir2.x dans les cellules endothéliales est un des mécanismes de régulation clés du tonus vasculaire (Hibino et al., 2010). Cependant, la composante moléculaire des canaux Kir2.x dans les cellules endothéliales n'a pas été complètement élucidée. En effet, dans les cellules endothéliales de l'aorte, les canaux Kir2.1 et Kir2.2 sont exprimés mais des expériences de patch clamp et de blocage chimique de ces canaux suggèrent que le canal dominant est le canal Kir2.2 (Fang et al., 2005). D'autres études sont nécessaires afin de déterminer précisément la fonction des canaux Kir2.x dans les cellules endothéliales.

Dans les cellules vasculaires du muscle lisse, il a été suggéré que les canaux Kir2.x contribuent à la vasodilatation en réponse à une augmentation de la concentration en  $K^+$  extracellulaire (Edwards et al., 1988; Knot et al., 1996; McCarron and Halpern, 1990). Bien qu'une élévation forte de cette concentration dépolarise habituellement les cellules

du muscle lisse et a un effet de constriction sur les vaisseaux sanguins, une élévation intermédiaire de la concentration de potassium extracellulaire (de 6 à 15 mM) hyperpolarise les cellules, ce qui dilate les artères coronaires et cérébrales (Knot et al., 1996; McCarron and Halpern, 1990; Nelson et al., 1995). Le potentiel de repos des artères des muscles est aux alentours de -45mV et une élévation de la concentration de potassium extracellulaire jusqu'à 15 mM hyperpolarise le potentiel de membrane à environ -60 mV, en augmentant la conductance potassique (Knot et al., 1996; Nelson et al., 1995). Cette hyperpolarisation entraîne la fermeture des canaux calciques voltage dépendant, réduisant la concentration en calcium, provoquant une vasodilatation (Knot et al., 1996). Le blocage des canaux Kir2.x prévient l'hyperpolarisation induite par le potassium et la vasodilatation des artères coronaires et cérébrales (Knot et al., 1996). Les cellules vasculaires du muscle lisse expriment le canal Kir2.1, mais pas le canal Kir2.2 ni Kir2.3, indiquant que ce canal est le principal responsable du courant Kir dans ces cellules (Bradley et al., 1999).

L'activité des canaux Kir est également importante pour la contraction et la relaxation du muscle lisse de la trachée. En effet, il a été rapporté que la neurokinine A (un neuropeptide) est capable d'inhiber les canaux Kir2.x dans les cellules du muscle lisse de la trachée, ce qui provoque une dépolarisation des cellules, et une contraction trachéale. Ce mécanisme pourrait être impliqué dans des pathologies respiratoires telles que l'asthme (Nakajima et al., 1995).

### 3. Rôle des canaux Kir2.x dans les neurones.

Des études électrophysiologiques ont permis de détecter des courants Kir dans les neurones de l'hippocampe et dans des motoneurones spinaux de rats (Takahashi, 1990). Ces courants sont extrêmement importants pour le maintien du potentiel de repos et la régulation de l'excitabilité des neurones. En effet, le blocage de ces canaux Kir dans des neurones isolés provoque une dépolarisation et entraîne une initiation du potentiel d'action (Day et al., 2005a).

Des expériences d'hybridation *in situ* et de d'immunohistochimie ont montré que les canaux Kir2.x sont exprimés abondamment dans le cerveau. En effet, le canal Kir2.1 est exprimé dans tout le cerveau, tandis que l'expression du canal Kir2.2 est modérée dans le prosencéphale et forte dans le cervelet. Enfin, le canal Kir2.3 est fortement

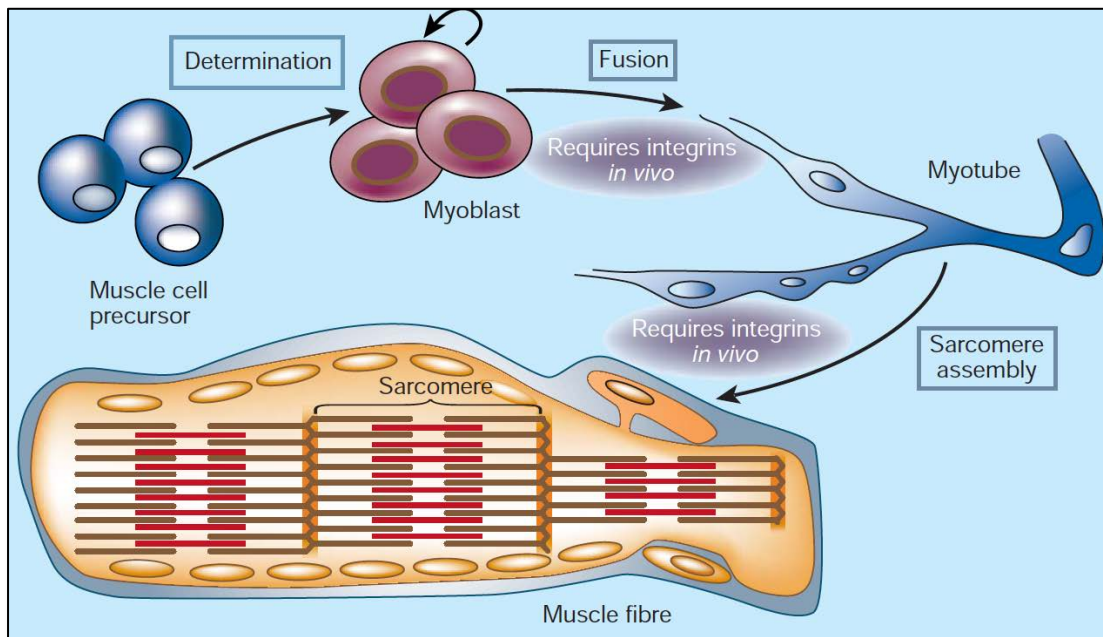
exprimé dans le prosencéphale et le bulbe olfactif (Horio et al., 1996; Inanobe et al., 2011; Karschin et al., 1996; Prüss et al., 2005).

La fonction des canaux Kir2.x dans le cerveau est modulée par des neurotransmetteurs. En effet, les canaux Kir2.x peuvent être inhibés par l'isoprotérénol, un agoniste  $\beta$ -adrénergique (Ito et al., 1997). Cet effet est dû à l'augmentation de la concentration en AMP cyclique (AMPC) et en GMPc. Cependant, la signalisation responsable de cet effet dans le cerveau n'a pas encore été complètement élucidée.

#### 4. Rôle des canaux Kir2.x dans le muscle squelettique.

Un des déterminants majeurs du potentiel de repos dans le muscle est une conductance chlore ( $\text{Cl}^-$ ) (Hoffman, 1995). Cependant, les ARN messagers (ARNm) des tous les canaux Kir2.x sont retrouvés dans le muscle squelettique (Kubo et al., 1993; Périer et al., 1994; Raab-Graham et al., 1994; Takahashi et al., 1994; Töpert et al., 1998). Ainsi, les canaux Kir2.x participent également à l'établissement du potentiel de repos en l'amenant vers des valeurs plus négatives. Le rôle central du canal Kir2.1 dans le fonctionnement du muscle squelettique a été mis en évidence dans le syndrome d'Andersen (Plaster et al., 2001). En effet, comme décrit au début de ce manuscrit, les patients atteints par ce syndrome souffrent de paralysies périodiques. La réduction du courant Kir2.1 provoque une dépolarisation de la membrane, activant les canaux sodiques voltage dépendant Nav1.4 lorsque ceux-ci devraient être inactifs. Ainsi, lors d'un influx nerveux, les canaux Nav1.4 ne sont plus disponibles pour initier et propager les potentiels d'action.

Lors de la myogenèse, des cellules précurseurs du muscle ou cellules satellites se différencient en myoblastes. Ces myoblastes prolifèrent puis fusionnent en cellules multinuclées du muscles squelettique, les myotubes. L'unité contractile du muscle est le sarcomère, un assemblage de filaments d'actine et de myosine. Lors de la maturation des myotubes, le sarcomère s'assemble afin de permettre la contraction musculaire (Figure 23 ; Gullberg, 2003).



**Figure 23 : Formation du muscle**

D'après, Gullberg, 2003

Outre son rôle dans le fonctionnement du muscle, l'expression fonctionnelle du canal Kir2.1 semble être nécessaire pour la différenciation des myoblastes (Konig et al., 2004) mais également pour la fusion des myoblastes mononuclés en fibres musculaires multinuclées (Fischer-Lougheed et al., 2001). Ces deux processus sont dépendants du  $Ca^{2+}$  et sont essentiels pour le développement, la croissance et la réparation du muscle squelettique. Pendant le développement, le potentiel de repos des myoblastes s'hyperpolarise progressivement jusqu'à -70 mV (Liu et al., 1998), sous l'effet de l'augmentation de l'expression du canal Kir2.1 (Fischer-Lougheed et al., 2001). Cette hyperpolarisation permet l'ouverture des canaux  $Ca^{2+}$  ce qui favorise la différenciation et la fusion des myoblastes. De plus, la différenciation est en partie due à l'expression et l'activité de facteurs de transcription myogénique, tels que la myogénine et le myocyte enhancer factor 2 (MEF-2). Leur expression est déclenchée par l'hyperpolarisation induite par les canaux Kir2.1 (Konig et al., 2004).

Bien que des anomalies de développement musculaire n'ont pas été rapportées de façon évidente chez les patients atteints du syndrome d'Andersen, leur morphologie élancée pourrait être due à un défaut modéré du développement musculaire causé par le dysfonctionnement du canal Kir2.1 (Jongsma and Wilders, 2001).

## 5. Rôle du canal Kir2.1 dans le tissu osseux

Les canaux Kir2.x ont un rôle crucial dans le maintien du potentiel de repos dans les cellules excitables, telles que les cellules musculaires ou les neurones. L'impact de la perte de fonction de ces canaux dans ces cellules est donc facilement compréhensible. Cependant, le phénotype développemental retrouvé chez les patients atteints par le syndrome d'Andersen suggère un rôle du canal Kir2.1 dans le tissu osseux (Andersen et al., 1971; Tristani-Firouzi and Etheridge, 2010). Les différents modèles animaux du syndrome d'Andersen présentent également des problèmes de développement osseux. Ces différents modèles seront abordés plus tard dans ce manuscrit. Les ARNm du canal Kir2.1 sont exprimés dans les structures osseuses de la tête, des membres et du corps, chez le rat, au jour embryonnaire 12 (Karschin et al., 1996). Enfin des études électrophysiologiques ont révélé la présence d'un courant rectifiant entrant dans les ostéoblastes et les ostéoclastes (Sims and Dixon, 1989; Weidema et al., 2000).

La morphogénèse et l'homéostasie osseuse sont des processus complexes, qui seront abordés en détail plus loin dans ce manuscrit. Les cellules stromales mésenchymateuses ou cellules souches mésenchymateuse (MSC) sous l'action de différents facteurs, se différencient en ostéoblastes, qui vont produire la matrice osseuse. Les ostéoclastes, provenant des monocytes, vont résorber cette matrice osseuse, et ainsi assurer l'homéostasie du tissu osseux (Caetano-Lopes et al., 2007).

Très peu d'étude *in vitro* et *in vivo* se sont intéressées aux conséquences fonctionnelles de la perte de fonction du canal Kir2.1 pendant le développement osseux. Les MSC sont le précurseur commun des myoblastes et des ostéoblastes. Ainsi, les myoblastes sont capables de se différencier *in vitro* en ostéoblastes (Grigoriadis et al., 1988; Katagiri et al., 1994). Utilisant cette capacité, il a été récemment montré que des myoblastes Andersen présentent une capacité de différenciation en ostéoblastes très fortement réduite par rapport à des myoblastes contrôles. Ainsi, le canal Kir2.1 est requis pour l'ostéoblastogenèse *in vitro* (Sacco et al., 2015). En effet, l'absence de canal Kir2.1 fonctionnel conduit à une absence de production de matrice extracellulaire chez les cellules de patients (Sacco et al., 2015). La restauration d'un canal Kir2.1 fonctionnel par surexpression de celui-ci restaure la capacité des myoblastes de patients à se différencier en ostéoblastes (Sacco et al., 2015), démontrant ainsi le rôle clé du canal Kir2.1 dans le développement osseux.

## F. Pathologies liées à une dysfonction du canal Kir2.1

### 1. Perte de fonction : syndrome d'Andersen de type I

La perte de fonction du canal Kir2.1 a été associée avec le syndrome d'Andersen (Plaster et al., 2001). Plus de cinquante mutations ont été identifiées sur le canal Kir2.1 et associées au syndrome d'Andersen (voir Figure 7 ; Nguyen et al., 2013).

Ces mutations sont des pertes de fonction du canal Kir2.1, avec un effet dominant négatif. En effet, ce canal étant un tétramère, il suffit d'une seule sous-unité mutée pour rendre le canal silencieux (Bendahhou et al., 2003, 2005; Lange et al., 2003).

Ces mutations sont situées aussi bien dans le domaine transmembranaire que dans le domaine cytoplasmique, bien qu'il semble que la région C-terminale du domaine cytoplasmique soit plus fréquemment mutée chez les patients. De plus, certains résidus semblent être des « hotspots » de mutations, en particulier les arginines R en position 67 dans la région N-terminale du domaine cytoplasmique, R82 dans le premier segment transmembranaire et R218 dans la région C-terminale du domaine cytoplasmique (Davies et al., 2005; Eckhardt et al., 2007; Plaster et al., 2001). Des glycines G en position 144 et 146, dans la boucle formant le pore du canal, ont également été identifiées comme souvent mutées chez les patients Andersen (Donaldson et al., 2003; Lim et al., 2010; Zhang, 2005).

Les mutations associées avec le syndrome d'Andersen affectent le fonctionnement du canal, aussi bien que son acheminement à la membrane (trafficking), ou son repliement (folding). Des mutations ont été identifiées dans des résidus importants pour la liaison avec le PIP<sub>2</sub> (Figure 7, résidus avec un astérisque) qui est un activateur des canaux Kir2.1 (Ballester et al., 2007; Donaldson et al., 2003; Lopes et al., 2002; Tristani-Firouzi et al., 2002). Ces mutations, affectant majoritairement un seul résidu, ont pour effet de diminuer l'affinité du canal avec le PIP<sub>2</sub>, diminuant ainsi la probabilité de fixation de celui-ci et le nombre de canaux ouverts à la membrane, ce qui réduit le courant rectificant entrant (Donaldson et al., 2003; Lopes et al., 2002).

D'autres mutations affectent la boucle formant le pore du canal. Cette région est extrêmement importante pour la fonction du canal. Les mutations retrouvées dans cette région provoquent un changement de conformation du filtre de sélectivité, ce qui réduit fortement le courant potassique retrouvé dans les canaux Kir2.1 (Bendahhou et al., 2003; Donaldson et al., 2003).

Enfin, des délétions de quelques acides aminés entraînent un mauvais repliement du canal ou perturbent son acheminement à la membrane, ce qui réduit le nombre de canaux exprimés. La mutation  $\Delta 95-98$  provoque la délétion d'une partie de la région transmembranaire TM1, perturbant la formation de l'hélice  $\alpha$  de ce segment, ce qui altère son insertion dans la membrane (Bendahhou et al., 2005). La mutation  $\Delta 314-315$ , dans la région C-terminale du domaine cytoplasmique, provoque une rétention du canal au niveau de l'appareil de Golgi, empêchant celui-ci d'être acheminé à la membrane ((Bendahhou et al., 2003; Ma et al., 2011).

Des mutations dans le canal Kir2.1 ont été retrouvées dans environ 70% des patients Andersen. Cependant, dans 30% des cas, aucune mutation sur le gène *KCNJ2* n'a été identifié, suggérant que des protéines partenaires peuvent être impliquées dans la pathophysiologie. Ces patients ont été classés en syndrome d'Andersen de type II. Les symptômes de ces patients sont identiques à ceux des patients de type I. Différents gènes candidats furent étudiés afin d'expliquer le syndrome d'Andersen de type II (Donaldson et al., 2004).

Les premiers gènes examinés furent des gènes dont la fonction était similaire au canal Kir2.1 et qui contribuaient au courant  $IK_1$ , ou dont la perte de fonction pouvait entraîner un retard dans la repolarisation cardiaque. Ainsi, des analyses ont été menées sur les gènes *KCNJ12*, *KCNJ4* et *KCNJ14*, codant pour les canaux Kir2.2, Kir2.3 et Kir2.4, respectivement (Donaldson et al., 2004). Bien que le profil d'expression de ces canaux ne soit pas tout à fait identique à celui du canal Kir2.1 dans le cœur, des mutations dans les autres membres de la famille Kir2.x devraient avoir le même effet que des mutations dans le canal Kir2.1. Cependant, aucune mutation dans ces canaux ne fût retrouvée dans des patients Andersen de type II (Donaldson et al., 2004).

Des mutations dans des protéines chaperonnes ont également été recherchées. Ces protéines interagissent avec le canal Kir2.1 afin de faciliter son fonctionnement. Ainsi, des mutations dans ces protéines devraient réduire le nombre de canaux fonctionnels, engendrant la maladie. Comme décrit dans la partie II-D, le canal Kir2.1 interagit avec de nombreuses protéines chaperonnes, afin d'assurer son bon fonctionnement et localisation, telles que SAP97, PSD95 ou PSD93 (Cohen et al., 1996; Leyland and Dart, 2004; Nehring et al., 2000; Vaidyanathan et al., 2010). Cependant, comme pour les premiers gènes candidats, aucune mutation dans les gènes codant pour

les protéines partenaires du canal Kir2.1 n'a été retrouvée. A ce jour, la cause génétique du syndrome d'Andersen de type II n'a pas été identifiée.

## 2. Gain de fonction : syndrome du QT court et fibrillation auriculaire.

Des mutations dans le gène *KCNJ2* peuvent également avoir un effet de gain de fonction. Ces types de mutations sont relativement rares, et ont été associées avec le syndrome du QT court de type 3 (SQT3 ; (Deo et al., 2013; Hattori et al., 2012; Priori et al., 2005) et avec la fibrillation auriculaire familiale de type 3 (AF3 ; voir Figure 7 ; Xia et al., 2005). Ces mutations altèrent la rectification du canal Kir2.1, ce qui provoque un raccourcissement de l'intervalle QT.

Les conséquences fonctionnelles de la perte ou du gain de fonction du canal Kir2.1 ont été principalement étudiées *in vitro* (Bendahhou et al., 2003; Ma et al., 2011; Plaster et al., 2001; Priori et al., 2005; Xia et al., 2005), notamment grâce à l'utilisation de molécules, qui ont permis de comprendre le fonctionnement du canal Kir2.1, ou *ex vivo*, sur des cellules de patients (Sacconi et al., 2009).

## G. Pharmacologie

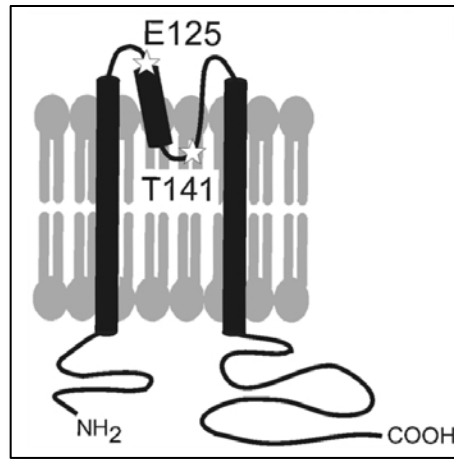
Des bloqueurs et activateurs spécifiques des canaux Kir2.x sont très peu disponibles. Les bloqueurs les plus couramment utilisés sont le baryum ( $Ba^{2+}$ ) et le césium ( $Cs^+$ ) (French and Shoukimas, 1985; Hagiwara and Jaffe, 1979; Hagiwara et al., 1976b, 1978).

Bien que des concentrations élevées de  $Ba^{2+}$  peuvent également bloquer les canaux potassiques voltage dépendant (Kv), l'utilisation de ce cation dans des concentrations de l'ordre de la centaine de micromolaire est spécifique aux canaux Kir2.x (Franchini et al., 2004; Quayle et al., 1993). L'ajout de  $Ba^{2+}$  ou de  $Cs^+$  supprime les courant Kir de manière voltage dépendante. Ainsi, l'inhibition des canaux Kir2.x est plus forte lorsque la membrane est hyperpolarisée (French and Shoukimas, 1985; Hagiwara and Jaffe, 1979; Hagiwara et al., 1978).

Le blocage des canaux Kir2.1 par le  $Ba^{2+}$  se fait en deux étapes successives. Premièrement, le  $Ba^{2+}$  se fixe au niveau d'un site de liaison peu profond, puis migre à l'intérieur du pore du canal, vers un site de liaison profond, où il bloque physiquement le passage des ions  $K^+$  (Alagem et al., 2001). L'interaction avec le  $Ba^{2+}$  se fait au niveau de



deux résidus très importants. Il s'agit de l'acide glutamique (E) en position 125 et de la thréonine (T) en position 141 (Figure 24 ; Alagem et al., 2001).



**Figure 24 : Représentation en cartoon d'une sous unité du canal Kir2.1 montrant les deux résidus importants pour le blocage du canal par le Ba<sup>2+</sup>.**

Adapté de Alagem, 2001.

Ces deux résidus ont des rôles distincts dans le mécanisme de blocage des canaux Kir2.x par le Ba<sup>2+</sup>. En effet, le résidu E125 participe à l'entrée du Ba<sup>2+</sup> dans le pore du canal tandis que le résidu T141 stabilise la fixation du Ba<sup>2+</sup> dans ce site de liaison profond (Alagem et al., 2001). Le Ba<sup>2+</sup> et le Cs<sup>+</sup> ont été largement utilisés *in vitro*, afin d'étudier les caractéristiques du courant I<sub>K1</sub>, dans les cellules de mammifères. En effet, très peu d'études se sont intéressées aux conséquences fonctionnelles de la perte de fonction du canal Kir2.1 *in vivo*.

Récemment, un nouvel inhibiteur a été décrit pour les canaux Kir, le ML133. Celui-ci semble être spécifique des canaux Kir2.x (Wang et al., 2011). Cependant, son effet inhibiteur est de courte durée, et je ne l'ai donc pas utilisé au cours de ma thèse.

## **H. Modèles d'étude *in vivo***

### **1. Zebrafish**

Le poisson zèbre ou zebrafish est un organisme modèle en biologie pour étudier le développement. En effet, ce poisson a un temps de génération très rapide, et il est transparent pendant l'embryogenèse, ce qui permet d'analyser facilement les étapes

précoces du développement (Dooley and Zon, 2000). Le zebrafish a été utilisé récemment afin de modéliser le syndrome d'Andersen (Leong et al., 2014).

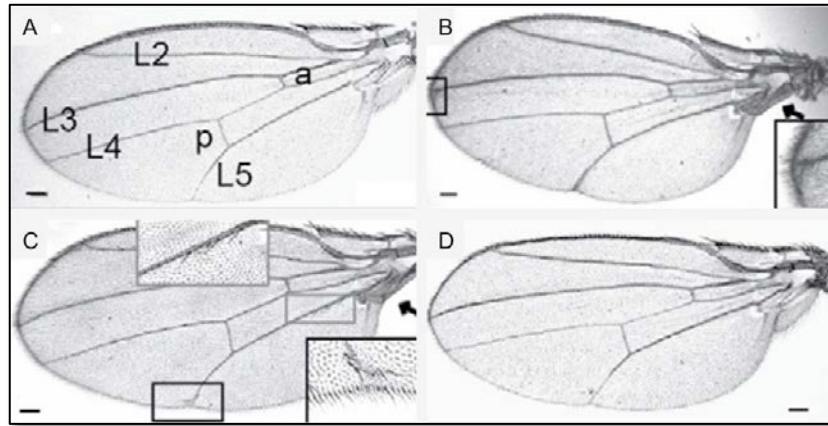
L'analyse bioinformatique du génome du zebrafish a révélé que celui-ci possédait un gène orthologue au gène *KCNJ2* humain, situé sur le chromosome 12 (*kcnj2-12*), dont le profil d'expression est similaire à celui de l'homme (Leong et al., 2014).

L'expression transitoire de la mutation  $\Delta 95-98$  *kcnj2-12* (équivalent de la mutation  $\Delta 95-98$  chez l'homme) dans des embryons de zebrafish entraîne des phénotypes développementaux (Leong et al., 2014). En effet, les embryons injectés avec la forme mutée de la protéine présentent une queue malformée. L'effet dominant négatif, retrouvé chez l'homme, semble également être présent chez le zebrafish, puisque la co-injection de la forme mutante  $\Delta 95-98$  *kcnj2-12* et de la forme sauvage WT *kcnj2-12*, provoque le même phénotype que l'injection de la forme mutante seule (Leong et al., 2014). Cependant, des malformations au niveau du cartilage ou des os n'ont pas été observées dans tous les embryons injectés avec la forme mutée du gène ou en co-injection avec la forme sauvage (Leong et al., 2014).

## 2. Drosophile

La drosophile est un autre organisme de choix pour l'étude du développement. En effet, sa simplicité d'élevage ainsi que la forte homologie avec notre génome (61%) permettent d'étudier des mécanismes de développement précoce. De plus, les voies de signalisation développementales sont bien conservées avec l'homme. Le canal Kir2.1 possède trois homologues chez la drosophile, le canal Irk1, Irk2 et Irk3. Des analyses électrophysiologiques ont révélé que ces canaux avaient un fonctionnement similaire au canal Kir2.1 humain (Döring et al., 2002).

La perte de fonction de ces canaux entraîne un défaut dans le développement de l'aile. En effet, les drosophiles mutantes pour les canaux Irk présentent un défaut de formation du système veineux, par rapport à des drosophiles contrôles (Figure 25A): bifurcation des veines L3 et L4 (Figure 25B), apparition de poils à la base de l'aile (Figure 25C). Ces phénotypes disparaissent lorsqu'un canal Irk fonctionnel est exprimé (Figure 25D), suggérant ainsi un rôle de ce canal dans le développement de l'aile (Dahal et al., 2012).



**Figure 25 : L'invalidation du canal Irk2 chez la drosophile provoque un défaut de développement de l'aile**

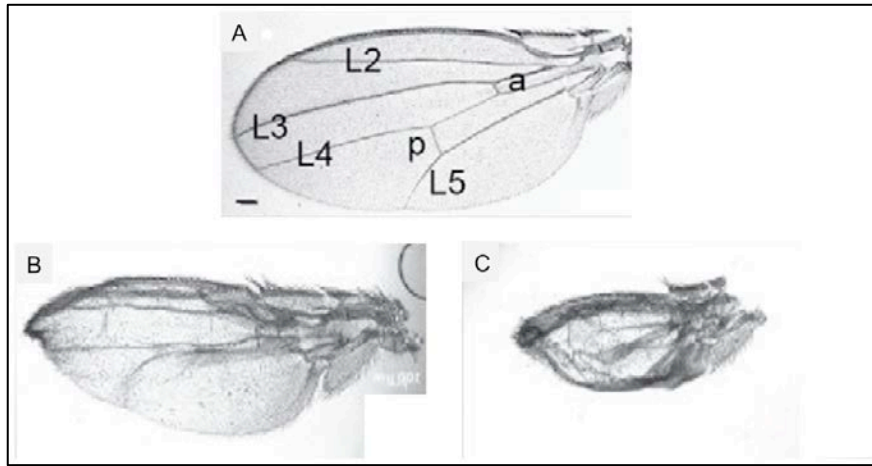
A : Aile d'une drosophile Wild-Type pour le canal Irk2, montrant les veines longitudinales L2 à L5 ; a : antérieur et p : postérieur

B : Bifurcation de la veine L3, chez les drosophiles invalidées pour irk2

C : Apparition de poil et veine L5 incomplète, chez les drosophiles invalidées pour irk2

D : Le rescue du canal Irk2 entraîne un développement de l'aile normal. (Adapté de Dahal, 2012).

Les phénotypes développementaux observé chez les mutants Irk2 sont similaires aux mutants Decapentaplegic (Dpp). Ce morphogène est un analogue de la Bone Morphogenetic Protein (BMP) retrouvé chez les mammifères. En effet, la perte de fonction des canaux Irk entraîne une réduction de la signalisation Dpp. Cette signalisation est extrêmement importante pour la mise en place de l'aile chez la drosophile. La délétion simultanée des canaux Irk et de Dpp aggrave la malformation de l'aile (Figure 26C), suggérant que d'autres protéines sont importantes en plus des canaux Irk pour la signalisation Dpp (Dahal et al., 2012).



**Figure 26 : L'invalidation simultanée de *Irk2* et de la voie *Dpp* aggrave la malformation de l'aile**

A : Aile d'une drosophile Wild-Type pour le canal *Irk2*, montrant les veines longitudinales L2 à L5 ; a : antérieur et p : postérieur

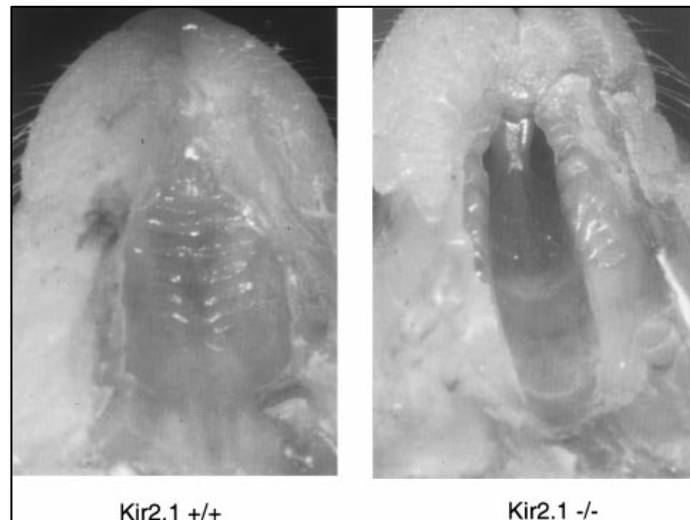
B : Veine L5 incomplète chez les drosophiles invalidées pour *Irk2*

C : L'invalidation de *Irk* et de *Dpp* provoque une réduction de la taille de l'aile et une absence de veine (Adpaté de Dahal, 2012).

Les canaux *Irk* semblent donc être important pour avoir une signalisation *Dpp* correcte et une formation de l'aile normale. Le *Dpp* étant l'analogue du BMP chez les mammifères, le canal *Kir2.1* pourrait être important pour la signalisation BMP. Cependant, chez la drosophile, l'invalidation individuelle des trois homologues du canal *Kir2.1* provoque un phénotype mineur. Seule l'invalidation des trois homologues du canal entraîne un phénotype développemental majeur, indiquant la difficulté de modéliser le syndrome d'Andersen dans la drosophile.

### 3. Souris

Les souris invalidées (KO) pour le canal *Kir2.1* et *Kir2.2* ont été générées dans les années 2000, par délétion de la séquence codante des gènes *KCNJ2* et *KCNJ12* respectivement. Les souris KO pour le canal *Kir2.1* meurent quelques heures (entre 8 à 12 heures) après la naissance dû à une fente palatine (Figure 27), ce qui empêche l'animal de s'alimenter et de respirer correctement, alors que les souris KO pour le canal *Kir2.2* sont viables, fertiles et ne présentent aucune anomalie développementale (Zaritsky et al., 2000). En raison de la létalité de l'invalidation du gène *kcnj2*, les différentes études sur la souris KO *Kir2.1* ont été menées sur des nouveau-nés.

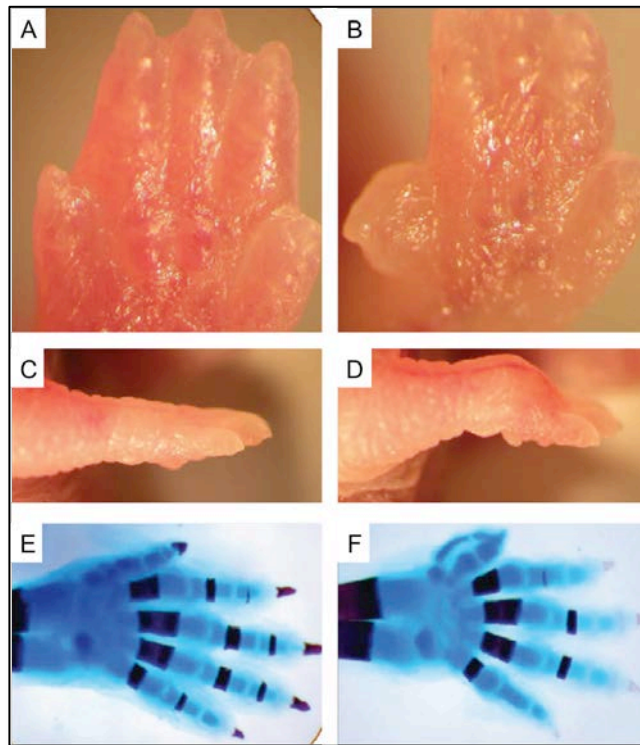


**Figure 27 : Les souris Ko pour le canal Kir2.1 présentent une fente palatine**

Les souris homozygotes pour le KO du canal Kir2.1 présentent une fente palatine (à droite) qui n'est jamais retrouvée chez les animaux hétérozygotes ou wild type. La mâchoire inférieure a été retirée pour une meilleure visibilité. (Adapté de Zaritsky, 2000).

Chez les souris KO pour le canal Kir2.1, aucun courant  $I_{K1}$  n'a été détecté lors d'études électrophysiologiques, signifiant que ce canal est le constituant majoritaire du courant  $I_{K1}$  (Zaritsky et al., 2001). Cependant, une réduction de 50% de ce courant a été observée chez les souris KO pour le canal Kir2.2, suggérant que dans le cœur, les canaux Kir2.1 et Kir2.2 s'assemblent en hétérotétramères fonctionnels afin de former le courant  $I_{K1}$ . La durée du potentiel d'action dans les myocytes ventriculaires est plus longue chez ces animaux, comparé à des souris contrôles. L'ECG des souris KO n'a révélé aucun battement cardiaque ectopique, indiquant que ces souris n'avaient aucune anomalie dans la stimulation cardiaque (Zaritsky et al., 2001).

La délétion du gène *kcnj2* chez la souris entraîne des défauts de développement similaires à ceux retrouvés chez les patients Andersen. En effet, ces souris présentent, en plus de la fente palatine, un os vomer de taille réduite. Cet os constitue la partie postéro-inférieure de la cloison nasale (Dahal et al., 2012). Des défauts de formation des pattes sont également retrouvés chez ces animaux (Figure 28), qui sont équivalents aux clinodactylies et syndactylies retrouvées chez les patients.



**Figure 28 : Les souris KO pour le canal Kir2.1 présentent des anomalies digitales.**

A-B : Patte antérieure d'une souris WT (A) et Kir2.1 KO (B), montrant les anomalies de développement.

C-D : Vue ventrale de la patte antérieure des souris WT (C) et Kir2.1 KO (D).

E-F : Coloration de la patte antérieure, montrant l'absence de phalanges sur certains doigts et une polydactylie pré-axiale chez les souris KO (F), comparé aux souris WT (E). (Adapté de Dahal, 2012).

L'ensemble des défauts développementaux associés avec la perte de fonction du canal Kir2.1 chez la souris n'est pas encore complètement caractérisé. De plus, la létalité des souris à la naissance, l'obligation d'invalider plusieurs gènes chez la drosophile, ou la variabilité phénotypiques entre les individus mutants chez le zebrafish démontrent la difficulté d'étude des conséquences fonctionnelles de la perte de fonction du canal Kir2.1 *in vivo*. Cependant, toutes les études *in vivo* démontrent une altération de la squelettogénèse, suggérant que la perte de fonction du canal Kir2.1 interfèrent avec l'ostéogénèse, pendant le développement embryonnaire.

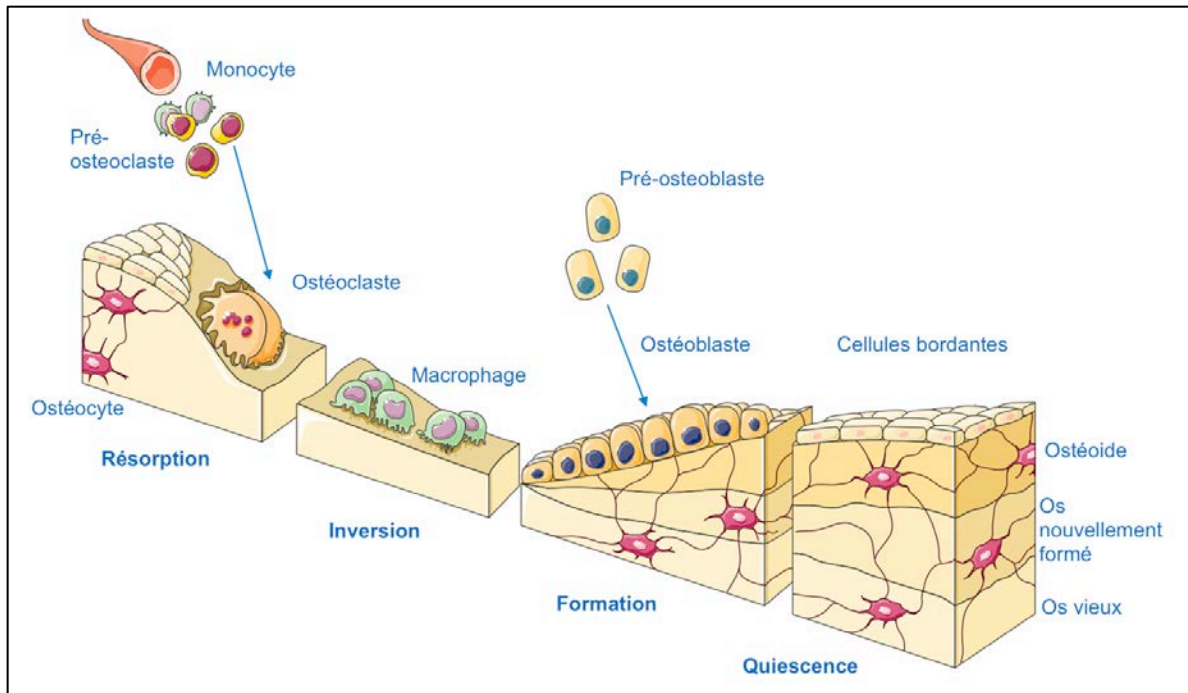
### III. Les tissus osseux et cartilagineux

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé aux mécanismes de formation de l'os et du cartilage, ainsi qu'au rôle du canal Kir2.1 dans ces processus. C'est pourquoi je

n'aborderai pas dans le détail le processus de remodelage osseux, faisant intervenir les ostéoclastes.

Le tissu osseux est d'une importance capitale pour l'organisme, tant sur le plan biomécanique que métabolique. Ce tissu hautement spécialisé est caractérisé par sa solidité, cependant il n'en est pas pour autant figé. Au contraire, le tissu osseux est en constant remodelage : il est constitué par les ostéoblastes issus de la différenciation des cellules souches mésenchymateuses (MSC), contrôlées par les ostéocytes, des ostéoblastes emprisonnés dans la matrice osseuse, et résorbé par les ostéoclastes provenant de la différenciation des monocytes issus de la circulation sanguine. Ce remodelage osseux est un processus physiologique, assurant en permanence le renouvellement de la matrice osseuse et dure environ trois mois chez l'homme adulte (Toppets, 2004).

Le remodelage osseux commence par le recrutement des monocytes à la surface de l'os. Cette phase d'activation est suivie par une phase de résorption, où les monocytes vont se différencier en ostéoclastes et résorber la matrice osseuse. Une fois la résorption terminée, les ostéoclastes ont formé une lacune de résorption et sont remplacés par des macrophages, dont le rôle est de lisser la lacune : c'est la phase d'inversion. Suite à cela, des cellules ostéoprogénitrices provenant de la moelle osseuse se différencient en ostéoblastes, qui vont combler la lacune de résorption avec une nouvelle matrice osseuse : c'est la phase de reconstruction ou de formation. Une fois ce processus terminé, les ostéoblastes rentrent soit en quiescence et deviennent des cellules bordantes, soit meurent par apoptose, ou s'enfouissent dans l'os et deviennent des ostéocytes (Figure 29 ; De Vernejoul and Marie, 1993; Eriksen, 2010).



**Figure 29 : Représentation schématique du cycle du remodelage osseux.**

Le long de la surface osseuse inactive recouverte de cellules bordantes, ou ostéoblastes quiescents, surviennent les précurseurs mononucléés des ostéoclastes. Cette phase d'activation est suivie de la phase de résorption lorsque les ostéoclastes résorbent l'os ancien. Lorsque les ostéoclastes ont terminé leur travail de résorption et creusé une lacune, ils sont remplacés par des macrophages ; c'est la phase d'inversion qui précède la phase de reconstruction ou ostéoformation ; les ostéoblastes surviennent alors dans la lacune et la comblent en apposant une nouvelle matrice osseuse. Certains ostéoblastes s'enfouissent dans la matrice qu'ils ont synthétisée et deviennent alors des ostéocytes.

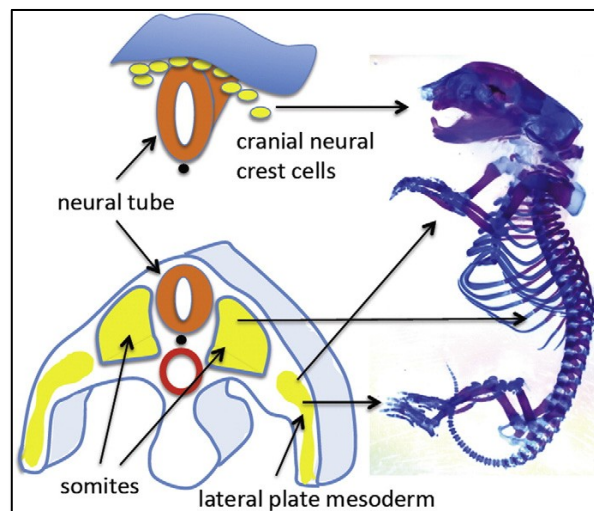
Le tissu cartilagineux est quant à lui un tissu conjonctif non vascularisé. Au cours de l'embryogenèse, ce tissu sert de support pour la formation du tissu osseux et constitue la plus grande partie du squelette. A l'âge adulte, ce tissu est très peu présent, et sert surtout de support au niveau des articulations. Le cartilage est constitué par les chondrocytes, cellules dérivées des cellules MSC, qui ont la capacité de sécréter une matrice extracellulaire.

### A. Le tissu osseux

Au cours de l'embryogenèse, la formation du squelette débute par la convergence et la condensation de cellules mésenchymateuses à l'endroit où les futures structures osseuses seront formées, formant des zones cellulaires de forte densité qui déterminent la forme et la taille du futur os (Hall and Miyake, 1992).



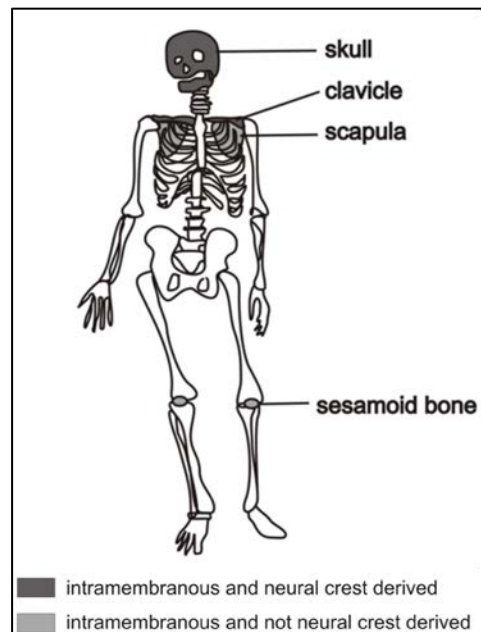
Trois régions de l'embryon vont être à l'origine du squelette. Le squelette appendiculaire (membres) dérive du mésoderme de la plaque latérale, le squelette axial (colonne vertébrale et cage thoracique) provient des somites et le squelette cranio-facial est majoritairement formé par des cellules originaires de la crête neurale (Figure 30 ; (Karsenty, 1998). La morphogenèse de tous ces éléments nécessite des séquences d'événements précises, qui mettent en jeu la prolifération, la différenciation, la migration cellulaire et l'apoptose (Zelzer and Olsen, 2003).



**Figure 30 : Diagramme illustrant la contribution de la crête neurale, des somites et du mésoderme de la plaque latérale, pour la squelettogenèse.**

(Adapté de Berendsen, 2015)

Deux mécanismes distincts permettent la formation de l'os. Les os plats, comme ceux du crâne ou la partie latérale des clavicules, se forment selon un processus appelé ossification directe ou intramembranaire tandis que tout le squelette appendiculaire (os longs des membres), et le squelette axial, se forment selon un processus d'ossification endochondrale, processus d'ossification majeurs chez les vertébrés supérieurs (Ducy, 2001; Toppets, 2004). Les origines embryonnaires des cellules semblent être importantes pour leur processus d'ossification. En effet, les cellules issues de la crête neurale subissent un processus d'ossification directe tandis que les cellules dérivées du mésoderme subissent un processus d'ossification endochondrale (Figure 31 ; (Franz-Odenaal, 2011).



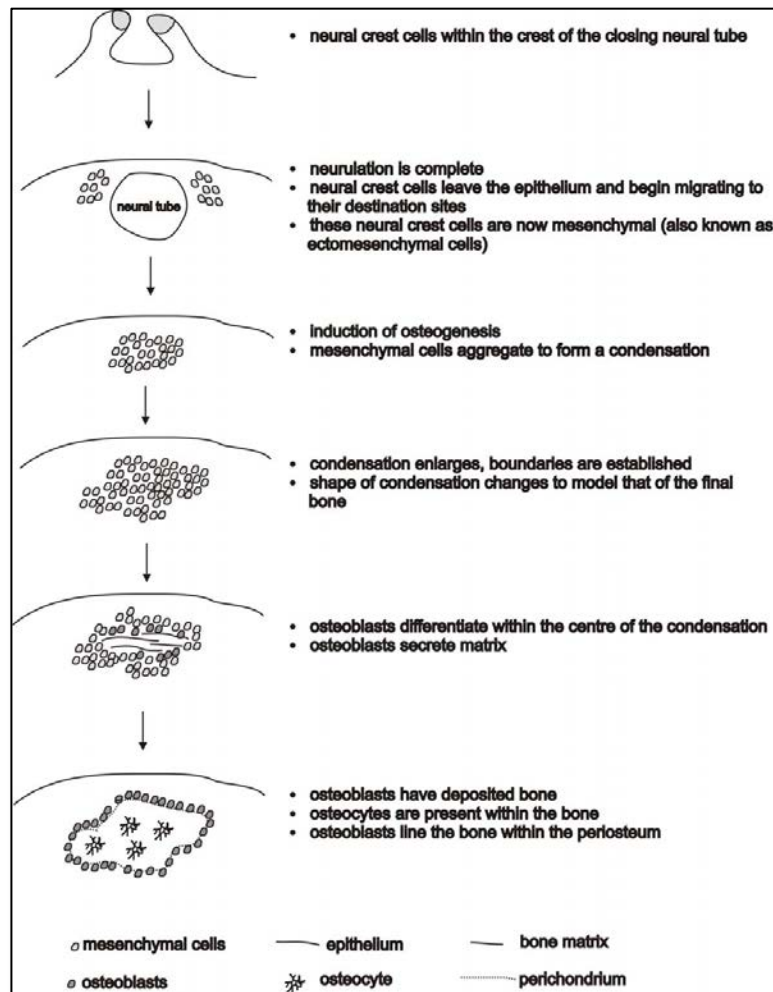
**Figure 31 : Représentation schématique des os formés par ossification directe et dérivés de la crête neurale chez l'homme.**

(Adapté de Franz-Obendaal, 2011)

Les deux processus d'ossification sont contrôlés par l'action de nombreux facteurs de croissance, dont l'absence se traduit par une altération du squelette.

### 1. L'ossification intra-membranaire ou directe.

Le mécanisme d'ossification directe est similaire entre les os, peu importe leur origine embryonnaire. Lors de ce processus, l'élaboration du tissu osseux se fait directement à partir des tissus mésenchymateux environnants. Les cellules mésenchymateuses prolifèrent d'abord au sein de la condensation puis se différencient *in situ* en ostéoblastes (Figure 32).



**Figure 32 : Représentation schématique des différentes étapes de l'ossification directe**

(D'après Franz-Obendaal, 2011)

L'ossification directe passe par trois phases : l'induction des cellules dans le lignage ostéogénique, la formation des condensations et la différenciation des cellules. La production de la matrice osseuse intervient lorsque toutes ces étapes sont franchies (Franz-Obendaal, 2011).

Les cellules de la crête neurale s'engagent dans le lignage ostéogénique pendant leur migration sur le site de formation de l'os (Figure 32). Une fois arrivée à leur destination finale, une interaction entre l'épithélium et le mésenchyme provoque l'induction du lignage ostéogénique. Ce processus requiert une signalisation entre les cellules mésenchymateuses et les cellules épithéliales afin de former l'ébauche du squelette (Helms et al., 2005). Une fois les cellules engagées dans le lignage ostéogénique, les interactions avec l'épithélium ne sont plus requises.

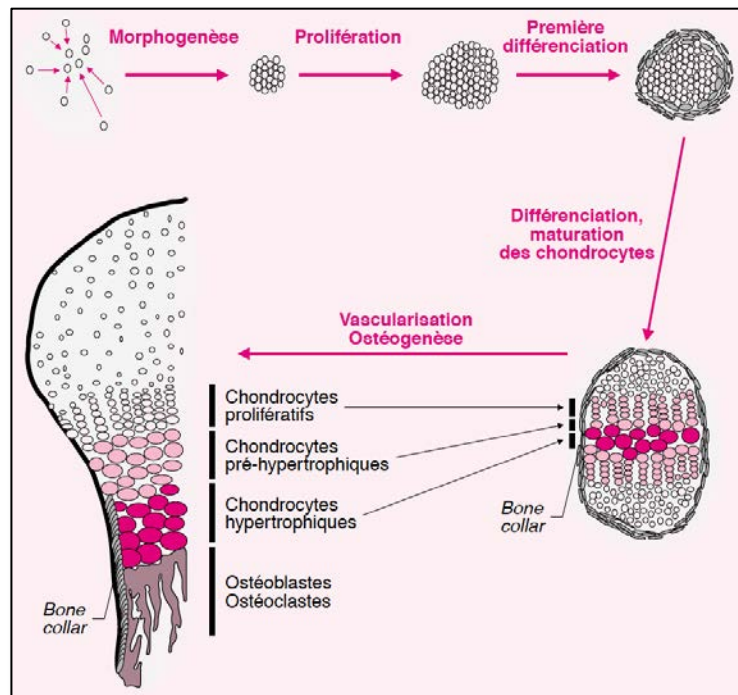
Les cellules mésenchymateuses s'agrègent ensuite pour former une condensation squelettogénique (Figure 32). Cette condensation requiert une augmentation du nombre de cellules au sein de la condensation ou une diminution du nombre de cellules environnantes (Franz-Odendaal, 2011). Des études ont montré que la migration de cellules vers le centre ou l'absence de sorties des cellules de la condensation était responsable de sa formation, plutôt qu'une altération de la prolifération cellulaire, de l'apoptose ou du cycle cellulaire (Franz-Odendaal, 2008)

Pour engager la différenciation, les condensations doivent atteindre une taille critique. Cette différenciation requiert d'une part la régulation négative (down-regulation) de gènes associés avec l'adhésion, la migration et la prolifération ; et d'autre part la régulation positive (up-regulation) de gènes associés avec la différenciation osseuse (Franz-Odendaal, 2011).

En résumé, la condensation est une étape critique dans l'ostéogenèse, responsable de la structuration du squelette et nécessaire à la différenciation des cellules. Une fois les condensations formées, les cellules MSC se différencient *in situ* en ostéoblastes, et sécrètent de la matrice osseuse.

## 2. L'ossification endochondrale

L'élaboration du tissu osseux commence par une ébauche cartilagineuse qui se calcifie et sera progressivement détruite pour être remplacée par du tissu osseux (Ducy, 2001; Toppets, 2004). Les étapes d'ossification sont identiques entre l'ossification endochondrale et directe. En effet, les cellules migrent dans un premier temps vers la zone où le futur os sera formé, prolifèrent et se condensent (Figure 32). Cependant, contrairement à l'ossification intra-membranaire, le développement endochondral nécessite des étapes supplémentaires dont le déroulement est contrôlé au niveau génétique, cellulaire et tissulaire (Figure 33).



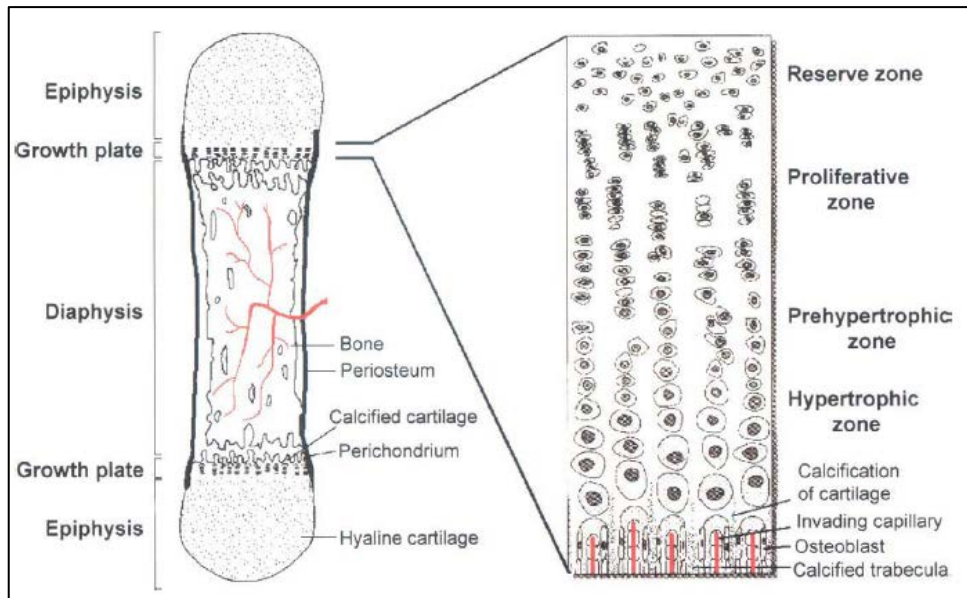
**Figure 33 : Représentation schématique des différentes étapes l'ossification endochondrale**

Les cellules mésenchymateuse après prolifération se différencient d'abord en chondrocytes. S'en suit une phase de maturation pendant laquelle les chondrocytes prolifèrent et deviennent hypertrophiques. Ils secrètent alors une matrice cartilagineuse qui après vascularisation est résorbé par les ostéoclastes. Les cellules de la périphérie ou du « bone collar » se différencient alors en ostéoblastes et remplace la matrice cartilagineuse par une matrice osseuse. (D'après Ducey, 2001).

L'ossification endochondrale passe également par trois phases : production d'un modèle cartilagineux, formation de chondrocytes hypertrophique et mise en place de la plaque de croissance, vascularisation et résorption du modèle cartilagineux.

Après une étape de prolifération, les cellules mésenchymateuses de chaque condensation vont se différencier en fonction de leur position (Figure 33) : ce sont les cellules périphériques et les cellules centrales. En périphérie, elles vont prendre un aspect allongé et s'organiser en plusieurs couches serrées. Cette structure lamellaire sera à l'origine du périchondre (tissu conjonctif formé de fibroblastes et d'un réseau dense de fibres de collagène) et de la structure primitive entourant la région médiane des futurs os, appelé le *bone collar* (dont les cellules se différencieront ultérieurement en ostéoblastes). A l'inverse, les cellules du centre de la condensation vont s'arrondir et s'entourer d'une matrice abondante, riche en protéoglycans et en collagène de type II, caractéristique d'une différenciation en chondrocyte (Ducey, 2001).

Une fois les chondrocytes formés, une organisation spatiale particulière se met en place : c'est la plaque de croissance, une suture cartilagineuse qui persistera jusqu'à la puberté chez l'homme et dont la fonction est primordiale pour la croissance des os longs (Figure 34).



**Figure 34 : Représentation schématique de l'organisation de la plaque de croissance chez les mammifères**

(D'après Karaplis, 2002)

La plaque de croissance est divisée en quatre zones fonctionnelles. Dans la zone de réserve, les chondrocytes vont proliférer, formant des colonnes de cellules juxtaposées, appelée la zone proliférative (Figure 34). Les cellules situées à la partie inférieure des colonnes vont ensuite s'élargir et leur production de collagène II diminue, remplacée par du collagène de type X. Ces cellules forment la zone préhypertrophique. Après maturation, ces chondrocytes deviennent hypertrophiques (Ducy, 2001; Karaplis, 2002). Ces chondrocytes vont ensuite entrer en apoptose, ce qui forme des lacunes, qui serviront à la différenciation en ostéoblastes des cellules mésenchymateuses (Karaplis, 2002).

Une fois leur maturation achevée, les chondrocytes sont emprisonnés dans une matrice calcifiée enrichie en collagène X. Ils vont également sécréter du Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), qui est un angiogène permettant la vascularisation.

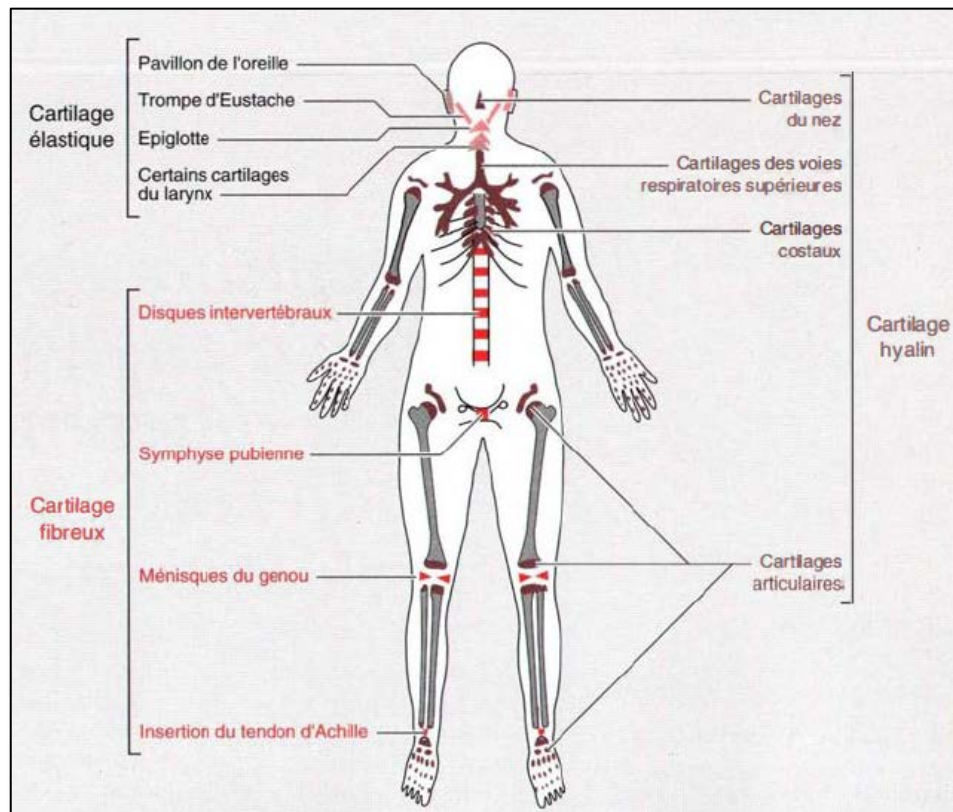
Ainsi, de nouveaux vaisseaux sanguins envahissent la partie basse de la zone hypertrophique, ce qui permet la migration des ostéoclastes, cellules d'origine myéloïdes, dont la fonction est de résorber la matrice osseuse ou cartilagineuse. La vascularisation permet également l'arrivée de cellules mésenchymateuses de la moelle osseuse, qui se différencieront en ostéoblastes et vont produire une matrice osseuse, à la place de la matrice cartilagineuse (Ducy, 2001; Karaplis, 2002).

## **B. Le tissu cartilagineux**

Le tissu cartilagineux est un tissu conjonctif dépourvu de nerfs et de vaisseaux sanguins : l'apport nutritif se fait à partir du péricondre, un tissu conjonctif vascularisé entourant le cartilage, et à partir du liquide synovial pour le cartilage articulaire. Il est composé de cellules, les chondrocytes, et d'une matrice extracellulaire (MEC) non minéralisée et très hydratée (Mallein-Gerin and Van der Rest, 1996). La MEC est composée principalement par les collagènes de type II, IX, XI pour les chondrocytes articulaires, et de collagène X pour les chondrocytes hypertrophiques. En plus de ces fibres de collagène, la MEC contient également des protéoglycans, chargés négativement, tels que l'agrécane, ainsi que des protéines non collagéniques telles que COMP (Cartilage Oligomeric Matrix Protein). Leur rôle sera abordé plus loin dans ce manuscrit.

Chez l'homme adulte, il existe trois types de cartilage, selon la nature de leur MEC : le cartilage hyalin, fibreux et élastique (Figure 35 ; Bruckner and van der Rest, 1994).





**Figure 35 : Topographie du cartilage chez l'homme adulte**

(D'après Mallein-Gerin, 1996)

Le cartilage hyalin est le plus abondant, et est constitué d'une MEC riche en protéoglycans et en fibres de collagènes. Dans ce tissu, les fibres de collagènes, très élastique, s'opposent à la grande pression osmotique due à la charge négative des protéoglycans, pour former un système biologique amortisseur de choc au niveau des articulations (Van der Rest, 1987). Le fibrocartilage ou cartilage fibreux est un intermédiaire entre le tissu conjonctif et le cartilage hyalin. Il est riche en fibre de collagène qui lui confère une très grande résistance aux tractions et compressions et constitue ainsi les zones d'insertion de certains tendons et disques intervertébraux (Hall, 2014). Le cartilage élastique est caractérisé par la présence de fibre élastique et constitue, par exemple, le pavillon de l'oreille (Figure 35).

Au cours du développement embryonnaire, le tissu cartilagineux joue un rôle majeur. En effet, le squelette embryonnaire est composé majoritairement de cartilage. Après la naissance, ce cartilage se trouve restreint au niveau de la plaque de croissance des os longs, pour permettre la croissance de l'individu. Cette plaque de croissance est résorbée après l'adolescence, lorsque la croissance s'arrête. Enfin, à l'âge adulte, le



cartilage est très peu représenté, et sert de support pour les os, au niveau des articulations.

Le cartilage est composé exclusivement par les chondrocytes, qui dérivent des cellules mésenchymateuses. Cette différenciation se traduit par l'expression de protéines spécifiques comme le collagène de type II ou le protéoglycan Agrecan. Ce phénotype est maintenu de façon stable dans les cartilages permanents, comme le cartilage articulaire. Lors de l'ossification endochondrale, les chondrocytes acquièrent un phénotype hypertrophique, caractérisé par l'expression du collagène de type X, avant d'être remplacés par les oséoblastes. Ce processus de différenciation sera abordé dans le détail plus loin dans ce manuscrit. La formation du squelette est donc un processus complexe, faisant intervenir différents types cellulaires, chacun ayant un rôle bien précis dans l'ostéogenèse. Le cartilage joue également un rôle central au cours du développement osseux, en formant l'ébauche des os, lors de l'ossification endochondrale.

### C. Acteurs de l'ostéogenèse

Le tissu osseux est en constante évolution au cours de la vie d'un individu. En effet, ce tissu contient différents types de cellules qui participent activement à son homéostasie et à son remodelage. Au sein du tissu osseux adulte, on distingue principalement trois types cellulaires différents : les cellules mésenchymateuses, qui vont se différencier en ostéoblastes, et les ostéoclastes, issus de la différenciation de monocytes.

Le tissu cartilagineux quant à lui, a un rôle de support au sein de l'organisme adulte. Il est composé de chondrocytes, qui vont former la matrice cartilagineuse. Ces chondrocytes sont également dérivés de cellules mésenchymateuses.

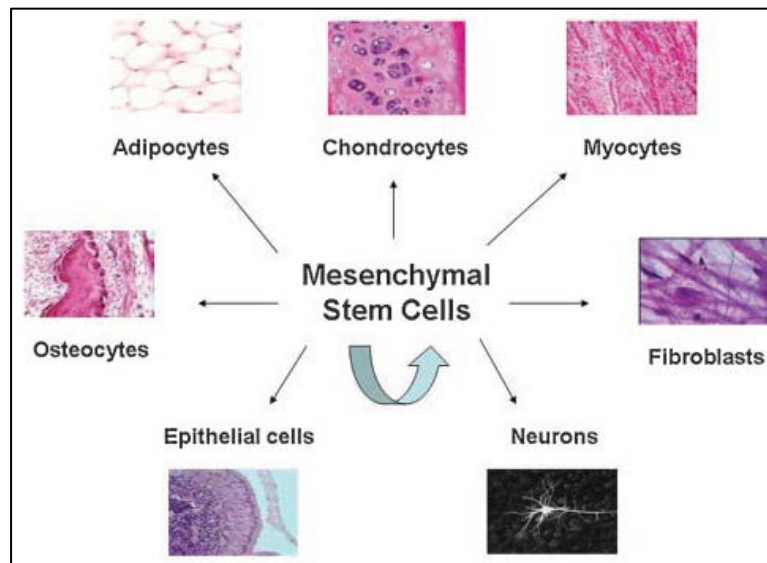
#### 1. Cellules Souches Mésenchymateuses (MSC)

Dans la littérature, les MSC sont appelées soit cellules stromales mésenchymateuses soit cellules souches mésenchymateuses, car leur caractéristique souche est encore controversée. Dans ce manuscrit, je les nommerai cellules souches mésenchymateuse ou MSC.

Les MSC ont été décrites pour la première fois en 1966 (Friedenstein et al., 1966). Ces cellules, dérivées de la moelle osseuse de souris, étaient clonales, adhérentes au plastique et capables de se différencier en ostéoblastes, adipocytes et chondrocytes.

Depuis, ces cellules MSC furent isolées de nombreux tissus tels que le tissu adipeux, la membrane synovial, le muscle squelettique, le derme, les os, le sang de cordon ombilical, le foie, la rate... (Bianco et al., 2008; Chen et al., 2006; Mimeault and Batra, 2008). Les MSC isolées des différents tissus présentent des caractéristiques phénotypiques similaires. Cependant, *in vitro*, elles montrent différentes propensions à proliférer ou à se différencier, en réponse à la stimulation par des facteurs de croissance (Liu et al., 2009). Les MSC isolées des différents tissus pourraient ne pas être les mêmes cellules, même si elles sont similaires.

Les MSC sont des cellules d'aspect fibroblastique, aujourd'hui caractérisées par un panel de marqueurs, ainsi que leur capacité de différenciation. Les critères minimaux afin de qualifier une population cellulaire de MSC sont l'adhésion au plastique *in vitro*, l'expression des marqueurs CD90, CD73 et CD105 dans plus de 95% de la population et une expression des marqueurs hématopoïétiques CD34, CD45, CD14, CD11b, et HLA-DR dans maximum 5% de la population et enfin, une capacité de différenciation en cellules osseuses (ostéoblastes), cartilagineuses (chondrocytes) et graisseuses (adipocytes) (Dominici et al., 2006). Ainsi, les cellules MSC seraient les précurseurs des cellules du lignage mésodermique, de par leur capacité à se différencier en ostéoblastes, adipocytes, chondrocytes, myocytes, cardiomyocytes mais également de cellules d'origines non-mésodermiques, telles que des hépatocytes, cellules  $\beta$  pancréatiques ou neurones (Jiang et al., 2002). Les MSC sont caractérisées par leur capacité d'auto-renouvellement (prolifération sans se différencier), car elles prolifèrent de façon clonale, et leur capacité à se différencier en plusieurs types de cellules (Figure 36).



**Figure 36 : Les cellules MSC sont capables de se différencier en cellules d'origine mésodermique mais également non-mésodermique.**

(D'après Liu, 2009).

Les cellules MSC ont donc un rôle primordial au sein de l'organisme car d'une part ces cellules ont, dans la moelle osseuse, un rôle très important dans la création de la niche des cellules souches hématopoïétiques en favorisant le développement et la différenciation du système lympho-hématopoïétique par la sécrétion de facteurs de croissance, de cytokines et de matrices extracellulaires particulières (Haynesworth et al., 1996), et d'autre part, elles participent à l'homéostasie tissulaire, en étant les précurseurs de nombreux types cellulaires, notamment des cellules osseuses.

## 2. Ostéoblastes et ostéocytes

### a) Généralités sur les ostéoblastes et les ostéocytes

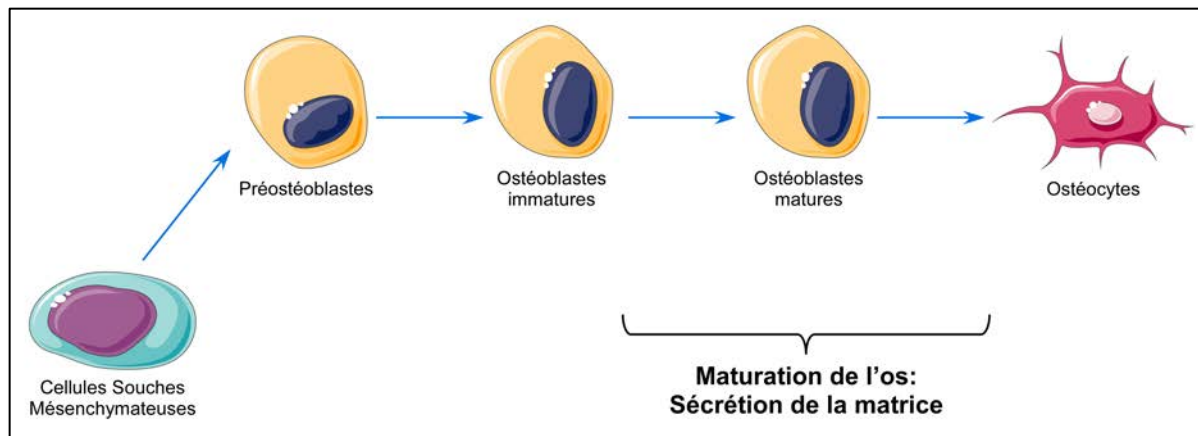
Les ostéoblastes dérivent des cellules mésenchymateuses appelées cellules ostéoprogénitrices. Les ostéoblastes sont des cellules mononuclées, situés à la surface du tissu osseux et dont l'activité principale est de synthétiser la matrice osseuse. La matrice osseuse est une matrice extracellulaire, composée d'une phase organique (22%), inorganique (69%) et d'eau (9%) (Toppets, 2004).

La matrice organique forme l'ostéoïde et est principalement constituée de collagène de type I dont le rôle est structural, mais également d'autres protéines, comme

l'ostéopontine, dont le rôle est d'inhiber la formation de la matrice inorganique, l'ostéocalcine, qui permet la liaison avec la matrice inorganique ou l'ostéonectine, qui permet de fixer le calcium et d'initier la minéralisation (Toppets, 2004). La matrice organique forme un réseau fibreux, qui favorise la minéralisation, par fixation de la matrice inorganique. La matrice inorganique est composée de calcium et d'hydroxyde de phosphate, qui précipitent pour former des cristaux d'hydroxyapatite. Cette matrice inorganique se forme sur l'ostéoïde et permet de rigidifier et de solidifier l'os (Toppets, 2004). Les cristaux d'hydroxyapatite se fixent entre les fibres de collagène, assurant ainsi la minéralisation de l'os.

Les ostéoblastes ont pour rôle la sécrétion de la matrice organique et inorganique. De plus, ils peuvent également réguler la fonction des ostéoclastes (Caetano-Lopes et al., 2007). Au cours de leur différenciation et maturation, les ostéoblastes acquièrent la capacité à synthétiser la matrice osseuse. Après différenciation, certains ostéoblastes sont emprisonnés dans la matrice qu'ils ont produite, et deviennent des ostéocytes, arrêtant de produire de l'ostéoïde (Mackie, 2003). Les ostéocytes sont les cellules les plus abondantes de l'os, et ont un rôle de coordinateur au sein du tissu osseux. En effet, les ostéocytes sont capables d'induire la formation de matrice par les ostéoblastes mais également la résorption de cette matrice par les ostéoclastes.

La différenciation des cellules mésenchymateuses en ostéoblastes est un processus nécessitant plusieurs étapes avant d'arriver à un ostéoblaste mature, capable de sécréter de la matrice osseuse. Ainsi, les cellules mésenchymateuses se différencient d'abord en préostéoblastes, et commencent à produire la matrice organique. Les préostéoblastes se différencient ensuite en ostéoblastes immatures, qui sécrètent aussi la matrice organique. Enfin, les ostéoblastes deviennent matures et sécrètent la matrice inorganique, avant de devenir des ostéocytes (Figure 37).



**Figure 37 : La différenciation des MSC en ostéoblastes nécessite plusieurs étapes.**

La différenciation des cellules MSC en ostéoblastes est sous le contrôle du facteur de transcription RUNX2 (Bruderer et al., 2014; Ducky et al., 1997; Komori, 2010; Komori et al., 1997). Ce facteur de transcription appartient à la famille des runt-related transcription factor ou RUNX (van Wijnen et al., 2004). La famille RUNX est composée de trois membres chez les mammifères : RUNX1 (CBFA2), RUNX2 (CBFA1) et RUNX3 (CBFA3). RUNX1 est nécessaire pour l'hématopoïèse, tandis que RUNX3 est important pour la neurogenèse (Wang et al., 1996). RUNX2 quant à lui est essentiel à la formation du tissu osseux (Ducky et al., 1997; Komori et al., 1997).

### **b) Le facteur de transcription RUNX2**

Le facteur de transcription RUNX2, comme tous les RUNX, est une protéine composée d'une sous unité  $\alpha$ , qui peut s'hétéro-dimériser avec un cofacteur  $\beta$ . La sous-unité  $\alpha$  est codée par le gène *Cbfa1* ou *PEBP2  $\alpha A$* , et est capable de se fixer à l'ADN et au cofacteur  $\beta$ , *via* le domaine Runt, tandis que le cofacteur  $\beta$  est codé par le gène core binding factor  $\beta$  (*CBF $\beta$*  ou *PEBP2 $\beta$* ), et participe à la stabilisation de la liaison entre la sous-unité  $\alpha$  et l'ADN mais empêche également la dégradation de RUNX2 par le protéasome (Golling et al., 1996; Ogawa et al., 1993a).

Il existe deux isoformes de la protéine RUNX2. En effet, on distingue deux promoteurs sur le gène, conduisant à la transcription de deux ARNm : un promoteur distal appelé P1, codant pour l'isoforme type II et un promoteur proximal P2 codant pour l'isoforme type I. Les régions 3' des ARNm des deux isoformes de RUNX2 sont

identiques alors que leurs régions 5' sont différentes. L'isoforme de type I est exprimé dans très peu de types cellulaires, notamment le thymus, les lymphocytes T, les ostéoblastes et les chondrocytes (Enomoto et al., 2000; Harada et al., 1999; Ogawa et al., 1993b; Satake et al., 1995) tandis que l'ARNm du *RUNX2* de type II majoritairement retrouvé dans les ostéoblastes (Banerjee et al., 2001). Les deux isoformes de *RUNX2* ont des fonctions similaires, mais diffèrent par leur dépendance au co-facteur CBF $\beta$ . En effet, en absence de ce cofacteur, l'isoforme *RUNX2* de type I est moins efficace que l'isoforme de type II (Kanatani et al., 2006).

#### (1) Régulation du facteur de transcription *RUNX2*

Au cours de la différenciation ostéoblastique, l'expression de *RUNX2* est finement régulée. En effet, *RUNX2* est fortement exprimé dans les préostéoblastes et les ostéoblastes immatures, son expression est réduite dans les ostéoblastes matures et il est indétectable dans les ostéocytes (Liu et al., 2001). La régulation de l'expression de *RUNX2* peut se faire au niveau transcriptionnel ou post-traductionnel.

##### (a) Régulation transcriptionnelle

L'analyse de la séquence du promoteur de *RUNX2* a révélé l'existence de sites de liaison de plusieurs facteurs de transcription. Ainsi, le promoteur proximal P2 de *RUNX2* contient deux sites de fixation pour l'activator protein-1 (AP-1), et six séquences OSE2 (osteoblast-specific element 2). Le promoteur distal P1 contient, en plus, trois sites de fixation pour AP-1, un site de fixation pour le nuclear factor 1 (NF1) (Tou et al., 2003). Le facteur de transcription AP-1 est un complexe homo- ou hétérodimérique, composé de protéines de la famille des Jun, Fos, ATF (activating transcription factor) et MAF (musculoaponeurotic fibrosarcoma). En plus de ces sites de fixation, le promoteur de *RUNX2* contient un site de liaison pour le facteur de transcription C/EBP (CCAAT-enhancer-binding proteins), et un site consensus de fixation des protéines Smad (Tou et al., 2003).

Ces différents facteurs de transcription sont capables de réguler l'expression de *RUNX2*, soit en augmentant sa transcription ou en l'inhibant. La fixation du complexe JunD/FosB AP-1 sur son site de liaison augmente l'activité du promoteur de *RUNX2* et donc sa transcription (Zambotti et al., 2002). A l'inverse, la fixation du facteur de

transcription NF1-A, présent dans les cellules non ostéoblastiques, a un effet inhibiteur sur la transcription de *RUNX2* (Zambotti et al., 2002). L'expression de *RUNX2* est augmentée par les protéines Smad1 et Smad5. Ces protéines participent à la signalisation *via* le BMP, et seront abordées plus tard dans ce manuscrit. La protéine Dlx5 est également capable de réguler l'expression de *RUNX2*, en réponse au BMP (Lee et al., 2005). Dlx5 est un facteur de transcription à homéodomaine, dont l'absence provoque une inhibition de la différenciation osseuse, et des anomalies de développement (Ulsamer et al., 2008).

Enfin, des facteurs de transcription ont un effet sur l'expression de *RUNX2*, mais aucune étude n'a montré l'interaction directe entre ces facteurs et le promoteur de *RUNX2*. C'est le cas pour la protéine à homéodomaine HOXA-2, qui a un effet inhibiteur, NKX3-2 ou Msx2, qui ont un effet stimulateur (Kanzler et al., 1998; Satokata et al., 2000; Tribioli and Lufkin, 1999).

*RUNX2* est également capable de s'autoréguler. En effet, il peut se fixer sur les sites OSE2 présents sur son promoteur. Cependant, l'effet de cette autorégulation sur l'expression de *RUNX2* n'est pas encore bien connu. En effet, la surexpression de *RUNX2* dans des cellules fibroblastiques de souris NIH3T3 provoque une régulation négative de l'activité du promoteur de *RUNX2* (Drissi et al., 2000) tandis que d'autres études ont montré que *RUNX2* est capable d'augmenter l'activité de son promoteur, en réponse au BMP7 (Tou et al., 2003).

#### (b) Régulation post-traductionnelle

En plus de sa régulation transcriptionnelle, le facteur de transcription *RUNX2* peut également être régulé par des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, l'acétylation ou l'ubiquitination.

La phosphorylation consiste en l'ajout d'un groupement phosphate sur la chaîne latérale des acides aminés Sérine, Thréonine ou Tyrosine de n'importe quelle protéine, ce qui leur confère une charge négative et provoque généralement un changement de conformation. Cet ajout est dû à l'activité des kinases, tandis que les phosphatases permettent la déphosphorylation (Cohen, 1988; Pearlman et al., 2011).

La phosphorylation de *RUNX2* se fait dans le noyau et est généralement régulée par la voie de signalisation ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase)/MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase). Il y a quatre membres de la famille MAPK : ERK1/2, JNK (c-

Jun N-terminal kinase), p38 et ERK5 (Sinha and Zhou, 2013). Cette phosphorylation par la voie ERK/MAPK permet de réguler l'activité de RUNX2, soit en l'activant soit en l'inhibant. Par exemple, la phosphorylation de RUNX2 par ERK1 sur les sérines en position 301 et 319 stimule l'expression des gènes ostéogéniques, en augmentant son activité transcriptionnelle (Ge et al., 2009). Récemment, une étude a montré que la phosphorylation de RUNX2 par JNK1 sur la sérine 104 avait un effet inhibiteur de l'activité de RUNX2, en empêchant l'interaction entre RUNX2 et CBF $\beta$  (Huang et al., 2012).

La phosphorylation par la voie MAPK est la principale responsable de la phosphorylation de RUNX2 mais d'autres protéines en sont également capables. En effet, RUNX2 comprend de nombreux sites de phosphorylation, qui peut avoir un effet inhibiteur ou activateur. La phosphorylation de RUNX2 par la GSK3 $\beta$  (Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$ ) bloque son activité, par ajout d'un groupement phosphate au niveau des Sérines 369, 373 et 377 (Kugimiya et al., 2007). La PKA (Protein Kinase A dépendante de l'AMP cyclique), à l'inverse, augmente l'activité de RUNX2, *via* la phosphorylation sur la sérine 347 (Selvamurugan, 2000). La phosphorylation de RUNX2 est donc essentielle à la modulation de son activité, en fonction du site concerné.

D'autres modifications post-traductionnelles ont un rôle dans la régulation de RUNX2. L'acétylation permet l'ajout d'un groupe acétyle sur des lysines dans une protéine, et elle a un rôle extrêmement important dans la régulation de la structure de la chromatine et l'expression des gènes en général. L'acétylation est un mécanisme de régulation post-traductionnelle qui permet de moduler l'activité des histones, des facteurs de transcription ainsi que d'autres protéines (Yang, 2004).

L'acétylation est faite par les protéines de la famille des lysine acétyltransferases dont font partie les HAT (Histone Acetyl Transferase), tandis que la déacétylation se fait par les protéines HDAC (Histone DeAcetylase). Les protéines HAT ont la capacité d'interagir avec RUNX2, pour réguler son activité. En effet, la protéine p300, qui possède un domaine HAT intrinsèque, permet l'acétylation de RUNX2, *via* la signalisation MAPK, ce qui augmente son activité et sa stabilité, en réponse au BMP2 (Jeon et al., 2006).

La régulation de RUNX2 passe aussi par sa dégradation. L'ubiquitination des protéines joue un rôle majeur dans leur dégradation par le protéasome (Hershko and Ciechanover, 1998). Cette dégradation se fait par une cascade de signalisation orchestrée par les enzymes E1 ubiquitin-activating, E2 ubiquitin-conjugating et E3



ubiquitin-ligase. Les E3 ubiquitin ligases permettent la spécificité de l'ubiquitination sur les protéines et celles qui sont polyubiquitinées sont adressées au protéasome pour leur dégradation (Hershko and Ciechanover, 1998). Des E3 ubiquitin ligases telles que Smurf1 (Smad Regulatory Factor 1) ou WWP1 permettent l'ubiquitination de RUNX2 et son adressage au protéasome, où il sera dégradé (Vimalraj et al., 2015).

La régulation de l'expression ou de l'activité de RUNX2 est donc complexe. En effet, outre leurs effets individuels, ces différents processus sont interconnectés, afin de réguler l'activité de RUNX2 la plus finement possible. Ainsi, la surexpression de Smurf1 dans les ostéoblastes inhibe leur différenciation, par l'inhibition de la signalisation BMP (Zhao et al., 2003, 2004). Le BMP2 stimule l'acétylation par p300 de RUNX2, ce qui inhibe sa dégradation dépendante de Smurf1. Les protéines HDAC4/5 peuvent déacétyler RUNX2, ce qui le rend vulnérable à son ubiquitination par Smurf1 (Jeon et al., 2006). Enfin, la phosphorylation de RUNX2 par la signalisation ERK/MPAK sur la sérine 294 augmente son acétylation, ce qui augmente l'activité transcriptionnelle de RUNX2 et inhibe sa dégradation par l'ubiquitination (Park et al., 2010).

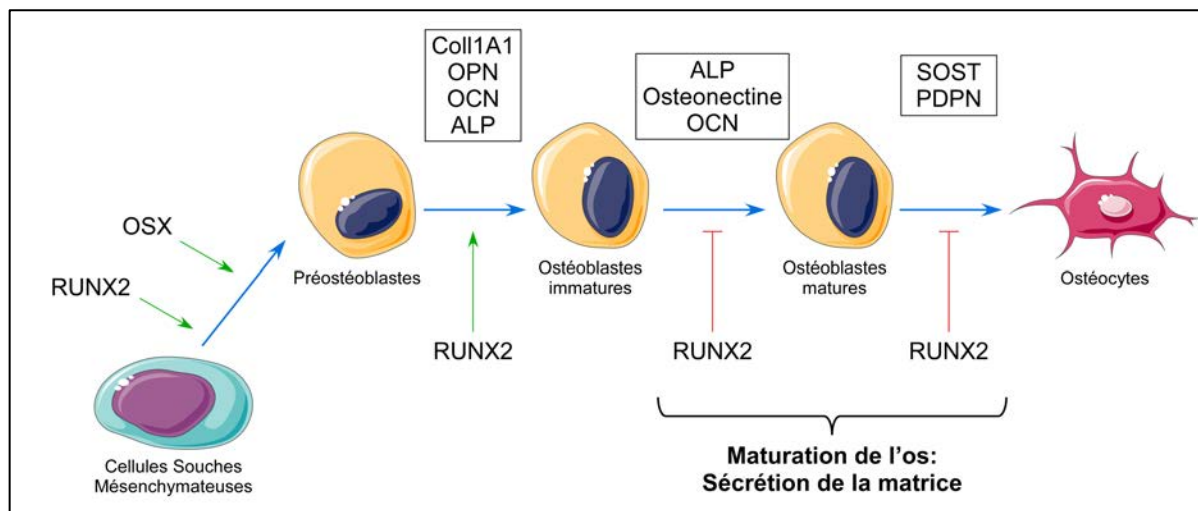
## (2) Rôle physiologique

Le facteur de transcription RUNX2 joue un rôle essentiel au cours de la formation du tissu osseux, et la différenciation des ostéoblastes. En effet, les souris KO pour *RUNX2* meurent à la naissance, et présentent une absence d'ossification directe et endochondrale, due à une absence de différenciation des ostéoblastes, ainsi qu'un retard dans la différenciation des chondrocytes (Komori et al., 1997; Otto et al., 1997).

La délétion de *RUNX2* entraîne une absence d'expression des gènes impliqués dans la différenciation des ostéoblastes et la formation de la matrice osseuse. Cette absence d'expression a permis de montrer que RUNX2 est capable d'induire l'expression de gènes cibles en se fixant sur une séquence particulière du promoteur, appelée l'Osteoblasts Specific Element 2 (OSE2) (Ducy, 2000; Vimalraj et al., 2015). Cette séquence a été retrouvée sur de très nombreux gènes impliqués dans la différenciation ostéoblastique et la production de la matrice extracellulaire tels que l'ostéocalcine (*OCN*), l'ostéopontine (*OPN*), le collagène 1A1 (*Coll1A1*) ou encore le récepteur de type I au TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ) (Ducy et al., 1997; Ji et al., 1998); mais également la différenciation chondrocytaire tels que le Collagène de type X (*CollX*) ou le *VEGF* (Li et al., 2011; Zelzer et al., 2001). Enfin, cette séquence OSE2 a été retrouvée sur

le promoteur de l'ostéoprotégerine, un inhibiteur de la différenciation ostéoclastique, mais également sur celui du RANKL (Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand), un activateur de la différenciation ostéoclastique (Geoffroy et al., 2002; Kitazawa et al., 1999).

Le facteur de transcription RUNX2 est donc considéré comme le « master gene » de la différenciation ostéoblastique. En effet, RUNX2 est essentiel au début de la différenciation ostéoblastique, afin d'engager les cellules MSC dans le lignage ostéogénique et d'initier la transcription des gènes impliqués dans la production de la matrice organique, et son absence conduit à une absence de squelette (Figure 38).



**Figure 38 : Régulation de la différenciation ostéoblastique par RUNX2**

Pendant le processus de différenciation, RUNX2 est crucial pour l'engagement des cellules MSC dans le lignage osseux et permet la transcription des gènes impliqués dans la production de la matrice osseuse, tels que OPN, OCN, Coll1A1. L'expression de RUNX2 est ensuite down régulée, pour que les ostéoblastes puissent devenir matures.

Le facteur de transcription Ostérix (OSX) intervient juste après l'expression de RUNX2 dans les condensations mésenchymateuse. OSX coordonne son action avec RUNX2 pour augmenter le processus de différenciation.

L'expression de RUNX2 au cours l'ostéoblastogénèse est régulée en fonction du stade de la différenciation. Au début de la différenciation, RUNX2 active la transcription des gènes essentiels au développement de l'os et donc son expression est forte, tandis qu'à des phases de différenciation plus tardive, l'expression de RUNX2 est inhibée pour permettre la maturation des ostéoblastes. En effet, la surexpression de RUNX2 dans des ostéoblastes en différenciation tardive, inhibe leur maturation (Liu et al., 2001).

RUNX2 a également un rôle dans la différenciation chondrocytaire et ostéoclastique, mais ces rôles seront discutés plus loin dans ce manuscrit. Malgré son

rôle prépondérant dans les processus d'ossification, RUNX2 n'est pas le seul facteur important pour la différenciation osseuse. En effet, le facteur de transcription Ostérix (OSX) joue également un rôle central dans la formation de l'os.

### *c) Le facteur de transcription Osterix (OSX)*

Le facteur de transcription OSX appartient à la famille des Krüppel-like, et contient trois séquences doigts de zinc Cystéine (2)/Histidine (2) (Nakashima et al., 2002). OSX est exprimé spécifiquement dans les ostéoblastes ainsi que dans les cellules ostéoprogénitrices formant l'os de manière directe ou par ossification endochondrale, suggérant un rôle d'OSX dans la différenciation des préostéoblastes en ostéoblastes immatures (Nakashima et al., 2002).

Le facteur de transcription OSX est fortement conservé entre l'homme et la souris. Son gène, situé sur le chromosome 12 chez l'homme, est composé de deux exons. L'exon 1 code pour les sept acides aminés de la région N-terminal tandis que l'exon deux contient le cadre ouvert de lecture (ORF) et la région 3' non traduite (3'-UTR) (Zhang, 2012). D'un point de vue protéique, OSX contient trois doigts de zinc qui servent de domaines de fixation à l'ADN. Ces sites de liaison sont situés dans la région C-terminale. OSX se fixe sur des régions riches en GC de l'ADN cible. Au niveau de la région N-terminale, OSX contient une région riche en proline, responsable de son effet inhibiteur sur la voie Wnt (Zhang et al., 2008). Cette voie est extrêmement importante au début de la différenciation pour la prolifération des cellules (Hu et al., 2005). Son rôle précis sera détaillé plus loin dans ce manuscrit.

#### *(1) Régulation d'OSX*

Tout comme le facteur de transcription RUNX2, l'expression et l'activité d'OSX sont finement régulées au cours de la différenciation osseuse. En effet, OSX est fortement exprimé dans les ostéoblastes et très peu dans les chondrocytes lors du développement embryonnaire. De plus, ce facteur a un rôle très important chez l'adulte comme régulateur de l'homéostasie osseuse (Sinha and Zhou, 2013).

### (a) Régulation transcriptionnelle

L'analyse de la séquence du promoteur d'*OSX* a révélé des sites de liaison pour Sox9, RUNX2, et Dlx5 (Nishio et al., 2006). Ces différentes protéines sont capables de réguler l'expression d'*OSX*, soit en l'activant ou en l'inhibant.

Sox9 est un facteur très important pour la différenciation chondrocytaire. Sa fixation sur le promoteur d'*OSX* bloquerait son expression induite par RUNX2, dans les chondrocytes hypertrophiques (Sinha and Zhou, 2013). Tout comme RUNX2, l'expression d'*OSX* est stimulée par la voie BMP. Cependant, cette stimulation est indirecte et passe par la phosphorylation de Dlx5, l'expression de Msx2, ou celle de RUNX2, permettant leur interaction avec le promoteur d'*OSX* ce qui active sa transcription (Lee et al., 2003). En effet, RUNX2 est capable d'activer la transcription d'*OSX* en se fixant directement sur le promoteur de celui-ci. *OSX* agit donc après RUNX2 au cours de la différenciation osseuse (Nakashima et al., 2002). D'autres facteurs sont impliqués dans la régulation de l'expression d'*OSX* comme Tbx-3 (T-box 3), qui bloque l'expression d'*OSX*, ou XBP1, qui se fixe sur le promoteur d'*OSX* pour induire son expression (Govoni et al., 2009; Tohmonda et al., 2011). Le TNF $\alpha$  (Tumor-Necrosis Factor) est capable d'inhiber la différenciation osseuse, en augmentant l'expression de Prx1 (paired-related homeodomain). Prx1 interagit avec le promoteur d'*OSX* pour réprimer son expression (Lu et al., 2011).

Tout comme RUNX2, *OSX* est également capable de s'autoréguler en se fixant sur son propre promoteur, ce qui permettrait de garder un niveau d'*OSX* suffisant, au cours des étapes précoces de la différenciation osseuse (Yoshida et al., 2012).

### (b) Régulation post-traductionnelle et interactions protéiques

Comme RUNX2, l'activité d'*OSX* est régulée par la phosphorylation qui est généralement régulée par l'activation de la signalisation BMP. En réponse à cette signalisation, *OSX* est phosphorylé par p38 (une MAPK) sur les résidus sérine 73 et 77, ce qui augmente sa stabilité et permet son interaction avec des activateurs transcriptionnels, tels que p300, afin d'initier la transcription des gènes cibles (Ortuño et al., 2010). La signalisation BMP est également capable d'induire la phosphorylation d'*OSX* par Akt. Cette phosphorylation se fait sur un site particulier proche de la région C-

terminale d'OSX, et augmente la stabilité et l'activité transcriptionnelle d'OSX, au cours de la différenciation (Choi et al., 2011). L'activité d'OSX peut également être régulée par son interaction avec différents partenaires protéiques. Par exemple, le facteur de transcription NFATc (Nuclear Factor of Activated T-cells) interagit avec le domaine d'activation d'OSX, et cette interaction est requise pour le recrutement d'OSX sur le promoteur du gène du *Coll1A1* (Koga et al., 2005).

L'expression ou l'activité d'OSX sont donc finement régulées au cours de la différenciation osseuse. En effet, ce facteur de transcription, en plus de RUNX2 joue un rôle central dans l'ostéoblastogénèse.

## (2) Rôle physiologique

Le facteur de transcription OSX joue, avec RUNX2, un rôle central dans la différenciation osseuse. Les souris KO pour *OSX* meurent peu de temps après la naissance due à une absence d'os. Les souris KO *OSX* présentent une absence complète d'ossification directe due à une incapacité des MSC à former une matrice osseuse tandis que les os formés par ossification endochondrale présentent une matrice cartilagineuse minéralisée, mais pas une matrice osseuse calcifiée, indiquant un rôle d'OSX dans la formation des ostéoblastes mais pas des chondrocytes hypertrophiques (Nakashima et al., 2002). En effet, les souris KO *OSX* présentent une formation de cartilage normale, démontrant le rôle d'OSX uniquement dans le processus de différenciation ostéoblastique et la maturation des ostéoblastes. L'expression des marqueurs osseux tels que *OCN*, *Coll1A1* ou *OPN*, est fortement réduite dans les souris KO *OSX* (Nakashima et al., 2002). Enfin, l'expression de RUNX2 est normale dans les souris KO *OSX*, alors que l'expression d'OSX est absente dans les souris KO *RUNX2*, démontrant qu'OSX agit après RUNX2 au cours de la différenciation osseuse (Nakashima et al., 2002). L'absence d'expression des marqueurs osseux dans les souris KO *OSX*, malgré l'expression normale de RUNX2, suggère que l'expression d'OSX est nécessaire pour l'activation de la transcription des gènes cibles par RUNX2, mais est également essentiel pour différencier les cellules ostéoprogénitrices exprimant RUNX2 en ostéoblastes (Nakashima et al., 2002).

Outre son importance dans le développement embryonnaire, OSX joue également un rôle dans l'os adulte. En effet, l'inactivation d'OSX après la naissance, dans des ostéoblastes déjà formés, provoque une réduction de la formation osseuse, en période

post-natale (Baek et al., 2010). Ces différents résultats *in vitro* et *in vivo* indiquent que le facteur de transcription OSX possède un rôle différent sur la formation osseuse, en fonction du moment où il est exprimé. OSX est essentiel à la formation osseuse pendant le développement embryonnaire, mais il est également crucial à la régulation du fonctionnement des ostéoblastes et l'homéostasie du tissu osseux, après la naissance.

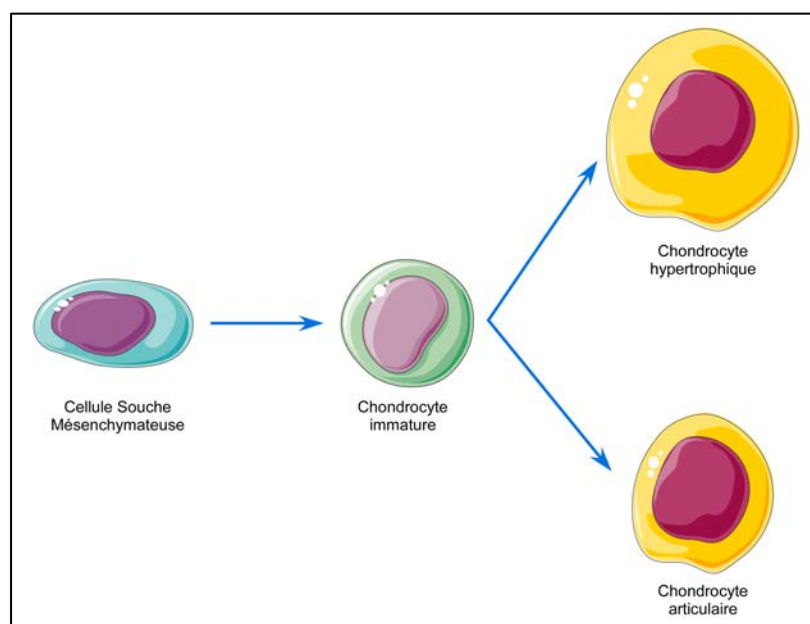
### 3. Chondrocytes

#### a) Généralité sur les chondrocytes

Les chondrocytes sont des cellules qui dérivent des cellules mésenchymateuses lors du développement embryonnaire. Elles se divisent abondamment jusqu'à l'âge adulte et renouvellent en permanence les composantes de la matrice cartilagineuse (MEC) (Hall, 2014).

La MEC est principalement constituée de fibres de collagène et d'élastine, garantissant la résistance mécanique du cartilage, et de glycosaminoglycans (GAGs) qui lui confèrent son élasticité et sa compressibilité. Outre son rôle structurel extrêmement important, la MEC cartilagineuse est une actrice importante de la différenciation des chondrocytes. Par exemple, les protéoglycans assurent la fixation et la présentation des molécules de signalisation telles que le FGF (Fibroblast Growth Factor) à leur récepteur, situé à la surface des chondrocytes, permettant leur différenciation (Hall, 2014).

Cette différenciation se fait en différentes étapes. En effet, les cellules MSC se différencient d'abord en chondroblastes immatures. Ces derniers peuvent ensuite soit se différencier en chondrocytes hypertrophiques, qui vont participer à l'ossification endochondrale (voir partie A-2), soit en chondrocytes articulaires, qui vont former le cartilage permanent de l'individu (Figure 39 ; Bruderer et al., 2014).



**Figure 39 : La différenciation des MSC en chondrocytes se fait en plusieurs étapes.**

Le facteur de transcription majeur ayant un rôle clé dans la différenciation chondrocytaire est Sox9 (SRY-related high mobility group-box gene 9). Sox 9 est un membre de la famille des Sox, caractérisé par un domaine de liaison à l'ADN appelé high-mobility-group (HMG) box. A l'heure actuelle, 20 membres de la famille Sox ont été identifiés chez les mammifères. Les facteurs de transcription de la famille Sox régulent la différenciation cellulaire, en activant des gènes spécifiques (Seymour, 2014).

### ***b) Le facteur de transcription Sox9***

Le facteur de transcription Sox 9 est exprimé précocement pendant la différenciation chondrocytaire et régule l'expression des gènes clés des chondrocytes (Bell et al., 1997; Lefebvre et al., 1997; Zhou et al., 1998). Son absence entraîne l'arrêt de la chondrogenèse (Akiyama et al., 2002; Bi et al., 1999).

Le facteur de transcription Sox9 appartient à la sous-famille E de la famille Sox. Cette sous-famille est caractérisée par la présence d'un intron, au milieu de la séquence du domaine HMG ou SOX. Cet intron est ensuite enlevé par épissage, afin de former un domaine de liaison à l'ADN fonctionnel (Wegner, 1999).

D'un point de vue protéique, le facteur de transcription Sox9 contient un domaine SOX de liaison à l'ADN, qui est conservé entre tous les membres de la famille Sox (Harley et al., 1994). Ce domaine est également important pour la localisation de Sox9. En effet,

la région N-terminale du domaine SOX contient deux signaux de localisation nucléaire (NLS) et un signal d'export nucléaire (NES) (Gasca et al., 2002; Südbeck and Scherer, 1997). Sox9 est capable d'interagir avec lui-même, afin de former un complexe activateur de la transcription. Pour se fixer à l'ADN, Sox9 s'homodimérise *via* le domaine DIM, qui permet à deux domaines SOX d'être placés l'un en face de l'autre (Lefebvre and Dvir-Ginzberg, 2016). Ce domaine de dimérisation est très fortement conservé entre les membres de la famille Sox. Enfin, Sox9 possède deux domaines de transactivation, qui lui permettent d'activer la transcription des gènes cibles (Lefebvre and Dvir-Ginzberg, 2016).

### (1) Régulation de Sox9

L'expression de Sox9 est finement régulée. En effet, les chondrocytes hypertrophiques ne l'expriment pas, tandis que les chondrocytes articulaires l'expriment tout au long de la vie. Les voies de signalisation de l'ostéogenèse peuvent moduler l'expression de Sox9. La voie BMP par exemple est requise pour induire et maintenir l'expression de Sox9 tandis que la voie Wnt la réprime, dans les progéniteurs squelettiques non-chondrogéniques (Lefebvre and Dvir-Ginzberg, 2016). Chaque voie de signalisation possède ses propres médiateurs intracellulaires, parmi lesquels des facteurs de transcription vont réguler l'expression de Sox9, au niveau génomique, tandis que d'autres protéines vont avoir un effet sur l'activité transcriptionnelle de Sox9, par des interactions ou des modifications post-traductionnelles.

#### (a) Régulation transcriptionnelle

Le promoteur du gène Sox9 contient plusieurs éléments servant à activer la transcription de celui-ci. Ces éléments incluent des sites de fixation pour HIF1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ ) (Amarilio et al., 2007), RELA, un membre de la famille des NF $\kappa$ B (nuclear factor kappa B) (Ushita et al., 2009), et un médiateur de la voie de signalisation Notch (Chen et al., 2013). Le promoteur comprend également des sites de liaison pour CREB, un facteur de transcription liant l'AMP cyclique, et le facteur de transcription à doigt de zinc SP1 (Piera-Velazquez et al., 2007). Ces différents éléments permettent d'activer la transcription de Sox9, tandis que la méthylation du promoteur sur des sites CpG spécifiques permettent de la bloquer. Ainsi, la protéine DNMT3, une



méthyltransférase de l'ADN, permet de bloquer l'expression de Sox9, en réponse à la voie de signalisation Wnt (Kumar and Lassar, 2014).

Le promoteur de Sox9 est donc un élément clé de sa régulation transcriptionnelle. Cependant, des études ont montré que des régions activatrices essentielles à l'expression de Sox9 existent en dehors du promoteur de celui-ci. Des protéines peuvent se fixer sur ces régions activatrices et initier la transcription de Sox9. Par exemple, le facteur de transcription Msx1 ou Sox9 lui-même peuvent favoriser la transcription en se fixant sur ces régions activatrices (Lefebvre and Dvir-Ginzberg, 2016). Ainsi, le promoteur de Sox9 mais également les séquences entourant son gène sont extrêmement importants pour sa régulation transcriptionnelle.

#### *(b) Régulation post-traductionnelle et interactions protéiques*

Comme de nombreuses autres protéines, Sox9 peut être phosphorylé. A l'heure actuelle, seuls deux résidus ont été identifiés comme étant phosphorylables dans la protéine Sox9. Il s'agit des sérines en position 64 et 181. Ces résidus peuvent être phosphorylés par plusieurs kinases, notamment la PKA, ROCK1 ou cGKII. Cependant, l'effet de cette phosphorylation semble être dépendant de la kinase, ou de la voie de signalisation impliquée (Lefebvre and Dvir-Ginzberg, 2016).

De manière générale, la phosphorylation de Sox9 sur les sérines 64 et 181, a plutôt un effet activateur sur la transcription des gènes cibles de Sox9, *in vitro* (Huang et al., 2000; Malki et al., 2005). Cette augmentation de l'activité de Sox9 peut être due soit à une meilleure fixation à l'ADN, lorsque Sox9 est phosphorylé (Huang et al., 2000), soit à une augmentation de la translocation de Sox9 dans le noyau (Malki et al., 2005). La sérine 64 est localisée juste avant le domaine de dimérisation et la sérine 181 est localisée juste après le domaine SOX, proche du domaine d'import nucléaire de Sox9. La phosphorylation sur la sérine 64 pourrait faciliter la dimérisation de Sox9, et donc sa fixation à l'ADN, tandis que la phosphorylation sur la sérine 181 pourrait augmenter la translocation nucléaire de Sox9, et sa fixation à l'ADN (Lefebvre and Dvir-Ginzberg, 2016). Bien que des études aient montré que Sox9 était phosphorylée *in vivo* et *in vitro*, l'impact de ces phosphorylations sur l'activité de Sox9 *in vivo* reste à déterminer.

La méthyltransférase CARM-1 (co-activator arginine methyltransferase-1) est capable de méthyler les résidus arginines présents dans la région N-terminale et le domaine SOX de Sox9, empêchant son interaction avec la  $\beta$ -caténine (Ito et al., 2009). Cependant, les résultats *in vivo* montrent que les souris invalidées, ou surexprimant CARM-1, présentent une réduction de la prolifération des chondrocytes au niveau de la plaque de croissance, mais également un retard dans l'ossification endochondrale (Lefebvre and Dvir-Ginzberg, 2016). L'effet de cette modification post-traductionnelle sur l'activité de Sox9 doit donc être élucidé.

L'activité du facteur de transcription Sox9 est dépendante de l'acétylation, *in vitro*. En effet, l'acétylation de Sox9 par la protéine TIP60 (tat-interacting protein 60) augmente la chondrogénèse (Hattori et al., 2008) tandis que la déacétylation de Sox9 par SIRT1 (une histone déacétylase de classe III) augmente l'expression des marqueurs des chondrocytes agrecan et Coll2a (Dvir-Ginzberg and Steinmeyer, 2013; Dvir-Ginzberg et al., 2008). Cet effet serait dû à une augmentation de l'activité de Sox9, par augmentation de sa localisation nucléaire (Lefebvre and Dvir-Ginzberg, 2016). Cependant, ces études ont été réalisées *in vitro*, et l'impact de l'acétylation sur Sox9 reste à élucider *in vivo*.

Enfin, la dégradation de Sox9 passe par l'ubiquitination. L'E3 ubiquitine ligase E6-AP/UBE3A peut directement ubiquitiner Sox9 ce qui réduit sa stabilité *in vitro* (Hattori et al., 2013). Cette protéine est exprimée dans les chondrocytes hypertrophiques, et pourrait donc réguler le niveau de Sox9, lors de l'ossification endochondrale (Hattori et al., 2013).

Le facteur de transcription Sox9 est capable d'interagir avec de nombreuses protéines, dont lui-même, qui vont réguler sa fonction. Ces partenaires protéiques forment avec Sox9 un enhanceosome, complexe protéique qui se fixe sur les régions activatrices des gènes, et qui interagissent avec la machinerie de transcription (Lefebvre and Dvir-Ginzberg, 2016). Parmi ces cofacteurs, la protéine p300 interagit avec Sox9 *via* son domaine de transactivation, afin d'augmenter son activité transcriptionnelle. La fonction d'histone acétyl transférase de p300 pourrait ainsi moduler la structure de la chromatine des gènes cibles de Sox9, et favoriser leur transcription (Furumatsu et al., 2005; Tsuda et al., 2003). La voie de signalisation TGF $\beta$  joue un rôle central dans la formation du squelette. Le facteur de transcription Smad3, médiateur de la signalisation TGF, est également capable d'interagir avec Sox9, pour augmenter son activité transcriptionnelle (Furumatsu et al., 2009). La signalisation TGF $\beta$  permet également

l'expression de PGC-1 $\alpha$  (peroxisome proliferator activator receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ ), qui interagit également avec Sox9 pour augmenter son activité (Kawakami et al., 2005).

L'activité de Sox9 est régulée par différents mécanismes, aussi bien au niveau transcriptionnel que post-traductionnel. Sox9 est capable d'initier la transcription de ces gènes cibles, en interagissant avec des co-activateurs.

## (2) Rôle physiologique

Le facteur de transcription Sox9 joue un rôle central lors du développement embryonnaire. En effet, le KO de Sox9 chez la souris est homozygote létal au jour embryonnaire 11.5, au début de la morphogenèse des testicules (Barrionuevo, 2005). Les études développementales ont donc été réalisées sur des souris hétérozygotes dont un allèle a été invalidé. Cependant, même dans ces conditions, la perte d'un allèle de Sox9 s'est révélée létale à la naissance. L'haploinsuffisance pour Sox9 provoque de grave malformation squelettique chez la souris (Huang et al., 2001). Les souriceaux présentent une hypoplasie de quasiment tous les éléments squelettiques formés par ossification endochondrale. Ils présentent également une courbure bilatérale et antérieure des os longs, ainsi qu'une cage thoracique plus petite, due à un sternum plus court (Huang et al., 2001). Le facteur de transcription Sox9 contrôle directement l'expression des gènes codant pour les composantes de la matrice extracellulaire, telles que le collagène type I, II, agrecan et COMP, mais également l'expression de ses propres partenaires protéiques, comme Sox5 et Sox6, dont le rôle sera abordé plus tard.

En plus de son rôle d'activateur de la transcription, Sox9 pourrait également réprimer l'expression de certains gènes, tel que des marqueurs de chondrocytes hypertrophiques. En effet, il a été suggéré que les chondrocytes non hypertrophiques pourraient utiliser un répresseur, activé par Sox9, pour réprimer l'expression du Collagène de type X (Leung et al., 2011). Enfin, Sox9 aurait également un rôle non transcriptionnel. En effet, Sox9 peut interagir avec la  $\beta$ -caténine, un facteur anti chondrogénique. Cette interaction résulte en la dégradation de tout le complexe par le protéasome, ne laissant agir que la protéine la plus abondante (Akiyama et al., 2004; Topol et al., 2009). Sox9 interagit également avec RUNX2, empêchant ainsi la transcription de ses gènes cibles, la maturation terminale des chondrocytes et la maturation des ostéoblastes (Zhou et al., 2006).

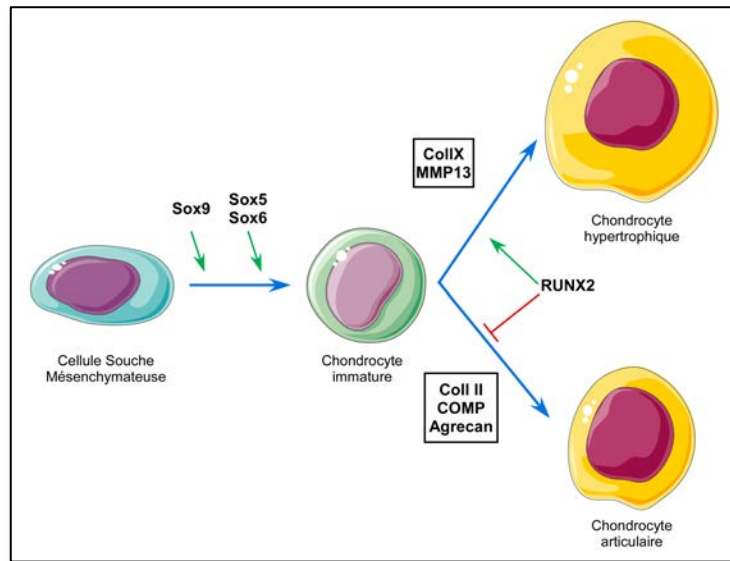
Sox9 est donc un facteur clé de la différenciation chondrocytaire, de par ses rôles transcriptionnels et non transcriptionnels. Sox9 est nécessaire à la chondrogenèse, démontré par les malformations squelettiques chez les souris mutantes. Cependant, Sox9 a besoin de co-activateurs dont les deux principaux sont Sox5 et Sox6.

Ces facteurs de transcription Sox5 et Sox6 sont deux autres membres de la famille Sox (Akiyama et al., 2002). Ces deux facteurs présentent une forte homologie entre eux, mais n'ont aucune homologie avec Sox9, en dehors du domaine HMG de fixation à l'ADN. La fonction de Sox5 et Sox6 *in vivo* est redondante, car ils potentialisent tous les deux l'induction de la différenciation chondrocytaire par Sox9. Sox5, Sox6 et Sox9 forment un trio, souvent appelé le trio chondrogénique Sox, qui est nécessaire et suffisant pour permettre la différenciation chondrocytaire des MSC *in vivo* et *in vitro* (Ikeda et al., 2004). Sox5 et Sox6 n'ont pas de domaine de transactivation intrinsèque. Leur action se fait en synergie avec Sox9, en se fixant sur des régions proches de celles où Sox9 se fixe sur ses gènes cibles. Ils consolident ainsi la liaison de Sox9 avec l'ADN et potentialisent donc son effet sur la transcription (Liu and Lefebvre, 2015). Les souris KO pour Sox5 et Sox6 naissent avec des malformations squelettiques mineures, tandis que les souris double KO Sox5/Sox6 meurent *in utero*, avec un défaut sévère de formation du cartilage, malgré une expression de Sox9 normale (Smits et al., 2001).

La différenciation chondrocytaire est donc sous le contrôle d'un trio de gène régulateur, dont l'expression est contrôlé au cours du temps. En effet, Sox5, Sox6 et Sox9 sont exprimés tout au long de la différenciation chondrocytaire, et à l'âge adulte dans le cartilage, tandis que les chondrocytes hypertrophiques, destinés à être remplacés par les ostéoblastes ne les expriment pas (Figure 40).

La différenciation des chondrocytes hypertrophiques est sous le contrôle de RUNX2. En effet, RUNX2 est capable d'induire l'expression des marqueurs des chondrocytes hypertrophiques, tel que le Collagène de type X, ou le VEGF, en réponse à la signalisation BMP (Leboy et al., 2001). De plus, la surexpression de RUNX2 dans les chondrocytes des souris KO pour RUNX2 provoque un sauvetage partiel des anomalies développementales chez la souris. En effet, les chondrocytes peuvent devenir hypertrophiques et expriment le VEGF. En revanche, aucun ostéoblaste n'est formé. Le défaut de formation des chondrocytes hypertrophiques est donc corrigé dans ce modèle, mais pas le manque de différenciation en ostéoblastes (Takeda et al., 2001). RUNX2 a donc deux rôles essentiels au cours de la formation osseuse : un rôle primordial dans la

différenciation des cellules mésenchymateuse en ostéoblastes, et un rôle dans la différenciation des chondrocytes hypertrophiques (Figure 40).



**Figure 40 : Régulation de la différenciation chondrocytaire par Sox9 et RUNX2**

L'initiation de la différenciation est due à l'expression de Sox9 dans les MSC. L'expression de Sox5, Sox6 et Sox9 différencie les cellules en chondrocytes immatures, qui continueront à exprimer ces gènes le cartilage adulte tandis que l'expression de RUNX2 provoque l'hypertrophie des chondrocytes, nécessaire lors de l'ossification endochondrale.

La différenciation des MSC en chondrocyte ou en ostéoblaste est donc un processus sous le contrôle de deux « master genes », dont l'expression est finement régulée au cours de la différenciation. En effet, les cellules progénitrices, dans les condensations mésenchymateuses, expriment à la fois RUNX2 et Sox9, suggérant un double potentiel de différenciation, en fonction du gène qui reste exprimé (Day et al., 2005). L'initiation ainsi que la régulation de leur expression sont sous le contrôle de facteurs environnementaux, notamment des facteurs de croissance, ou des cytokines, contrôlant des voies de signalisation particulière.

#### D. Les voies de signalisation ostéogénique

La formation de l'os est sous le contrôle de nombreux facteurs, tels que le FGF, la vitamine D, le BMP, Wnt, Hh (Hedgehog), Notch ou encore la PTH (ParaThyroid Hormon)... activant des cascades de signalisation, aboutissant à l'expression de RUNX2,

OSX ou Sox9. Dans ce manuscrit, je n'aborderai que les voies de signalisation BMP et Wnt, qui sont les plus étudiées.

### 1. La voie des Bone Morphogenetic Protein (BMP)

Les BMPs sont des cytokines, appartenant à la super famille du TGF $\beta$ . En général, la fixation des ligands TGF $\beta$  à leur récepteur membranaire provoque le recrutement de complexe de signalisation, responsable de la transduction du signal dans le noyau, pour réguler l'expression de gènes cibles, impliqués dans l'homéostasie osseuse. Parmi tous les membres de la famille TGF $\beta$ , les BMPs sont pratiquement les seuls à avoir des propriétés ostéogéniques (Katagiri and Tsukamoto, 2013). Cependant, les TGF $\beta$ 2 et 3 jouent également un rôle dans la formation de l'os, principalement dans le développement craniofacial.

#### a) Les BMP et leurs récepteurs.

Les ligands BMPs sont classés en quatre différentes sous familles, en fonction de leur homologie de séquence et de leur fonction (Lissenberg-Thunnissen et al., 2011) : i) BMP-2 et -4 ; ii) BMP-5, -6, -7 -8a et -8b ; iii) BMP-9 et -10 ; et iv) BMP-3, -3b, -13, -11, -12, -14, -15 et -16 (Carreira et al., 2014). Les BMP peuvent agir de manière endocrine, paracrine et autocrine. Les BMP-2, -4, -5, -6, -7 et -9 peuvent induire l'ossification directe ou endochondrale. Parmi eux, les BMP-2, -6 et -9 sont impliqués dans l'induction de la différenciation des MSC en ostéoblastes (Cheng et al., 2003).

Les ostéoblastes sécrètent les BMP sous forme de précurseurs, qui sera clivé, au niveau de la région C-terminale, pour former le peptide actif, après homodimérisation (Bessa et al., 2008; Carreira et al., 2014). Les BMP possèdent des sites de N- et O-glycosylation, ce qui augmente la stabilité et la demi-vie de la protéine, ainsi que la spécificité de leur récepteur (Arrabal et al., 2013).

Les récepteurs de la famille TGF $\beta$  sont formés par deux types de récepteurs à Sérine/Thréonine kinase : les récepteurs de type I et de type II. Chez l'homme, il existe sept récepteurs de type I (ALK1-7) et cinq récepteurs de type II (ActR-IIa, ActR-IIb, AMHR-II, BMPR-II, TGF $\beta$ R-II) (Massagué, 2000; Sebald et al., 2004). Trois récepteurs de type I (ALK-3, ALK-6 et ALK-2) et trois récepteurs de type II (BMPR-II, ActR-IIa et IIb)

sont capables de lier les BMP (Rahman et al., 2015), tandis que le TGF $\beta$  peut se fixer sur un récepteur de type I (ALK5) et un récepteur de type II (TGFBR-II) (Chen et al., 2012).

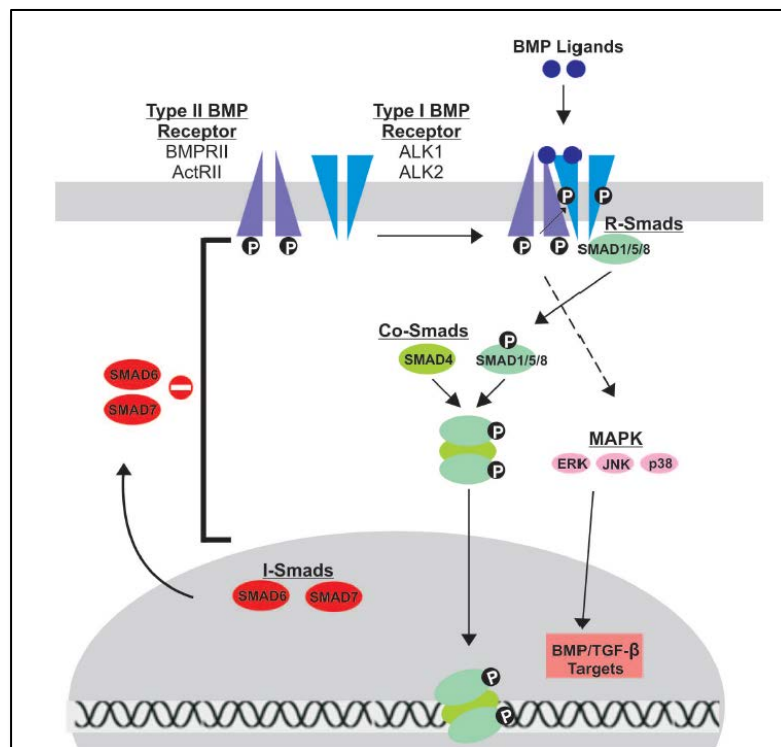
Lorsqu'un ligand se fixe au récepteur, il permet la dimérisation du récepteur, en rapprochant le récepteur de type I et II. Cette hétéromérisation est requise pour la propagation du signal BMP (Allendorph et al., 2006). Le récepteur de type I permet la spécificité de la signalisation intracellulaire, tandis que la queue cytoplasmique des récepteurs de type II est importante pour la régulation de la fonction des protéines du cytosquelette. Les ligands BMP activent en premier le récepteur de type II, ce qui entraîne la phosphorylation sur le domaine riche en Glycine/Sérine (GS) et l'activation du récepteur de type I. S'en suit une cascade de phosphorylation, faisant intervenir les protéines kinases Smad (SMA and Mother Against Decapentaplegic), aboutissant à la régulation de l'expression des gènes cibles.

#### ***b) Transduction du signal BMP par les Smad***

Les Smad sont un groupe de protéines intracellulaires, essentielles à la transduction du signal BMP ou TGF $\beta$  de la surface de la cellule jusqu'au noyau. Il existe trois types de Smad : i) les Smad régulées par des récepteurs (R-Smad) ; ii) les Smad communes (Co-Smad) ; et iii) les Smad inhibitrices (I-Smad) (Wu et al., 2001). Les Smad sont composées de trois domaines : un domaine N-terminal MH1 (Mad Homology 1), qui contient le signal de localisation nucléaire et une région de fixation à l'ADN ; un domaine au milieu, appelé linker, riche en prolines, et en sérine/thréonine, qui interagit avec les prolylisomérase et les ubiquitine ligases, et enfin un domaine MH2 C-terminal, responsable de la liaison au récepteur au BMP de type I, pour initier la signalisation BMP (Makkar et al., 2009; Moustakas and Heldin, 2009). La fixation du BMP à son récepteur peut initier deux voies de signalisation : dépendante et indépendante des Smad. La voie indépendante des Smad passe par la voie de signalisation MAPK.

Pour la signalisation BMP dépendante des Smad, les trois types de cette protéine sont importantes: les R-Smad, Smad1/5/8 interagissent directement avec le récepteur de type I actif, tandis que la Co-Smad, Smad4 forment un complexe avec les R-Smad activées. Ce complexe agit comme facteur de transcription, qui régule l'expression de certains gènes ostéogéniques dans le noyau. Enfin, les I-Smad, Smad6/7 régulent négativement la signalisation BMP, en bloquant la transduction du signal à différents points (Beederman et al., 2013).

Après fixation du BMP et activation du récepteur de type I, celui-ci active les R-Smad, Smad 1/5/8, par phosphorylation de celles-ci. Après activation, les R-Smad phosphorylées se détachent du récepteur de type I, et forment un complexe avec la Co-Smad, Smad 4 (Heldin et al., 1997; Sieber et al., 2009; Wrana, 2000). Ce complexe se relocalise dans le noyau, et interagit avec des facteurs de transcription, des co-activateurs et des corépresseurs, pour moduler l'expression des gènes cibles (Figure 41). La transduction du signal TGF $\beta$  se fait de la même manière que celle du BMP. Seule les R-Smad changent. Pour le TGF $\beta$ , il s'agit de Smad2/3.



**Figure 41 : Schéma de la transduction du signal BMP.**

Après fixation du BMP au récepteur de type II, le récepteur de type I est phosphorylé par le type II. Il recrute les R-Smad, Smad 1/5/8 au niveau de son domaine intracellulaire, et initie la transduction du signal par phosphorylation des R-Smad. Une fois activées, les R-Smad forment un complexes avec la Co-Smad, Smad4, avant de se transférer dans le noyau, pour réguler l'expression des gènes cibles. Les I-Smad, Smad6/7, résident dans le noyau migrent dans le cytoplasme pour inhibier la transduction du signal BMP. (D'après Bedderman, 2013).

La signalisation BMP est régulée par les I-Smad, Smad6/7. Ces Smad sont localisées dans le noyau, et migrent dans le cytoplasme, après l'initiation de la signalisation BMP, pour inhiber la transduction du signal (Figure 41 ; Attisano, 2002; Derynck et al., 1998; Heldin et al., 1997; Itoh et al., 2000). Smad7 peut se fixer au récepteur de type I activé, ce qui empêche l'activation des R-Smad. Smad7 peut



également interagir avec les E3 ubiquitine ligases, Smurf1 et 2, pour adresser le récepteur au BMP au protéasome pour qu'il y soit dégradé. Smad6, quant à elle, peut directement interagir avec les R-Smad, faisant ainsi compétition avec Smad4, ce qui empêche la formation d'un complexe R-Smad/Co-Smad actif (Beederman et al., 2013).

### *c) Transduction du signal BMP non dépendante des Smad.*

La signalisation non dépendante des Smad contribue également énormément à la différenciation des ostéoblastes et à la formation de l'os. La signalisation par le TGF $\beta$  ou le BMP permet d'augmenter la prolifération des cellules ostéoprogénitrices, leur différenciation précoces ainsi que l'engagement dans le lignage ostéoblastique par l'intermédiaire de Smad2/3 et Smad1/5/8, mais également par la signalisation MAPK (Matsunobu et al., 2009). Les MAPK sont des kinases spécifiques des sérines/thréonines/tyrosines. Elles appartiennent au groupe des kinases CMGC (CDK/MAPK/GCK3/CLK). La fixation du TGF $\beta$  sur son récepteur provoque l'activation de p38, *via* TAK1 (TGF $\beta$  Activation Kinase), entraînant l'induction de l'expression du collagène de type I (Chen et al., 2012), mais également la convergence des Smad et de p38 sur le gène de RUNX2, pour initier son expression (Lee et al., 2002).

Les MAPK peuvent également inhiber la signalisation BMP. Le linker des protéines Smad est une région riche en sérine, proline et thréonine, et peut être phosphorylé directement par les MAPK. Ainsi, le linker de Smad1/5 peut être phosphorylé par Erk, ce qui crée un site de fixation pour l'E3 ubiquitine ligase spécifique de Smad1/5, Smurf1. Cette interaction conduit d'une part à l'ubiquitination et à la dégradation de Smad1/5, mais également au blocage de son interaction avec le pore nucléaire, ce qui empêche la translocation du complexe Smad dans le noyau et donc inhibe le signal BMP (Sapkota et al., 2007).

### *d) Effet de la signalisation BMP sur l'ossification.*

La signalisation BMP, qu'elle passe ou non par les Smad, est cruciale pour la différenciation osseuse. Cette signalisation est capable de contrôler l'expression des master genes de la différenciation osseuse RUNX2 et OSX. En effet, l'expression de RUNX2 est augmentée par un traitement au BMP2, *via* l'interaction directe entre le complexe Smad et le promoteur de RUNX2 (Lee et al., 2000). De plus, RUNX2 et les Smad

peuvent interagir physiquement pour réguler l'expression d'autres gènes ostéoblastiques (Hanai et al., 1999; Nishimura et al., 2002). Bien qu'ils puissent coopérer, RUNX2 et les Smad peuvent également agir indépendamment. Ainsi, l'expression d'OSX est régulée directement par RUNX2, mais elle peut également être initiée par la voie BMP. En effet, le BMP peut induire l'expression de Msx2, qui peut lui-même induire l'expression d'OSX. La surexpression de Msx2, dans des cellules MSC de souris KO *RUNX2*, permet d'augmenter l'expression d'OSX, malgré l'absence de RUNX2 (Figure 42 ; Matsubara et al., 2008).



**Figure 42 : Le BMP induit l'expression de RUNX2 et d'OSX via les Smad.**

RUNX2 et OSX peuvent contrôler l'expression de gènes cibles communs (groupe B) ou différents (groupe A et C), tous importants dans la formation de l'os. (Adapté de Nishimura, 2012).

En plus de son rôle prépondérant dans la différenciation ostéoblastique, la signalisation BMP est également essentielle à la formation des chondrocytes, et à l'expression de Sox9. En effet, la délétion des récepteurs de type 1 ALK3 et ALK6 chez la souris provoque une absence d'expression de Sox9, Sox5 et Sox6, ainsi qu'une chondrodysplasie générale (Baur et al., 2000; Enomoto-Iwamoto et al., 1998; Yi et al., 2000). De plus, le BMP2 peut contrôler directement l'expression de Sox9 *via* les Smad, mais également son activité *via* p38 (Pan et al., 2008). La signalisation BMP est donc indispensable à la formation de l'os, aussi bien par ossification directe qu'enchondrale, mais elle est également essentielle pour la formation du cartilage.

Cependant, d'autres voies de signalisation sont également importantes, telles que la voie Wnt.

## 2. La voie de signalisation Wnt.

Une seconde voie de signalisation majeure de la formation osseuse est la signalisation Wnt. Les ligands Wnt sont une famille de 19 glycoprotéines riches en cystéines et sécrétées, qui régissent d'importants processus biologiques tels que l'embryogenèse (Logan and Nusse, 2004; Moon et al., 2004; Wodarz and Nusse, 1998). Les ligands Wnts se fixent à un complexe de récepteurs membranaires composé de un à dix récepteurs couplés aux protéines G Fzd (Frizzled) et d'une des deux protéines Lrp 5 ou 6 (Low-density lipoprotein Receptor-related Protein) (Logan and Nusse, 2004; Moon et al., 2004). Cette fixation active différents groupes de signalisation intracellulaire, qui dépendent du type cellulaire, du ligand Wnt, de la composition du récepteur Fzd et Lrp. Les molécules Wnt peuvent agir de deux manières : la voie canonique, nécessitant la  $\beta$  caténine, et non canonique, ne nécessitant pas la  $\beta$  caténine (Davis et al., 2008).

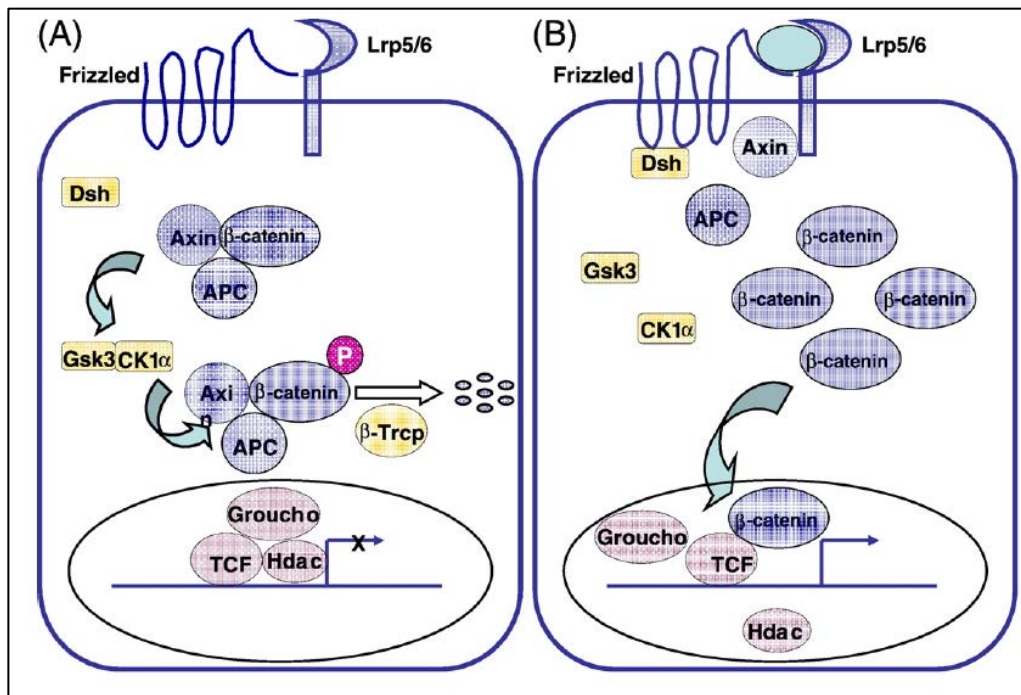
Les deux voies non canoniques majeures de Wnt sont la voie Wnt/Calcium, et la polarité cellulaire. La voie dépendante du calcium est très importante dans le développement embryonnaire et la migration cellulaire (De, 2011; Kühl, 2004). Tout comme la voie canonique, elle est initiée par la fixation des ligands Wnt sur le récepteur Fzd, suivi par l'activation des protéines G et une cascade de signalisation intracellulaire conduisant à un relargage de calcium depuis le réticulum endoplasmique. Ce relargage de calcium active des médiateurs, tels que la PKC (protein kinase C), la calcineurine ou la CAMK (calcium calmodulin-dependent protein kinase). Cette cascade de signalisation conduit à la fin à l'activation de facteurs de transcription tels que NF $\kappa$ B, NFATc et CREB (De, 2011; Rao and Kühl, 2010).

La voie de la polarité cellulaire est une autre voie non canonique de Wnt. Elle est impliquée dans la polarité cellulaire, la migration, la motilité et la division cellulaire (Vladar et al., 2009). Cette voie de signalisation passe également par la fixation des ligands Wnt à Fzd, ce qui active des GTPases, telles que Rho ou Rac, aboutissant finalement à l'activation de kinases comme JNK (Rao and Kühl, 2010; Sugimura and Li, 2010). Cependant, ces voies de signalisation non canoniques sont très peu caractérisées par rapport à la voie canonique. De plus, bien qu'elles jouent un rôle dans l'ossification, leur mécanisme d'action est encore mal connu (Baron and Kneissel, 2013). C'est pourquoi je n'aborderai que la voie canonique de Wnt.

### a) *La voie canonique Wnt/ $\beta$ -caténine*

La  $\beta$ -caténine est une protéine intracellulaire impliquée dans l'adhésion cellulaire *via* son interaction avec le E-cadhérine et  $\alpha$ -caténine (Hirohashi and Kanai, 2003). C'est également le centre de la voie canonique de signalisation Wnt (Wodarz and Nusse, 1998). En l'absence de ligand Wnt, la  $\beta$ -caténine est recrutée au sein d'un complexe de « destruction », composé au minimum d'APC (Adenomatous Polyposis Coli) et d'Axine, qui facilite la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine par CK1 (Casein Kinase 1) et la GSK3 (Glycogen Synthase Kinase). Cette phosphorylation augmente l'interaction entre la  $\beta$ -caténine et la  $\beta$ -TrCP ( $\beta$ -Transducin-repeat Containing Protein), ce qui résulte en l'ubiquitination et la dégradation de la  $\beta$ -caténine.

Lorsque les cellules reçoivent un signal Wnt, la protéine Dsh (Dishvelled) est recrutée, ce qui inhibe la phosphorylation et la dégradation de la  $\beta$ -caténine. Celle-ci peut alors s'accumuler dans le cytoplasme et se relocaliser dans le noyau. La  $\beta$ -caténine nucléaire peut alors interagir avec des facteurs de transcription tels que LEF/TCF (Lymphoid Enhancer -binding Factor 1/T Cell specific transcription Factor), pour affecter la transcription des gènes cibles (Figure 43 ; (Liu et al., 2008).



**Figure 43 : La voie de signalisation canonique Wnt**

(A) En l'absence de ligands Wnt, la  $\beta$ -caténine forme un complexe avec l'APC et l'axine. Après phosphorylation par la GSK3 et la CK1, la  $\beta$ -caténine est dégradée par ubiquitination, impliquant des interactions avec  $\beta$ -TrCP. En l'absence de  $\beta$ -caténine, TCF agit comme un répresseur de l'expression des gènes cibles de la voie Wnt, en formant un complexe avec Groucho et des histones déacétylases

(B) Lorsque le ligand Wnt se fixe sur son récepteur, Frizzled et Lrp5/6 recrute Dsh et l'axine à la membrane, provoquant ainsi la dissolution du complexe de dégradation de la  $\beta$ -caténine. Celle-ci peut alors s'accumuler dans le cytoplasme, se relocaliser dans le noyau, et interfère avec les interactions entre Groucho et TCF, ce qui convertit TCF en activateur de la transcription. (D'après Liu, 2008)..

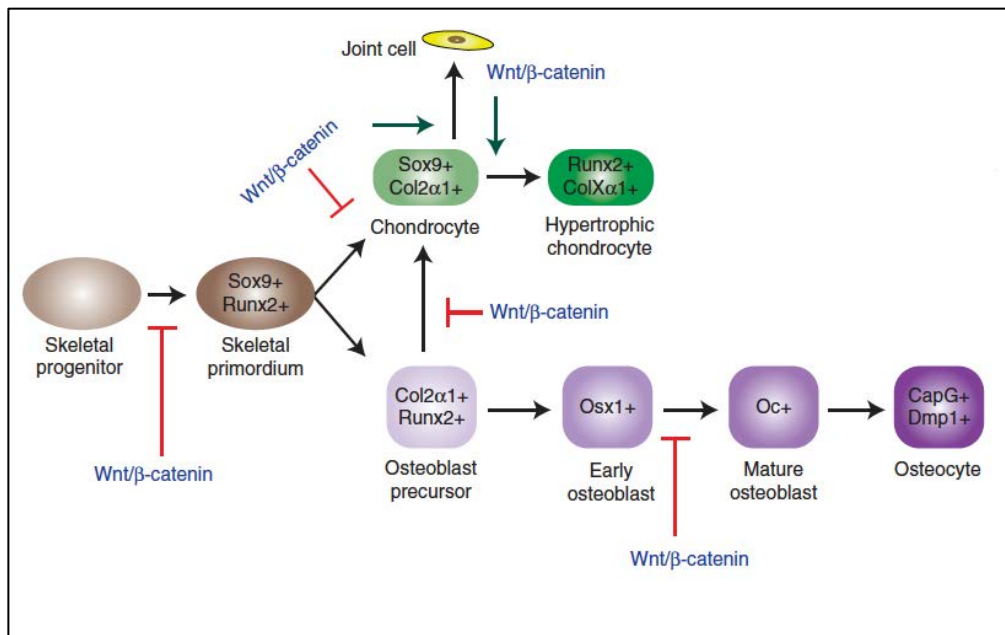
En l'absence de ligand Wnt, TCF agit comme un répresseur de la transcription formant un complexe avec Groucho/TLE (Brannon et al., 1997; Cavallo et al., 1998). Groucho interagit avec les HDAC, ce qui inhibe la transcription. Une fois dans le noyau, la  $\beta$ -caténine rompt l'interaction entre Groucho et TCF, provoquant le recrutement de p300 pour activer la transcription des gènes cibles (Figure 43; Daniels and Weis, 2005).

### *b) Rôle physiologique de la voie Wnt sur l'ossification.*

La voie canonique de Wnt régule de multiples aspects du développement du squelette, et contrôle la différenciation, ainsi que la fonction des cellules souches mésenchymateuses, des chondrocytes, des ostéoblastes et des ostéoclastes. Le promoteur de RUNX2 contient un élément de réponse à la voie Wnt, et le facteur de

transcription TCF et la  $\beta$ -caténine sont tous deux recrutés sur le promoteur de *RUNX2*, pour activer sa transcription (Gaur et al., 2005). D'autre part, la délétion de la  $\beta$ -caténine dans les cellules MSC entraîne une diminution de la différenciation des ostéoblastes (Day et al., 2005b; Hu et al., 2005) et une diminution de l'expression des marqueurs précoces de la différenciation tels que *OSX*, *Coll1a1* et l'ostéocalcine, malgré une expression de *RUNX2* normale (Day et al., 2005b; Hill et al., 2005; Hu et al., 2005). La signalisation canonique de Wnt est donc nécessaire pour l'expression d'*OSX*. Lorsque la  $\beta$ -caténine est retirée de cellules ostéoprogénitrices exprimant *OSX*, ces cellules ne se différencient pas en ostéoblastes matures, bien que l'expression de *RUNX2*, *Coll1a1* et *OSX* soit normale (Rodda and McMahon, 2006). La signalisation canonique de Wnt est donc requise pour la différenciation précoce et terminale des ostéoblastes.

L'effet de la voie canonique de Wnt sur la formation des ostéoblastes est dépendant de l'étape de développement des cellules. En effet, l'activation *in vitro* de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine dans des cellules MSC augmente leur prolifération et inhibe leur différenciation ostéoblastique (de Boer et al., 2004; Boland et al., 2004; Cho et al., 2006; Regard et al., 2011). Une fois les cellules MSC engagées dans le lignage ostéoblastique, la voie canonique de Wnt favorise leur différenciation, mais peut également bloquer la différenciation terminale en ostéoblastes matures, s'il y a trop de  $\beta$ -caténine (Kahler and Westendorf, 2003; Kahler et al., 2006; Rodda and McMahon, 2006). En effet, l'expression d'une forme stabilisée de la  $\beta$ -caténine chez la souris résulte en une perte de masse osseuse. L'expression continue de la  $\beta$ -caténine, dans des cellules ostéoprogénitrices exprimant *OSX*, accélère leur différenciation en ostéoblastes immatures, mais bloque leur maturation. L'effet de la voie canonique de Wnt sur tout le processus de différenciation osseuse est schématisé sur la figure 44.



**Figure 44 : Représentation schématique de l'implication de la voie canonique de Wnt au cours de l'ossification.**

(Adapté de Regard, 2012).

La voie canonique de Wnt est donc nécessaire à l'ostéoblastogénèse. Cependant, l'intensité de la signalisation doit être finement contrôlée pour avoir une différenciation efficace. En effet, le facteur de transcription OSX est capable d'inhiber la voie Wnt (Zhang et al., 2008). OSX contrôle directement, en se fixant sur leur promoteur, l'expression de SOST (Sclerostin) et de Dkk-1 (Dickkopf related protein-1), deux antagonistes de Wnt produit par les ostéocytes (Yang et al., 2010; Zhang et al., 2012). SOST se fixe sur les récepteurs Lrp5/6 pour inhiber de manière compétitive la fixation des ligands Wnt à ces récepteurs (Semënov et al., 2005). Dkk-1 peut également former un complexe avec Lrp5/6, et une autre protéine transmembranaire Krm1/2 (Kremen 1/2), ce qui aboutit à l'internalisation et la dégradation du récepteur Lrp, atténuant ainsi la signalisation Wnt (Bafico et al., 2001; Mao et al., 2002). OSX peut également empêcher la fixation de TCF à l'ADN, ce qui inhibe l'effet de la  $\beta$ -caténine dans le noyau (Zhang, 2012). La voie Wnt étant impliquée dans la prolifération des cellules ostéoblastiques au début de la différenciation, sa régulation par OSX permet la maturation des ostéoblastes.

La voie canonique de Wnt est également importante pour la formation des chondrocytes. En effet, la délétion de la  $\beta$ -caténine dans des cellules ostéoprogénitrices augmente la capacité de ces cellules à se différencier en chondrocytes au détriment des

ostéoblastes (Day et al., 2005b; Hill et al., 2005). De la même manière, l'activation de la voie canonique de Wnt dans des cellules MSC ostéochondroprogénitrices favorise la différenciation ostéoblastique et inhibe la différenciation chondrocytaire, *in vitro* (Day et al., 2005; Reinhold et al., 2006). La voie Wnt semble donc avoir un effet inhibiteur sur la différenciation chondrocytaire. Cependant, la délétion de la  $\beta$ -caténine dans des chondrocytes empêche l'ossification endochondrale, et conduit à la mort des souris à la naissance (Akiyama et al., 2004; Day et al., 2005). Les souris mutantes présentent une formation des chondrocytes hypertrophiques retardée, une prolifération chondrocytaire réduite, et un retard dans la vascularisation des os endochondraux (Regard et al., 2012). La voie Wnt/ $\beta$ -caténine inhibe donc la chondrogénèse mais une fois que le cartilage est formé, cette voie est requise pour la maturation et la survie des chondrocytes de la plaque de croissance (Figure 44 ; Regard et al., 2012). Le facteur de transcription Sox9 est capable d'inhiber la voie Wnt, en augmentant la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine par la GSK3, ce qui aboutit à la dégradation de celle-ci. L'engagement des cellules progénitrices dans le lignage chondrocytaire est donc dû à l'inhibition de la voie canonique de Wnt par le facteur de transcription Sox9 (Topol et al., 2009). Bien que les voies Wnt et TGF $\beta$ /BMP sont deux signalisations distinctes, elles sont capables de se réguler l'une l'autre au cours de la différenciation osseuse.

En effet, les BMP peuvent augmenter la production des ligands Wnt1 et Wnt3a, tandis que la voie Wnt peut augmenter le BMP4 et 6 (Dai et al., 2008; Guo and Wang, 2009). De plus, le blocage de la signalisation Wnt inhibe la différenciation ostéoblastique induite par le BMP (Chau et al., 2009). Ainsi, la voie de signalisation BMP et Wnt peuvent coopérer pour induire la différenciation osseuse. Cependant, des études montrent que la voie BMP peut avoir un effet inhibiteur sur la signalisation Wnt. En effet, Smad1 est capable d'interagir avec Dsh, en absence de signalisation Wnt, favorisant la dégradation de la  $\beta$ -caténine. La fixation de Wnt sur son récepteur active Dsh, qui se dissocie de Smad1 et bloque la dégradation de la  $\beta$ -caténine par la GSK3. La signalisation BMP peut diminuer l'activité transcriptionnelle de la voie Wnt, en bloquant l'accumulation de la  $\beta$ -caténine dans le cytoplasme, par la formation de complexes Smad1/Dsh, permettant ainsi d'engager les cellules en différenciation (Liu et al., 2006).

La formation de l'os est donc un processus très complexe, faisant intervenir plusieurs types de cellules ainsi que de nombreuses voies de signalisation. La



dérégulation de l'une des voies de l'ostéogénèse entraîne des phénotypes développementaux très graves.

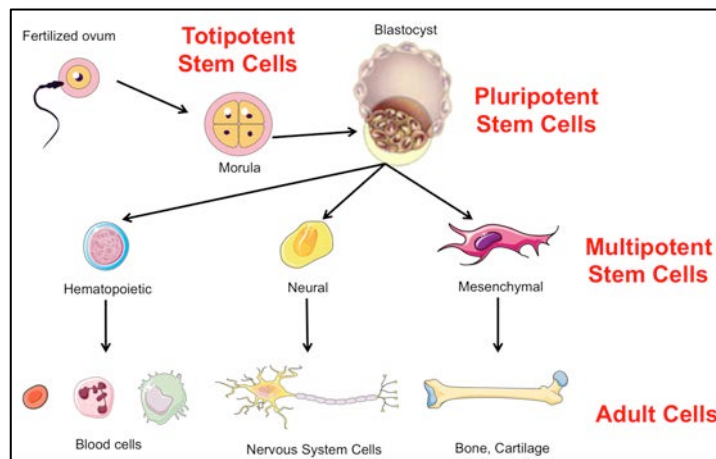
En effet, l'absence du TGF $\beta$ 2 et  $\beta$ 3 entraîne une fente palatine chez la souris (Sanford et al., 1997; Taya et al., 1999), tout comme la dérégulation des cofacteurs, régulateurs ou récepteurs du TGF $\beta$  (Dudas et al., 2004; Peters et al., 1998). Chez la souris, la délétion du BMP4 provoque une fente palatine, une dentition incomplète et une polydactylie (Peters et al., 1998). La signalisation BMP est responsable de l'inhibition de la croissance des doigts surnuméraires et initie le processus apoptotique, nécessaire à la séparation des doigts (Schaller and Muneoka, 2001; Zuzarte-Luis and Hurle, 2005). La délétion des acteurs de la voie Wnt provoque également des phénotypes développementaux. Les souris KO pour *Wnt9A* présentent des anomalies squelettiques, incluant une réduction de la taille des os longs et des zones minéralisées, aussi bien des os longs, que des os crâniens (Später et al., 2006). Chez l'homme, la perte de fonction de *Lrp5* est associée avec le syndrome d'ostéoporose pseudogliome (OPPG), caractérisé par une perte de la vue, et une ostéoporose. Les modèles murins récapitulent les symptômes associés à cette pathologie. En effet, les souris KO pour *Lrp5* présentent un retard dans l'ossification, ainsi qu'une perte osseuse. Cependant, l'ostéogénèse est normale chez ces animaux, indiquant un rôle de la signalisation Wnt dans l'ossification après la naissance (Clément-Lacroix et al., 2005; Kato et al., 2002).

Les défauts de développement retrouvés chez les souris KO Kir2.1 sont similaires aux anomalies développementales retrouvées chez des animaux déficients pour certains acteurs de la voie BMP/TGF $\beta$ , ou Wnt. A ce jour, un KO Kir2.1 inductible chez la souris n'est pas disponible. Il permettrait de pouvoir étudier le rôle précis du canal dans différents tissus, sans problème de viabilité des nouveau-nés. L'utilisation des cellules souches pluripotentes induites (iPS) pourrait être une bonne alternative à tous ces modèles animaux.

#### IV. Les cellules souches pluripotentes induites (iPS).

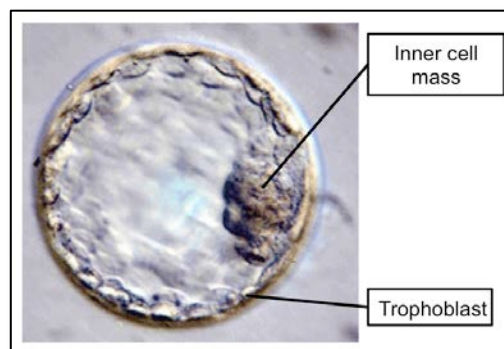
L'organisme est composé de cellules adultes, spécialisées dans une fonction précise, afin d'assurer le bon fonctionnement des différents tissus. Mais avant d'arriver à des cellules spécialisées, différentes étapes sont nécessaires. Ainsi, au cours de l'embryogenèse, la cellule fécondée subit un ensemble de processus de différenciation

afin de former les différentes cellules de l'organisme. Les cellules souches sont des cellules particulières, qui ont la capacité de proliférer à l'infini et de se différencier en différents types cellulaires. Il existe plusieurs types de cellules souches (Figure 45), caractérisées par leur capacité de différenciation (Jaenisch and Young, 2008; Simara et al., 2013).



**Figure 45 : Les différents types de cellules souches**

Les cellules souches totipotentes sont issues de l'embryon pendant les premières divisions de l'ovule fécondé. Elles sont capables de se différencier en toutes les cellules de l'organisme (tissus embryonnaires et extra-embryonnaires) et sont les seules à assurer le développement complet d'un individu. Les cellules souches embryonnaires pluripotentes sont dérivées de la masse cellulaire interne du blastocyste (embryon de 5 à 7 jours, Figure 46).



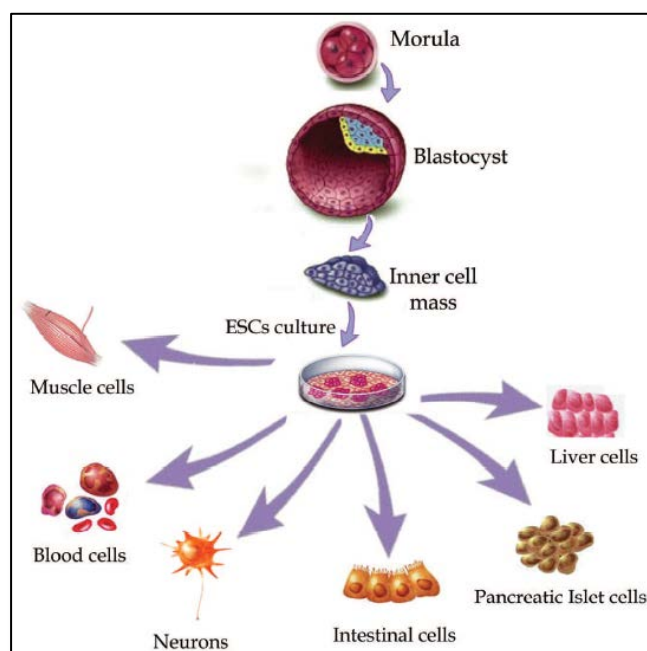
**Figure 46 : Représentation d'un blastocyste, avec la masse cellulaire interne d'où proviennent les cellules ES.**

Elles peuvent se différencier en tous types cellulaires de l'organisme, à l'exception des tissus extra-embryonnaires. Les cellules souches adultes multipotentes sont des cellules capables de se différencier en plusieurs types cellulaires, mais uniquement du même lignage, comme les cellules souches hématopoïétiques, qui donnent les cellules de la lignée myéloïdes, ou les cellules souches mésenchymateuses (MSC) qui se différencient en ostéoblastes, chondrocytes, adipocytes... Ces cellules participent au maintien de l'homéostasie tissulaire.

En 2006, un nouveau type de cellules pluripotentes a été généré *in vitro*, par la réexpression de facteurs embryonnaires dans des fibroblastes de souris (Takahashi and Yamanaka, 2006). Ces cellules, dites pluripotentes induites (iPS), ont les mêmes caractéristiques que les cellules souches embryonnaires (ES). En 2007, des cellules iPS issues de cellules humaines ont été générées (Takahashi et al., 2007), ouvrant ainsi de nombreuses possibilités pour la médecine régénérative. Depuis, de très nombreuses études sont menées afin de différencier ces cellules en cellules d'intérêt thérapeutique. La découverte des cellules iPS a valu au Dr Shinji Yamanaka le prix Nobel de médecine en 2012.

#### **A. Cellules souches embryonnaires.**

Les cellules souches embryonnaires (ES) ont été décrites pour la première fois en 1981 (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981). Des cellules isolées à partir de la masse interne du blastocyste présentaient des propriétés de cellules souches. En effet, la greffe de ces cellules dans des souris entraîne la formation de tératomes, des tumeurs contenant des cellules des trois feuillets embryonnaires (Martin, 1981). De plus, mises en culture, elles avaient la capacité de se différencier en plusieurs types cellulaires (Figure 47).



**Figure 47 : Obtention et capacité de différenciation des cellules souches embryonnaires**

(Adapté de Meregalli, 2011).

C'est en 1998 que de telles cellules furent isolées à partir de blastocystes humains (Thomson et al., 1998). Ces cellules, tout comme les cellules ES de souris, sont capables de former des tératomes lorsqu'elles sont greffées dans des souris immunodéficientes (Thomson et al., 1998).

De par leur pluripotence, c'est à dire leur capacité à se différencier en tout type cellulaire, ces cellules ont été très utilisées afin d'étudier des mécanismes de développements précoces *in vitro* mais surtout, ces cellules ont ouvert la voie à la médecine régénérative, et la modélisation de maladies rares *in vitro* (Sterneckert et al., 2014). Cependant, malgré le fort potentiel de ces cellules, de nombreuses limitations sont très vite apparues. La première d'entre elles est la disponibilité des cellules. En effet, les cellules ES ne peuvent être obtenues qu'à partir d'un blastocyste, formé par fécondation *in vitro*, ou obtenu après un diagnostic préimplantatoire.

Les diagnostics préimplantatoires (DPI) sont souvent utilisés afin de dépister chez des embryons conçus par fécondation *in vitro* (FIV), ou lorsque l'un des parents est porteurs de mutations connues pour être impliquées dans des pathologies, d'éventuels problèmes génétiques afin d'implanter un embryon sain chez la mère, (Sterneckert et al., 2014). Les embryons porteurs de mutations connues peuvent ainsi être utilisés afin d'obtenir des cellules ES, qui modéliseront la maladie. En effet, le phénotype de ces

cellules ES, après différenciation, devrait être similaire à celui observé chez les patients. Cette approche a été utilisée pour modéliser le syndrome du X fragile ou la maladie de Huntington (Eiges et al., 2007; Niclis et al., 2013), permettant de mieux comprendre leurs physiopathologies respectives.

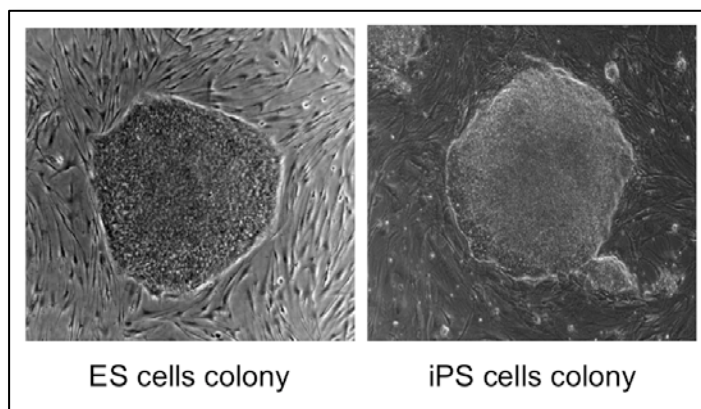
Cette approche est toutefois limitée, d'une part car le nombre de maladies identifiables par DPI est faible, ce qui fait que seules les maladies dont la mutation génétique est connue peuvent être utilisées pour obtenir des cellules souches. Cette stratégie ne peut pas être utilisée pour modéliser les maladies dont les causes génétiques ne sont pas connues. D'autre part, l'obtention de tels embryons est difficile, et les parents doivent donner leur consentement afin de l'utiliser pour la recherche. Enfin, l'obtention des cellules souches embryonnaires pose un vrai problème éthique, dû à la destruction d'embryon, rendant la recherche sur les cellules ES difficile voire illégale dans certains pays (Sterneckert et al., 2014).

La découverte des cellules iPS en 2006 a permis d'apporter une alternative à l'utilisation des cellules souches embryonnaires, car leur obtention pose moins de problèmes éthiques, et peuvent être dérivée de toute sorte de cellules adultes

## **B. Généralité sur les cellules iPS.**

Les cellules iPS furent décrites pour la première fois en 2006 chez la souris et en 2007 chez l'homme (Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007). Ces cellules ont été obtenues par reprogrammation de cellules adultes en cellules dont les caractéristiques sont similaires à celles des cellules souches embryonnaires.

Les cellules iPS, tout comme les cellules ES, sont capables d'auto-renouvellement, signifiant qu'elles peuvent proliférer sans se différencier, et elles sont pluripotentes, c'est à dire qu'elles peuvent se différencier en cellules des trois feuillets embryonnaires. Ainsi, il est potentiellement possible de différencier les cellules iPS *in vitro* en tout type cellulaire (Seah et al., 2015). D'un point de vue morphologique, les cellules iPS et ES sont indifférenciables. En effet, les cellules iPS sont de petites cellules, qui poussent en colonies, comme les cellules ES (Figure 48).

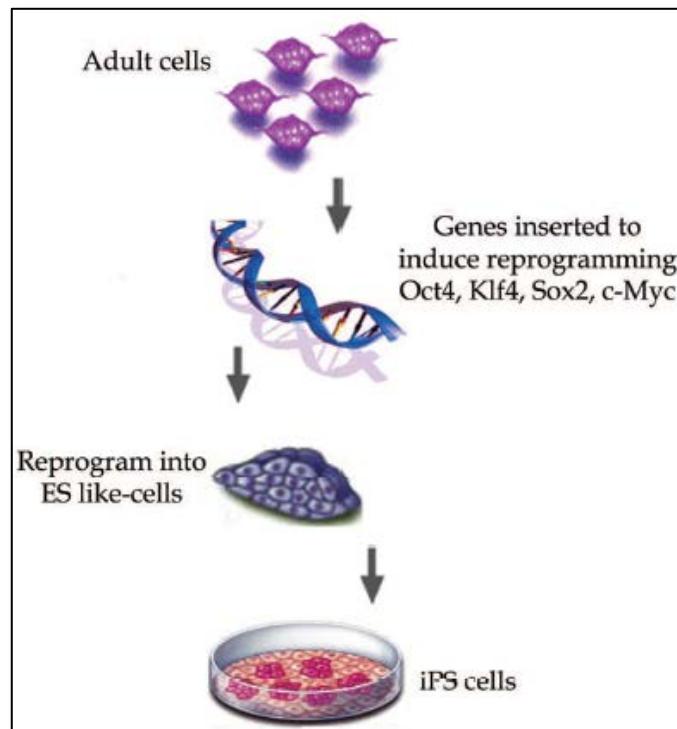


**Figure 48 : Morphologie des cellules ES (à gauche) et iPS (à droite) *in vitro*.**

Elles expriment également les marqueurs typiques des cellules souches embryonnaires, aussi bien membranaires tels que SSEA4 (Stage Specific Embryonic Antigen 4) ou TRA-1-81 mais également nucléaire tels que Oct4 et Nanog. De plus, tout comme les cellules ES, les cellules iPS ont une très forte activité phosphatase alcaline. Ainsi, il est impossible de distinguer *in vitro* entre des cellules iPS et ES, sans une analyse plus approfondie de leur ADN. Lors de la formation de souris chimériques, les cellules iPS participent à la formation de la lignée germinale, indiquant une grande similitude entre les cellules iPS et ES. Cependant, quelques différences existent, notamment au niveau des capacités de différenciation.

### **C. Facteurs et mécanismes de la reprogrammation.**

La reprogrammation des cellules se fait grâce à l'insertion de facteurs de reprogrammation. Ces facteurs sont très fortement exprimés dans les cellules ES, et participent au maintien de leur état souche (Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007). A l'origine, 24 facteurs différents ont été choisis afin d'engager le processus de conversion en cellules iPS. Finalement, l'expression forcée de 4 gènes, *Oct4* (Octamer binding protein 4), *Sox2* (SRY-type mobility box 2), *Klf4* (Kruepel-type-zinc-finger transcription factor 4) et *c-Myc* est suffisante pour obtenir des cellules iPS (Figure 49). Ce cocktail est connu comme les facteurs de Yamanaka, et sont largement utilisés actuellement pour générer des cellules iPS (Jang et al., 2012; Soldner et al., 2009; Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007).



**Figure 49 : Génération des cellules iPS à partir de cellules adultes.**

(Adapté de Meregalli, 2011).

Les facteurs de reprogrammation sont donc des facteurs de transcription, très fortement exprimés dans les cellules souches embryonnaires, puis leur expression est inhibée au cours de la différenciation. Au cours du processus de reprogrammation, ces différents gènes doivent donc être ré-exprimés pour donner à la cellule un état souche caractéristique des cellules iPS.

Oct4 est un membre de la famille des facteurs de transcription Oct (Octamer binding transcription factor), et joue un rôle crucial dans la régulation de la pluripotence des cellules et leur différenciation (Botquin et al., 1998; Pesce and Schöler, 2001). Les facteurs de transcription Oct possède un domaine POU de fixation à l'ADN nécessaire à leur fonction (Pan et al., 2002). L'expression d'Oct4 est exclusivement restreinte aux cellules pluripotentes, les cellules de la lignée germinale et son expression est maintenue dans la masse cellulaire interne du blastocyste. Pendant la gastrulation, l'expression d'Oct4 est progressivement perdue. Oct4 permet l'activation de la transcription de ses gènes cibles, comme *Sox2* ou *Nanog* (Zhao et al., 2012).

*Sox2* appartient à la famille des facteurs de transcription Sox, qui contiennent un domaine de fixation à l'ADN HMG. Ce domaine peut interagir avec le domaine POU des

protéines Oct (Boyer et al., 2005). Sox2 est impliqué dans le maintien de la pluripotence des cellules, comme Oct4. Cependant, Sox2 peut être exprimé par des cellules multipotentes et unipotentes, tandis que Oct4 est exclusivement exprimé par les cellules pluripotentes (Zhao et al., 2012). Sox2 interagit avec Oct4 pour réguler l'expression de ses gènes cibles.

Klf4 appartient à la famille des facteurs de transcription Klf (Kruepel-type-zinc-finger transcription factor). Cette famille régule de nombreux processus biologiques tels que la prolifération cellulaire, la différenciation, le développement ou l'apoptose (Zhao et al., 2012). Les membres de la famille Klf sont caractérisés par la présence de trois doigts de zinc au niveau de leur région C-terminale, séparés par une région de liaison très conservée. La famille Klf se fixe sur des régions riches en G/C de l'ADN cible, pour réguler la transcription de leurs gènes cibles (Wei et al., 2009). Pendant l'embryogénèse, Klf4 peut activer la transcription de ses gènes cibles, comme *Nanog*, en interagissant directement avec Oct4 et Sox2 (Wei et al., 2009).

c-Myc est un proto-oncogène qui agit pendant les étapes précoces du développement pour favoriser un remodelage de la chromatine, augmenter la prolifération cellulaire et jouant un rôle majeur dans la transition de l'initiation de la transcription vers l'élongation (Rahl et al., 2010; Sridharan et al., 2009). C-Myc a été utilisé lors de la génération des cellules iPS car son expression augmente la prolifération des cellules. L'utilisation de c-Myc dans la génération des cellules iPS est problématique, car cette protéine est directement liée à la formation de tumeurs. En effet, 25% des souris greffées avec des cellules iPS contenant c-Myc développent des tumeurs (Schmidt and Plath, 2012). Ce problème a conduit à la génération de cellules iPS sans expression de c-Myc. Cependant, l'efficacité de reprogrammation est diminuée lorsque c-Myc est absent (Seah et al., 2015).

Des études ont montré que la génération de cellules iPS pouvait se faire en remplaçant certains facteurs comme Klf4 et c-Myc, par Nanog et Lin28, chez l'homme (Yu et al., 2007). Nanog est un facteur de transcription à homéodomaine qui est fondamental pour le maintien de la pluripotence et l'auto-renouvellement des cellules souches, chez l'homme et la souris (Hatano et al., 2005; Mitsui et al., 2003). Lin28 est une protéine capable d'inhiber la fonction de certains ARNm impliqués dans la croissance et la traduction protéique. Dans le processus de génération de cellules iPS, Lin28 peut augmenter l'efficacité de reprogrammation en induisant un meilleur taux de



division cellulaire, et en augmentant le nombre de cellules en division (Hanna et al., 2010). Ce cocktail de reprogrammation est également utilisé chez la souris, suggérant que le réseau transcriptionnel fondamental qui gouverne la pluripotence est conservé entre les espèces.

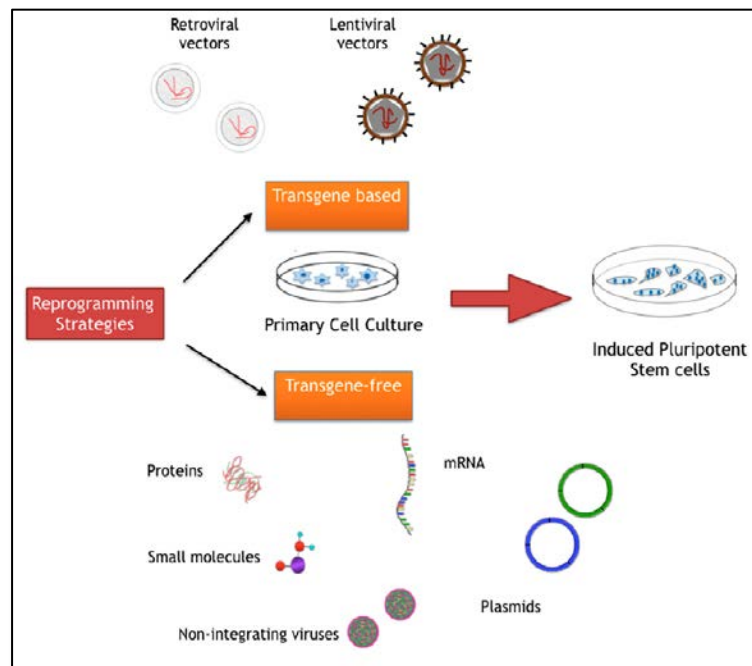
La génération de cellules iPS nécessite donc l'expression de facteurs impliqués dans le maintien de la pluripotence, dans les cellules ES. Le mécanisme précis de cette reprogrammation est encore mal connu, mais ces facteurs de reprogrammation exogène permettent la réactivation de gènes embryonnaires endogènes, qui ont été inhibés au cours de l'embryogénèse. Ces gènes sont classiquement retrouvés dans des régions de l'ADN où la chromatine est condensée (Krause et al., 2016). Les facteurs de transcription utilisés pour la reprogrammation peuvent donc accéder à ces zones où la chromatine est condensée et induire directement des événements de remodelage de celle-ci et/ou interagir avec des facteurs de transcription additionnels, ou des enzymes, pour engager le processus de reprogrammation (Hsu et al., 2015; Xu et al., 2007; Zaret and Carroll, 2011).

Deux mécanismes distincts apparaissent au cours de la reprogrammation de cellules somatiques en cellules iPS : une première phase de dédifférenciation, conduisant à l'effacement de l'identité de la cellule initiale (Papp and Plath, 2011), suivi par une phase de spécification où la pluripotence est établie. La génération des cellules iPS demande donc une succession d'évènements conduisant à l'établissement de la pluripotence, et à la définition de la nouvelle identité cellulaire. Depuis la première description des cellules iPS de souris en 2006, de nombreux progrès ont été fait sur les protocoles de génération de ces cellules, pour augmenter l'efficacité de la reprogrammation.

#### **D. Génération des cellules iPS.**

A l'origine, la réexpression des quatre facteurs de reprogrammation *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* et *c-Myc* se faisait dans les cellules adultes grâce à une infection, avec quatre rétrovirus contenant chacun un gène à ré-exprimer (Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007). La probabilité de succès était donc très faible, ce qui a conduit à l'apparition de plusieurs techniques de reprogrammation alternatives, visant à améliorer l'efficacité de génération des cellules iPS. On distingue principalement deux

façons de générer des cellules iPS : la reprogrammation par insertion des transgènes ou la reprogrammation sans insertion transgénique (Figure 50).



**Figure 50 : Représentation schématique des différentes techniques utilisées pour générer des cellules iPS.**

(Adpaté de Seah, 2015).

### 1. Reprogrammation par méthode transgénique

La reprogrammation basée sur l'expression de transgènes implique l'expression ectopique de facteur de transcription, ce qui aboutit à la reprogrammation des cellules, par intégration dans l'ADN cible. L'utilisation de rétrovirus ou de lentivirus sert, dans ce système, à intégrer et à faire exprimer par la cellule les facteurs de reprogrammation (Seah et al., 2015). Les lentivirus et les rétrovirus sont des virus à ARN, possédant une transcriptase inverse, et qui peuvent insérer de manière aléatoire leur matériel génétique dans la cellule hôte.

La génération des cellules iPS nécessite l'expression simultanée des quatre transgènes dans la cellule. L'utilisation des rétrovirus a donc très rapidement été remplacée par des lentivirus. En effet, les lentivirus peuvent rétro-transcrire de grands fragments d'ARN, ce qui a permis l'utilisation des vecteurs lentiviraux polycistroniques pour générer les cellules iPS. Ces vecteurs possèdent une seule cassette qui possède les

quatre facteurs de reprogrammation, permettant ainsi l'infection avec un seul virus au lieu de quatre (Sohn et al., 2012).

L'étude des lignées iPS générées par infection virale a montré que plusieurs transgènes étaient détectés dans le génome des iPS. Ces insertions étant aléatoires (Aoi et al., 2008), elles peuvent poser des problèmes. Ainsi, des études ont montré que plusieurs sites d'intégration pour les rétrovirus étaient associés à des tumeurs chez la souris (Akagi et al., 2004; Hawley, 2008). Pour éviter la multiple insertion du transgène, l'infection se fait souvent à 1 MOI (Multiplicity Of Infection), c'est à dire un virus pour une cellule. De plus, l'ajout de site LoxP à l'extrémité de la cassette de reprogrammation a permis de s'affranchir en partie des problèmes liés à l'insertion des transgènes dans l'ADN de la cellule. En effet, par utilisation d'une enzyme Cre recombinase, il est désormais possible d'exciser le transgène du matériel génétique.

Au cours de la génération des cellules iPS, l'expression ectopique des facteurs de reprogrammation sert à réactiver l'expression des gènes endogènes de la pluripotence. L'expression du transgène se retrouve inhibée après un certain temps en culture (environ 10 passages), probablement par méthylation du promoteur de la cassette de reprogrammation (Dey and Evans, 2011). Les facteurs endogènes prennent donc le relais pour assurer le maintien de l'état souche des cellules reprogrammées (Dey and Evans, 2011; Seah et al., 2015; Sohn et al., 2012). En effet, comme décrit plus haut, Klf4 peut interagir avec Oct4 ou Sox2 pour initier la transcription, permettant aux gènes endogènes de prendre le relais sur le transgène. Cependant, l'excision du transgène est une approche moins précise que l'utilisation de techniques de reprogrammation sans transgènes, car l'excision par la Cre recombinase peut laisser quelques éléments résiduels, notamment la séquence LoxP, qui peuvent être mutagènes (Sohn et al., 2012).

Outre la possibilité d'étudier les différents processus de différenciation *in vitro* et leur utilité dans la modélisation des maladies, les cellules iPS ont ouvert la voie à la médecine régénérative. Cependant, les problèmes liés à l'intégration du transgène dans le génome de la cellule cible, ainsi que les risques de cancer ont considérablement réduit les possibilités d'utilisation des cellules iPS en thérapie. C'est pourquoi des techniques de reprogrammation sans utilisation de virus ont été développées.

## 2. Reprogrammation sans utilisation de transgène

La génération de cellules iPS peut également se faire en utilisant des virus non intégratif, comme le virus de Sendai (Figure 50 ; Fusaki et al., 2009; Seki et al., 2010), ou la co-transfection de vecteurs contenant les facteurs de reprogrammation (Okita et al., 2008). Ces méthodes permettent d'avoir une expression transitoire des transgènes, sans aucune intégration à l'ADN de la cellule cible (Seah et al., 2015).

Des protéines recombinantes ont également été utilisées pour générer des cellules iPS (Figure 50 ; Kim et al., 2009; Zhou et al., 2009). Les protéines des quatre facteurs de reprogrammation ont été produites, dans lesquels un peptide poly-arginine a été fusionné au niveau de la région C-terminale, permettant la traversée de la membrane plasmique (Zhou et al., 2009). Cette approche est également utilisée avec des protéines non modifiées, mais avec une perméabilisation des cellules cibles (Cho et al., 2010) ou avec une magnéto transfection, où les protéines recombinantes sont conjuguées avec des nanoparticules magnétiques, ce qui facilite leur entrée dans la cellule (Lee et al., 2011). Cependant, l'utilisation des protéines recombinantes se fait en général en combinaison d'un traitement avec des petites molécules, pour augmenter l'efficacité de reprogrammation (Kim et al., 2009; Zhou et al., 2009 ; Cho et al., 2010).

Enfin, il est possible de générer des cellules iPS en utilisant des ARN que ce soit des ARN messagers (ARNm) modifiés codant pour les facteurs de reprogrammation, ou des micro ARN (miRNA ou miR). Les cellules iPS obtenues présentent toutes les caractéristiques des cellules iPS, et l'efficacité de reprogrammation est bien meilleure qu'avec les autres méthodes (Warren et al., 2010). L'induction de l'expression de certains miRNA permet de générer des cellules iPS. Les miRNA ont un rôle de régulateurs du développement et de la différenciation, et agissent en cluster (Ruvkun, 2001). L'induction de l'expression de miR302/367 dans des fibroblastes murins ou humains permet de générer des cellules iPS, avec une efficacité supérieure à celle obtenue par utilisation des facteurs de Yamanaka (Anokye-Danso et al., 2011).

L'addition de petites molécules (Figure 50), au cours du processus de reprogrammation, permet d'augmenter son efficacité, que ce soit seul ou en combinaison avec une infection virale. Ces molécules sont des inhibiteurs de différentes voies de signalisation. Ainsi, l'utilisation d'un inhibiteur de la GSK3, permet d'augmenter l'expression de Nanog, et peut ainsi remplacer l'expression de Klf4 (Lyssiotis et al., 2009). L'utilisation d'un inhibiteur de la voie TGF $\beta$ , en combinaison avec le cocktail de

Yamanaka, permet également d'augmenter l'efficacité de reprogrammation (Seah et al., 2015). L'utilisation d'activateurs de la PDK1, d'inhibiteurs de la G9a histone méthyl tranferase ou un activateur de canaux calciques voltage dépendant peut se substituer à l'expression ectopique des facteurs de reprogrammation (Shi et al., 2008; Zhu et al., 2010). En effet, la G9a méthyle l'histone H3 sur la lysine 9, ce qui inhibe l'expression d'Oct4 pendant les étapes précoces du développement, diminuant ainsi l'efficacité de reprogrammation (Epsztejn-Litman et al., 2008; Feldman et al., 2006), tandis que l'activation des canaux calciques voltage dépendant permet de moduler les voies de signalisation en aval, et donc d'augmenter l'efficacité de reprogrammation (Sohn et al., 2012).

Toutes ces différentes techniques ont été utilisées pour générer des cellules iPS à partir de très nombreux types cellulaires. En effet, n'importe quel type de cellule adulte peut être reprogrammé, que ce soit chez la souris ou l'homme, incluant des lymphocytes B (Hanna et al., 2008), des progéniteurs neuronaux (Eminli et al., 2008), des hépatocytes et des cellules épithéliales gastriques (Seah et al., 2015)... chez la souris, aussi bien que des cellules mésenchymateuses dérivées du tissu adipeux (Aoki et al., 2010), des kératinocytes (Aasen et al., 2008), des lymphocytes T (Loh et al., 2010)... chez l'homme. Cependant, peu importe le type cellulaire utilisé ou la technique employée, la génération des cellules iPS est un processus long, dont l'efficacité reste très faible, comme indiqué sur la figure 51, celle-ci ne dépassant pas les 1% (Seah et al., 2015). L'utilisation de miRNA semble être prometteuse, puisque l'efficacité est de 10%, mais une seule étude a rapporté l'utilisation de cette technique (Anokye-Danso et al., 2011).

Method Type	Method	Factors/Other Agents	Cell Type	Efficiency
Transgene-based	Retroviral	OSKM	Mouse fibroblasts	0.02%
	Retroviral + small molecules	OSKM + SB431542 + PD0325901	Human fibroblast	~1%
	Lentiviral	OSNL	Mouse fibroblasts human fibroblasts	0.0095%
	Inducible lentiviral	OSKMN	Human fibroblast keratinocytes	1%–3%
	Integrating, non-viral inducible plasmid vectors	OSKM	Rat fibroblasts	0.0027%–0.0078%
Transgene-free	Small molecules	C6FZ or VC6TFZ	Mouse fibroblasts	0.2%
	Episomal plasmids	OSKM	Mouse fibroblasts	~0.1%
	Sendai viruses	OSKM	Human fibroblast	~1%
	Non-integrating DNA adenoviral	OSKM	Tail tip fibroblasts hepatocytes, fetal liver cells	0.0001%–0.001%
	Excisable lentiviral	OSK	Mouse fibroblasts human fibroblasts	Not reported
	PiggyBAC transposon	OSKM or OSKML	Mouse fibroblasts	~1%
	Synthetic mRNA	OSKM	Human fibroblast	2%
	Polyarginine-tagged polypeptides	OSKM	Human fibroblast	0.001%
	Magnet-based nanofection of polypeptides	OSKM	Mouse fibroblasts	0.001%–0.003%
	MicroRNAs (lentiviral)	miR302/367	Mouse fibroblasts human fibroblasts	Up to 10%

**Figure 51 : Tableau comparant les différentes méthodes de génération des cellules iPS, ainsi que l'efficacité du processus de reprogrammation.**

L'efficacité de reprogrammation est calculée en fonction du nombre de clones iPS obtenues par rapport à la quantité de cellules ensemencées au départ.

O : Oct4, S : Sox2, K : Klf4, M : c-Myc, L : Lin28, N : Nanog, (Adapté de Seah, 2015).

Une fois les cellules iPS générées, leurs propriétés doivent être caractérisées pour déterminer si la reprogrammation s'est faite correctement et si les cellules iPS générées ont bien toutes les caractéristiques des cellules souches embryonnaires.

### E. Caractérisation des cellules iPS

Les cellules iPS expriment des gènes spécifiques des cellules souches embryonnaires, qui maintiennent leur potentiel à se différencier en cellules des trois feuillets embryonnaires (ectoderme, endoderme et mésoderme). Plusieurs tests fonctionnels, que ça soit *in vitro* par différenciation, méthylation de l'ADN, expression génique ou *in vivo*, par formation de tératomes ou de souris chimériques, permettent de caractériser les cellules iPS, et de s'assurer de leur pluripotence (Kang et al., 2009; Zhao et al., 2009).

## 1. Intégrité génomique

Le maintien de l'intégrité génomique est d'une importance capitale pendant la génération de cellules iPS, car des altérations génomiques peuvent être la cause de maladie et donc limiter le potentiel thérapeutiques des iPS. Ainsi, les cellules iPS doivent garder un caryotype normal après reprogrammation, et pendant leur culture. Des analyses sur des iPS de souris ou humaines ont révélé que les cellules iPS présentaient souvent des altérations chromosomiques, dès les passages précoces. En effet, des aberrations chromosomiques, incluant des trisomies ou des duplication de gènes, ont été rapportées dans les cellules iPS, le plus souvent sur les chromosomes 12, 17 et X, alors que les cellules d'origine présentaient un caryotype normal (Mayshar et al., 2010). L'utilisation des cellules iPS en thérapie devra donc se faire de manière très contrôlée, pour éviter tout problème, lié à des altérations chromosomique des cellules.

L'utilisation de vecteurs lentiviraux ou rétroviraux pour générer les cellules iPS présente un risque quant à l'insertion du transgène dans le génome. En effet, l'insertion étant aléatoire, elle peut se faire dans la séquence codante d'un gène extrêmement important, et entraîner des perturbations dans l'homéostasie cellulaire ainsi que l'apparition de tumeur en cas de greffe (Sohn et al., 2012). L'utilisation de méthodes de reprogrammation sans transgènes est une alternative pour éviter les anomalies liées à l'insertion des transgènes. Cependant, même sans intégration virale, les changements génétiques faisant partie du processus de reprogrammation peuvent quand même avoir lieu (Sohn et al., 2012).

A l'heure actuelle, il semble que l'intégrité génétique soit préservée après la reprogrammation, sauf cas particuliers. Cependant, seules des études sur le long terme pourront révéler si les cellules iPS n'ont aucun potentiel tumorigénique *in vivo*, greffées dans des souris immunocompétentes (Sohn et al., 2012). L'intégrité génomique est donc extrêmement importante pour l'utilisation des cellules iPS en thérapie. Concernant l'utilisation des cellules iPS pour la modélisation de maladies, l'intégrité génomique est également importante car une altération chromosomique pourrait altérer les processus de différenciation.

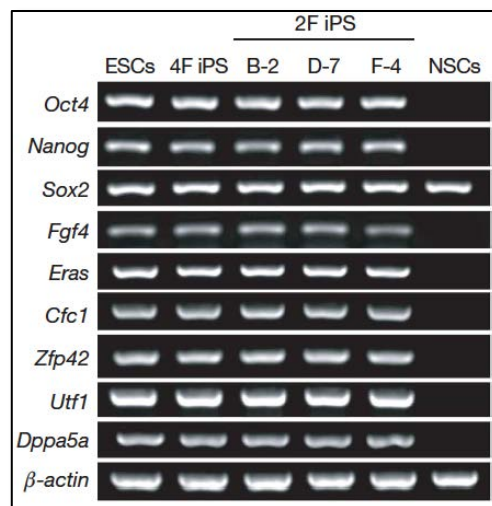
## 2. Expression génique et membranaire

De manière générale, le profil d'expression génique entre les cellules iPS et ES est très similaire, autant qu'entre des lignées différentes de cellules ES (Mikkelsen et al.,

2008). Cependant, quelques différences d'expression sont à noter entre les cellules iPS et ES. Ainsi, environ 4% des gènes présentent une expression supérieure ou inférieure chez les cellules iPS, comparées aux cellules ES (Takahashi et al., 2007). La présence du transgène semble avoir un impact sur cette expression différentielle puisque des cellules iPS générées avec insertion du transgène présente un profil d'expression légèrement différent de celui des mêmes cellules auxquelles le transgène a été retiré. Le profil d'expression génique des cellules sans transgène est plus proche des cellules ES, que celui des cellules ayant conservé le transgène (Soldner et al., 2009).

Les cellules ES et iPS expriment de très nombreux marqueurs, chacun ayant un rôle bien spécifique dans les cellules. Les cellules iPS présentent les mêmes marqueurs que les cellules ES (Yamanaka, 2009). Ces derniers sont donc utilisés pour caractériser la pluripotence des cellules iPS générées. Dans ce manuscrit, je ne vais décrire que les principaux marqueurs utilisés lors de la caractérisation des cellules iPS.

Comme décrit plus haut, les cellules ES et iPS ont un profil d'expression génique très proche. Les gènes essentiels à la pluripotence des cellules, comme *Oct4*, *Sox2* ou *Nanog* sont donc fortement exprimés, et peuvent servir à caractériser les cellules iPS d'un point de vue génétique (Figure 52, Zhao et al., 2012).



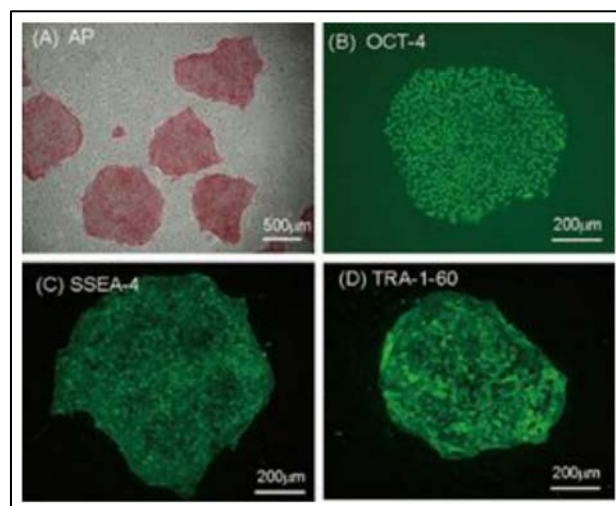
**Figure 52 : Comparaison du profil d'expression génique entre les cellules ES et iPS.**

Expression des marqueurs des cellules ES dans les cellules ES, iPS générées par expression de quatre facteurs de reprogrammation (4F iPS) et iPS générées par expression de deux facteurs de reprogrammation (2F iPS), par rapport à des cellules souches neurales (NSC). (Adapté de Kim et al., 2008).



Si les cellules iPS sont générées à partir de l'expression ectopique d'un transgène, l'expression d'*Oct4* ou *Sox2* peut ne pas suffire pour définir la pluripotence des cellules, à des passages très précoces. En effet, l'expression détectée peut être due à la réactivation du gène endogène mais également au transgène. Cependant, comme décrit plus haut, l'expression transgénique est inhibée par méthylation après environ 10 passages en culture. Ces marqueurs peuvent donc être utilisés pour définir la pluripotence des cellules iPS, après quelques passages en culture (Sohn et al., 2012).

D'un point de vue membranaire, deux marqueurs sont très utilisés pour caractériser les cellules iPS. Il s'agit de *SSEA-3* ou *SSEA-4* (Stage Specific Embryonic Antigen-3 and -4) et *TRA-1-60/81* (Figure 53, Zhao et al., 2012). *SSEA-3* et *SSEA-4* sont des épitopes de la famille des sphingolipides (GLS), reconnus par des anticorps monoclonaux, et qui sont retrouvés sur le GL-5 et GL-7, respectivement (Kannagi et al., 1983). *SSEA-3* et *SSEA-4* sont spécifiquement exprimés par les cellules pluripotentes de la masse cellulaire interne du blastocyste (Henderson et al., 2002). *TRA-1-60* et *TRA-1-81* sont des antigènes, reconnus par des anticorps monoclonaux, et qui sont exprimés par les cellules pluripotentes. Au cours de la différenciation, l'expression de ces deux épitopes est perdue, indiquant qu'ils sont exprimés par les cellules pluripotentes (Schopperle and DeWolf, 2006).



**Figure 53 : Caractérisation phénotypique des cellules iPS.**

- (A) Les cellules iPS possèdent une forte activité phosphatase alcaline (AP)
- (B) Immunofluorescence démontrant l'expression d'OCT4
- (C) Les cellules iPS expriment SSEA4 à la membrane
- (D) Les cellules iPS expriment TRA-1-60 à la membrane

Les cellules ES et iPS possèdent une activité phosphatase alcaline (AP) (Figure 53). Cette enzyme membranaire catalyse l'hydrolyse des groupements Phosphoester. Chez l'homme, il existe trois types d'AP : trois isoformes sont tissus spécifiques (TSAP), et sont exprimés par les cellules intestinales (IAP), les cellules du placenta (PLAP) et les cellules germinale (GCAP) ; et le quatrième isoforme n'est pas spécifique d'un tissu particulier (TNAP), et est exprimé par l'os, le foie et les reins (Shamblott et al., 1998). Une forte activité AP est un marqueur de pluripotence. En effet, les cellules de la masse cellulaire interne du blastocyste (cellules ES) présentent une forte activité AP tandis que les cellules du trophoblastes n'en ont pas. L'activité AP est ensuite réduite au cours de la différenciation, jusqu'à n'être retrouvée dans des cellules spécialisées de certains tissus (Štefková et al., 2015). Les cellules pluripotentes expriment la TNAP et, bien que son rôle, dans ces cellules ne soit pas bien connu (Štefková et al., 2015), son activité est utilisée comme marqueur de la pluripotence.

### 3. Statut épigénétique

En tant que substrat de la transcription, la chromatine est sujette à une régulation épigénétique, incluant un remodelage de la chromatine, des modifications des histones, et une méthylation de l'ADN. Cette dernière est un processus biochimique caractérisé par l'ajout de manière covalente d'un groupement méthyle (CH<sub>3</sub>) sur le carbone 5 des cytosines. Cet ajout bloque physiquement la fixation de facteurs de transcription sur le gène (Choy et al., 2010) ou permet le recrutement de protéines à domaine MBD (Methyl-CpG Binding Domain), ce qui remodèle les histones, en formant une chromatine compacte, appelée hétéro chromatine (Pennarossa et al., 2016). Les histones, quant à elles, sont modifiées par un ensemble de modifications post-traductionnelles, telles que l'acétylation, la phosphorylation, la SUMOylation, l'ADP ribosylation et l'ubiquitination, permettant ou non l'accès à l'ADN, pour les facteurs de transcription ou d'autres protéines (Spivakov and Fisher, 2007). Ces processus gouvernent le développement embryonnaire, et l'acquisition d'un profil épigénétique spécifique des tissus et stable tout au long de la vie (Pennarossa et al., 2016).

Par la régulation de la chromatine, les modifications épigénétiques jouent un rôle central dans le contrôle de l'accessibilité des gènes et des éléments régulateurs dans le génome (Brambrink et al., 2008). Les différences dans le statut épigénétique entre des

cellules somatiques et des cellules pluripotentes sont énormes, et la dédifférenciation nécessite une reprogrammation globale de l’empreinte épigénétique.

Les cellules pluripotentes possèdent des domaines bivalents, où le profil de la chromatine est caractéristique (Bernstein et al., 2007). Ces régions sont enrichies en histone H3 triméthylée sur la lysine 27, qui inhibe la transcription, mais également en histone H3 triméthylée sur la lysine 4, qui active la transcription (Mikkelsen et al., 2007). Le nombre de ces domaines bivalents est représentatif de la pluripotence des cellules, car ces domaines représentent les gènes prêts à être transcrit (Sohn et al., 2012). L’analyse de plusieurs lignées de cellules iPS a montré que les cellules iPS et ES ont un profil épigénétique extrêmement proche (Maherali et al., 2007). Le profil de triméthylation de la lysine 4 et 27 de l’histone 3, ainsi que les domaines bivalents, étaient similaires entre les différents échantillons (Maherali et al., 2007). La restauration progressive d’un profil épigénétique inhibant l’expression de gènes spécifiques d’un lignage cellulaire, actifs dans les cellules somatiques mais non exprimés dans les cellules pluripotentes est donc cruciale pour que la reprogrammation soit correcte. L’échec de ce processus entraîne une reprogrammation incomplète des cellules (Sohn et al., 2012). L’activation de certains promoteurs, comme celui d’Oct4 et Nanog, par la H3K4me3, est également cruciale pour assurer une reprogrammation complète (Mikkelsen et al., 2008).

Un second composant de la machinerie épigénétique est la méthylation de l’ADN, qui est stable et transmissible. Ce processus implique l’inhibition de l’expression d’un certain nombre de gènes, incluant l’empreinte génétique et l’inactivation du chromosome X. Les profils de méthylation de l’ADN sont dynamiques au cours du développement embryonnaire, et sont essentiels au développement normal de l’embryon après implantation dans l’utérus (Rougier et al., 1998). Dans les cellules différenciées, les promoteurs des gènes *Oct4*, *Sox2* et *Nanog* sont fortement méthylés, ce qui bloque leur transcription, tandis que dans les cellules ES, ces mêmes promoteurs sont déméthylés, pour assurer leur transcription. Pendant le processus de reprogrammation, les promoteurs de ces gènes sont déméthylés (Maherali et al., 2007; Mikkelsen et al., 2008). La perte de méthylation sur les promoteurs des gènes impliqués dans le maintien de la pluripotence est donc une étape nécessaire pour achever le processus de reprogrammation (Sohn et al., 2012).

Du fait de la grande stabilité du profil épigénétique des cellules somatiques, le processus de reprogrammation peut entraîner des problèmes (Plath and Lowry, 2011). En effet, l'acquisition d'un état pluripotent stable n'est pas physiologique, car celui-ci n'est que transitoire au cours du développement, pendant les phases précoces. Ainsi, l'établissement d'un état pluripotent persistant pose des problèmes de sécurité car il peut conduire à une instabilité cellulaire (Wu and Zhang, 2010). De plus, la prolifération et la différenciation des cellules iPS sont des processus difficiles à contrôler. En effet, les cellules iPS ont un taux de différenciation d'environ 30%, ce qui aboutit, à la fin du processus, à une population cellulaire mixte contenant des cellules différenciées et des cellules non différenciées en prolifération (Cohen and Melton, 2011). Ces risques doivent donc être pris en compte pour une utilisation des cellules iPS en thérapie, car il peut y avoir un risque de transformation tumorale des cellules.

Il est important de noter que les cellules iPS gardent la mémoire épigénétique de leur cellule d'origine, ce qui influe sur leur capacité à se différencier en type cellulaire particulier. En effet, même si la capacité de différenciation est extrêmement proche, toutes les lignées de cellules iPS réagissent différemment à ce processus. En effet, des études ont montré que des cellules iPS générées à partir de cellules de prostate avaient une meilleure efficacité pour se différencier en cellules de prostate, comparée à des cellules iPS obtenues à partir de fibroblastes de peau (Moad et al., 2013), ce qui illustre les différences épigénétiques existantes entre les lignées de cellules iPS, mais également l'importance du type cellulaire d'origine dans la différenciation.

La combinaison de différentes approches de caractérisation, qu'elles soient génétiques, membranaires, ou enzymatique, permet de déterminer si les cellules iPS générées sont bien pluripotentes. Cette première étape de caractérisation est nécessaire pour éliminer les clones iPS qui sont partiellement reprogrammés. Pour s'assurer que les cellules générées sont bien des cellules iPS, leur capacité de différenciation en cellules des trois feuillets embryonnaires doit ensuite être établie.

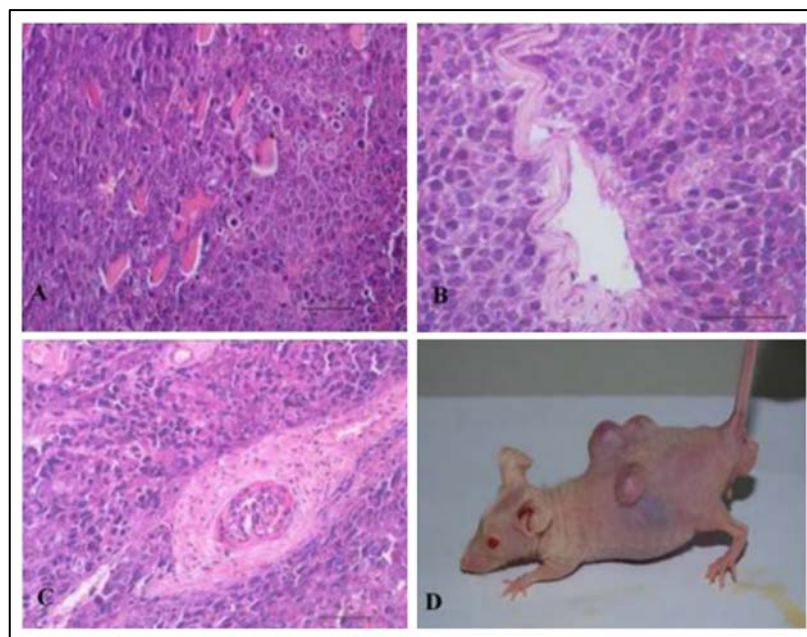
#### 4. Pluripotence

La pluripotence des cellules est caractérisée par l'expression de différents marqueurs, comme décrit avant, mais c'est également la capacité des cellules à se différencier en cellules des trois feuillets embryonnaires. Pour tester cette caractéristique, plusieurs tests fonctionnels sont possibles, incluant une caractérisation *in vitro*, par la formation de corps embryoides, ou

une caractérisation *in vivo*, par formation de tératomes, dans des souris immunodéprimées.

**a) Caractérisation *in vivo*, par formation de tératomes.**

Chez la souris, le test le plus strict est la démonstration de la transmission à la lignée germinale, après formation de souris chimériques (Sheridan et al., 2012). Pour les iPS humaines, ce test n'est pas réalisable, la formation de tératome représente le test le plus rigoureux. Les tératomes sont des tumeurs solides, caractérisées par leur croissance rapide, et composées de cellules différenciées organisées et formant des tissus représentatifs des trois feuillets embryonnaires (Figure 54). Ainsi, les tératomes présentent souvent des structures qui ressemblent à des organes, comme des dents, des cheveux, des muscles, du cartilage ou même des os (Sheridan et al., 2012).



**Figure 54 : Formation de tératomes *in vivo*, avec la présence de structures des trois feuillets embryonnaires.**

- (A) Tissu musculaire (mésoderme)
- (B) Tissu similaire à l'intestin (endoderme)
- (C) Follicule de cheveux (ectoderme)
- (D) Tératomes dans une souris immunodéficente (Adapté de Aldahmash et al., 2013).

La formation de tératomes est un outil puissant, permettant d'étudier la morphogénèse précoce dans des tissus organisés. La formation de tératomes est affectée

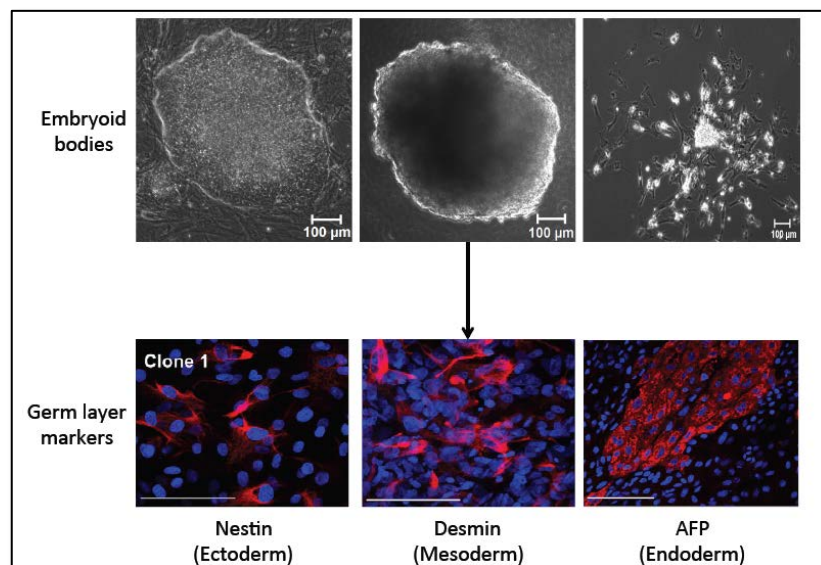
par trois facteurs différents : le type de cellules pluripotentes utilisées, le nombre de cellules injectées et le site d'injection. L'injection des cellules se fait généralement dans des sites particuliers, tels que l'injection intramusculaire, sous-cutanée, sous la capsule des testicules chez le mâle, ou sous la capsule rénale, chez une souris immunodéprimée, ce qui permet d'éviter le rejet des cellules. Le site d'injection ne semble pas, ou très peu, avoir d'impact sur le taux de formation des tératomes (Müller et al., 2010). Le nombre de cellules est également important pour la formation de tératomes. En effet, pour former un tératome complètement différencié chez l'animal, le nombre de cellules varie en fonction de la région d'injection (Fong et al., 2010). Après une période de formation, les tératomes sont récupérés et analysés pour déterminer la présence de cellules des trois feuilletts embryonnaires (Sheridan et al., 2012).

La formation de tératomes est donc un excellent moyen pour déterminer la pluripotence des cellules iPS *in vivo*. Cependant, des problèmes avec cette technique sont à noter. D'une part, le microenvironnement tissulaire influence la survie et la différenciation des cellules iPS injectées (Dressel, 2011). D'autre part, la formation de tératomes nécessite l'utilisation d'un grand nombre de souris (Figure 54D), ce qui peut être problématique vis à vis de la législation concernant l'expérimentation animale (Buta et al., 2013), mais a également un coût élevé alors qu'elle n'apporte que peu d'informations, et n'a pas de relevance clinique ou biologique significative. C'est pourquoi d'autres techniques de caractérisation de la pluripotence *in vitro* ont été développé.

#### ***b) Caractérisation in vitro, par la formation de corps embryoides.***

Une alternative à la formation de tératomes est une approche *in vitro*, impliquant la formation de corps embryoides (EB), à partir des cellules iPS. Les EB sont des agrégats tridimensionnels de cellules iPS en suspension, ce qui favorise la différenciation aléatoire en cellules des trois feuilletts embryonnaires (Jaenisch and Young, 2008). La formation des EB est une approche utilisée couramment dans des protocoles de différenciation de cellules iPS dans un lignage spécifique (Keller, 1995; Kurosawa, 2007), tel que le lignage hématopoïétique (Dang et al., 2002; Ng et al., 2005), neural (Sathananthan, 2011), ou cardiaque (Mohr et al., 2010; Sargent et al., 2009).

La caractérisation de la pluripotence à partir des EB nécessite des tests supplémentaires, par rapport à la formation de tératomes. D'une part, les EB doivent exprimer des marqueurs de différenciation des trois feuillets embryonnaires, comme la Desmine pour le mésoderme, la Nestine pour l'ectoderme ou l'AFP (Alpha FoetoProtein) pour l'endoderme mais également une expression des gènes associés avec la pluripotence réduite par rapport à des cellules non différenciées (Brambrink et al., 2008). L'expression de ces marqueurs peut être détectée après environ une semaine de différenciation. A la suite de la culture en suspension, les EB sont mis à adhérer pour que les cellules différenciées puissent sortir. L'expression des différents marqueurs peut alors être mesurée par expression génique ou immunofluorescence (Figure 55). Au cours de cette différenciation, les EB subissent des changements morphologiques qui ressemblent aux étapes précoces du développement, avant la gastrulation (Bader et al., 2001).



**Figure 55 : Formation de corps embryoides et expression de marqueurs des trois feuillets embryonnaires.**

Les cellules iPS non différenciées (photo de gauche) sont mis en différenciation. Après un temps de culture en suspension (photo du milieu), les EB sont mis à adhérer, et les cellules différenciées sortent (photo de droite). Les cellules différenciées expriment les marqueurs des trois feuillets embryonnaires, démontrant la pluripotence des cellules iPS générées (panel du bas). (Adapté de Pini et al., 2016 (panel du haut) et de Itzhaki et al., 2012 (panel du bas)).



En plus de l'analyse phénotypique, l'analyse histologique des EB peut révéler la formation de structures des trois feuillets embryonnaires, tout comme dans les tératomes (Itskovitz-Eldor et al., 2000). De plus, la formation d'EB permet d'étudier les fonctions cellulaires par électrophysiologie, ainsi que les interactions cellulaires (Buta et al., 2013).

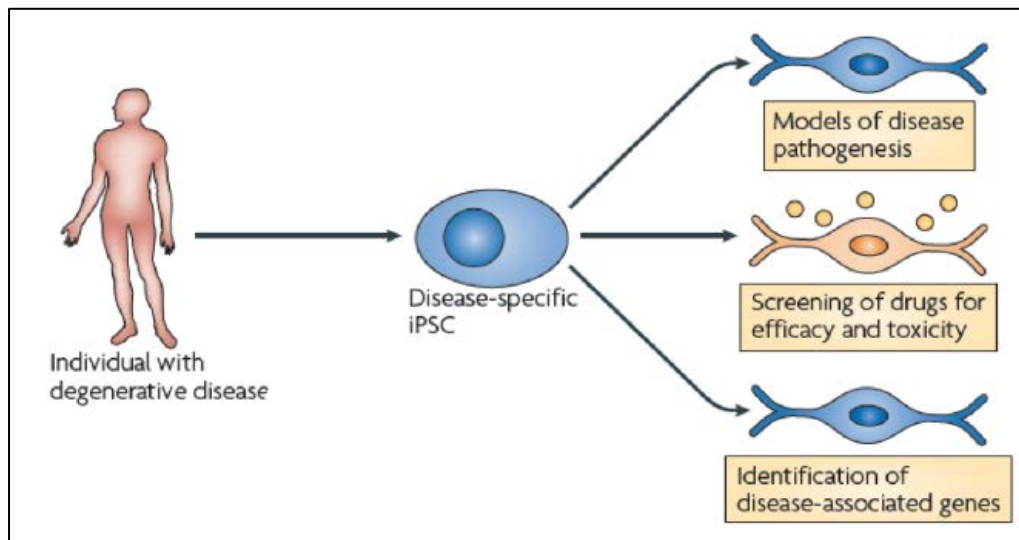
Bien que la formation d'EB soit une bonne alternative à la formation de tératomes, il semble que les interactions cellulaires dans les tératomes soient plus proches de la physiologie que dans les EB. En effet, la nutrition et l'apport sanguin est plus proche des conditions physiologiques dans les tératomes, du fait de l'implantation *in vivo* (Buta et al., 2013).

L'approche *in vivo* et *in vitro* présentent toutes deux des avantages et des inconvénients. Cependant, le premier but de ces approches est de caractériser la pluripotence des cellules iPS générées. Les EB sont donc une excellente alternative à l'utilisation de modèles animaux pour caractériser les iPS. Une fois cette étape de caractérisation accomplie, les cellules iPS peuvent être utilisées pour comprendre des mécanismes de différenciation, modéliser des maladies rares ou réaliser un criblage de molécules à visée thérapeutique.

#### **F. Utilisation des cellules iPS.**

Le développement des cellules iPS a permis d'ouvrir la voie à de nouvelles perspectives thérapeutiques. En effet, la pluripotence des cellules en fait un excellent modèle pour tester des nouveaux composés à visée thérapeutique, identifier des gènes associés à différentes pathologies grâce aux techniques de « gene editing » et enfin utiliser des cellules de patients pour générer des cellules iPS qui pourront servir à modéliser différentes pathologies (Figure 56 ; Fairchild, 2010).





**Figure 56 : Utilisation des cellules iPS, qu'elles soient spécifiques de différentes pathologies, ou issues d'un donneur sain.**

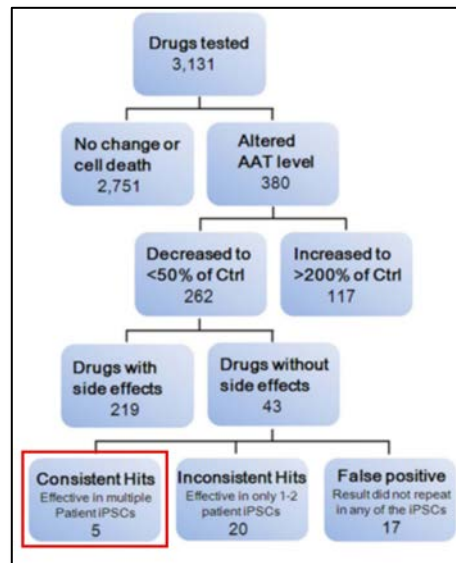
La génération de cellules iPS à partir d'individus ayant des pathologies est utile pour modéliser la maladie, et comprendre la physiopathologie. En effet, la différenciation des cellules iPS en cellules affectées par la pathologie peut récapituler certains aspects de celle-ci in vitro, et permettre l'élaboration de traitements. (Adapté de Fairchild, 2010).

A terme, les cellules iPS pourront être utilisées en thérapie humaine, soit en remplaçant des cellules malades, soit en reconstruisant un organe sain, à partir de cellules iPS faites à partir du patient (autologue) soit à partir de cellules iPS d'un donneur (allogreffe). Cependant, malgré les avancées majeures dans la compréhension des processus de différenciation, et le début de certains essais cliniques de greffe de cellules iPS, nous sommes encore loin de la régénération tissulaire à partir de cellules souches pluripotentes. Les trois aspects de l'utilisation des cellules iPS sont intimement liés, car la génération de cellules iPS spécifiques d'une maladie permet l'élaboration de traitement contre celle-ci ainsi que l'identification des gènes associés dans le cas de maladies sporadiques.

### 1. Criblage de composés à visée thérapeutique

Les cellules iPS peuvent être utilisées pour identifier et développer de nouveaux composés thérapeutiques. En effet, l'utilisation de cellules iPS pathologique permet dans un premier temps de différencier les cellules en différents types cellulaires affectés par la maladie, puis de tester différents composés, pour voir lesquels améliorent le phénotype de la maladie. Par exemple, cette technique a été utilisée à partir de cellules

iPS d'un patient atteint de déficience en A1AT (Alpha1 Anti-Trypsin). Cette pathologie est une des pathologies hépatiques les plus communes, et peut progresser en cirrhose de foie (Choi et al., 2013). A l'heure actuelle, aucune autre thérapie que la transplantation de foie n'est applicable. L'utilisation de cellules iPS a permis dans un premier temps de différencier ces cellules en hépatocytes, puis de tester plus de 3000 composés susceptibles d'améliorer le phénotype de la pathologie (Figure 57).



**Figure 57 : Stratégie de criblage de drogues, à partir de cellules iPS.**

A chaque étape, des composés sont éliminés en fonction de leur effet sur les cellules, jusqu'à n'arriver qu'à cinq composés à la fin. (D'après Choi, 2013).

Après plusieurs étapes visant à exclure les composés qui ne répondent pas à certains critères, cinq composés améliorant le phénotype des cellules iPS ont été identifiés, et pourront être utilisés en essais cliniques, en tant que nouveaux traitements pour cette maladie (Choi et al., 2013). D'autres études ont également utilisé cette stratégie pour identifier de nouveaux composés susceptibles de traiter des maladies, telles que la sclérose latérale amyotrophique (ALS), suggérant que cette stratégie peut être adaptée à de nombreuses pathologies (Höing et al., 2012; Yang et al., 2013).

Au cours des dernières années, de nombreux rapports ont révélé des effets secondaires de composés pharmaceutiques sur le cœur, en induisant des arythmies associées avec des arrêts cardiaques, ce qui a conduit au retrait de certains médicaments du commerce mais également au durcissement de la législation sur les essais cliniques

(Redfern et al., 2003). En effet, le cœur est particulièrement sensible aux effets non spécifiques et toxiques des molécules qui peuvent donc être mortelles. Les cellules iPS peuvent être utilisées pour tester la toxicité de certaines molécules pharmaceutiques, pendant leur différenciation cardiaque. A la fin de la différenciation, des études électrophysiologiques sont menées pour déterminer si le composé testé a un effet sur les propriétés électriques du cœur (Braam et al., 2010). La distinction entre des effets spécifiques et non spécifiques de composés pharmaceutiques à des étapes précoces de leur développement peut ainsi accélérer leur essai clinique, augmenter la sécurité quant à l'utilisation de ces drogues mais également réduire leur coût de développement (Braam et al., 2010).

Enfin, des cellules iPS spécifiques d'une maladie peuvent aider à identifier de nouvelles cibles d'intérêt thérapeutique. En effet, l'utilisation de siRNA (small interfering RNA) peut permettre de déterminer si la diminution de l'expression d'un gène a un effet bénéfique sur le phénotype de la maladie. Une fois cette cible identifiée, l'utilisation de molécules inhibant celle-ci, peuvent être un traitement efficace contre la maladie. Alternativement, des molécules dont les cibles sont connues peuvent être utilisées pour déterminer l'implication de leur cible dans la pathophysiologie de la maladie (Sterneckert et al., 2014).

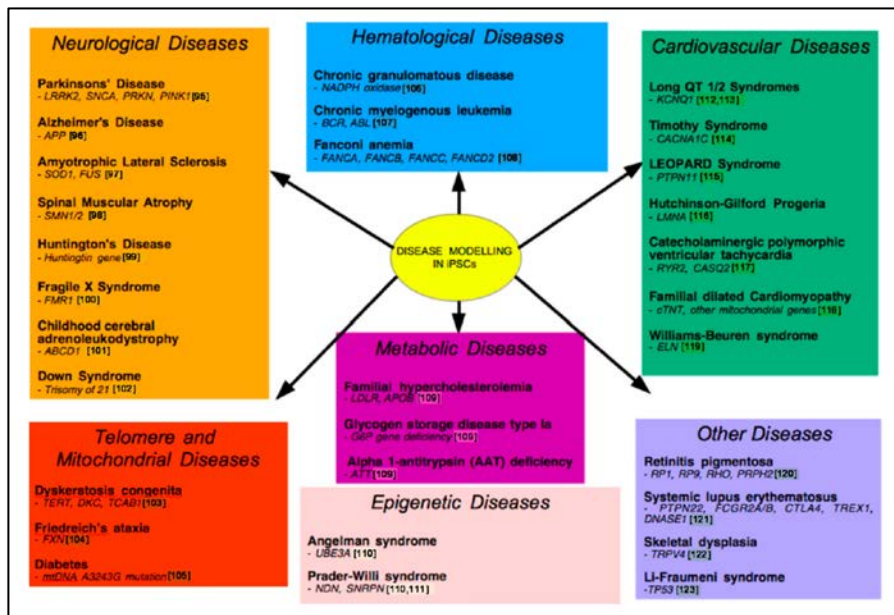
L'utilisation de cellules iPS peut donc permettre l'identification de nouveaux composés thérapeutiques. Cependant, ces cellules peuvent surtout servir à modéliser des maladies, pour comprendre leur mécanisme d'action, ou remplacer le gène défectueux, mais également à identifier des gènes associés aux maladies dont les causes génétiques ne sont pas connues.

## 2. Modélisation de maladie et gene editing

Avant d'utiliser les cellules iPS pour modéliser des maladies, les cellules générées doivent être caractérisées pour, d'une part, s'assurer que le processus de reprogrammation n'a introduit aucune mutation (Gore et al., 2011) mais également, que les cellules iPS générées présentent bien toutes les caractéristiques des cellules souches (Seah et al., 2015) En effet, la moindre anomalie pourrait changer le phénotype des cellules iPS générées, ainsi que leur comportement au cours de la différenciation.

### a) Modélisation de maladie

De nombreuses maladies, affectant différents organes du corps humain, ont été modélisé par la génération de cellules iPS, que ce soit des maladies Mendéliennes ou complexes (Figure 58), indiquant que des cellules iPS peuvent être utilisées dans des maladies dont la cause génétique n'est pas entièrement connue. Une fois les cellules iPS générées, elles doivent être différenciées en cellules d'intérêt, par des protocoles de différenciation bien établis (Chun, 2010).

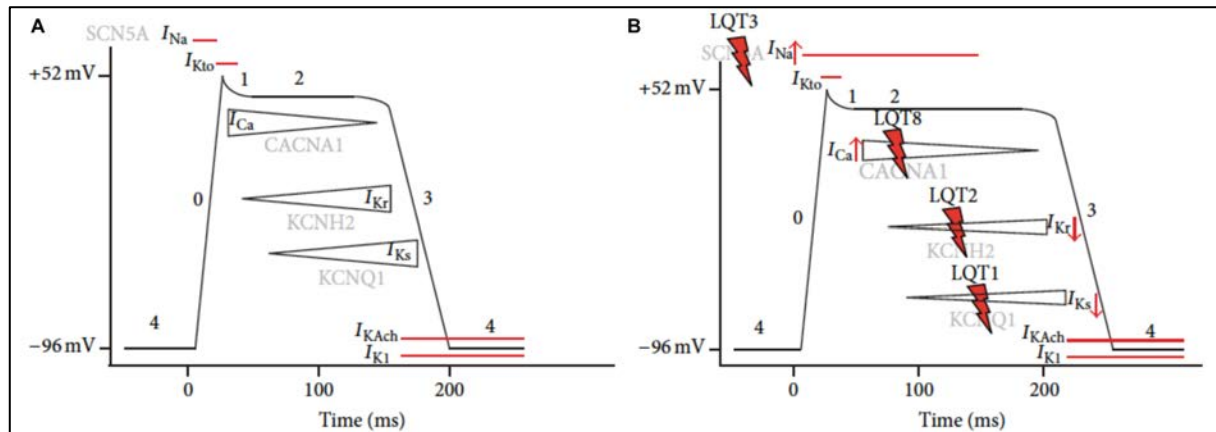


**Figure 58 : Représentation des différentes maladies qui ont été modélisées, par utilisation des cellules de patients ou les techniques de gene editing.**

(D'après Seah, 2015).

De nombreuses maladies ont été modélisées grâce aux cellules iPS, notamment des maladies métaboliques, telles que l'hypercholestérolémie familiale, la GSDIa (Glycogen Storage Disease type Ia) ou la déficience en AAT (Rashid et al., 2010), des maladies neurodégénérative, comme la maladie de Parkinson (Nguyen et al., 2011) ; ou des maladies cardiovasculaires, comme les syndromes du QT longs, affectant la fonction de canaux ioniques. Des mutations dans le syndrome du QT long (LQTS) provoquent une augmentation des courants dépolarisants comparés aux courants repolarisants, ce qui rallonge l'intervalle QT (Müller et al., 2013). Il existe 13 types de LQTS, affectant une protéine particulière. A l'heure actuelle, quatre LQTS ont été modélisées grâce aux

cellules iPS : LQTS de type 1 (Moretti et al., 2010) ; LQTS de type 2 (Itzhaki et al., 2011) ; LQTS de type 3 (Malan et al., 2011) et LQTS de type 8 (Yazawa and Dolmetsch, 2013). Ces quatre LQTS affectent quatre types de canaux ioniques différents, jouant un rôle dans différentes phases du potentiel d'action cardiaque (Figure 59 ; Müller et al., 2013).



**Figure 59 : Représentation schématique d'un potentiel d'action cardiaque, des gènes associés aux différents courants des différentes phases de ce potentiel d'action (A) et du LQTS associé à la perte de fonction de chacun d'entre eux (B)**

(Adapté de Müller, 2013).

La modélisation de ces différents LQTS a permis d'une part de récapituler les phénotypes retrouvés chez les patients et donc de pouvoir étudier la physiopathologie de la maladie, mais également de tester de nouvelles drogues qui pourraient améliorer les conditions de vie des patients (Müller et al., 2013). Cependant, l'utilisation des cellules iPS pour modéliser les maladies cardiovasculaires présente des limites car d'une part les cardiomyocytes obtenus après différenciation ont des caractéristiques électriques « immatures » proches des cardiomyocytes fœtaux, comme par exemple le courant  $I_{K1}$ , associé au canal potassique Kir2.1, très faible ; mais une hétérogénéité au sein de la culture, car la pureté de la culture en cardiomyocytes n'excède pas 50%, indiquant que celle-ci contient plusieurs sous-populations de cardiomyocytes, avec chacune des caractéristiques particulières dans leur potentiel d'action (Müller et al., 2013).

Les cellules iPS sont donc un bon outil pour modéliser les maladies génétiques, mais également celles dont la cause n'est pas connue. En effet, les cellules iPS sont dérivées de patients avec un phénotype observable, qui pourra être étudié pendant les

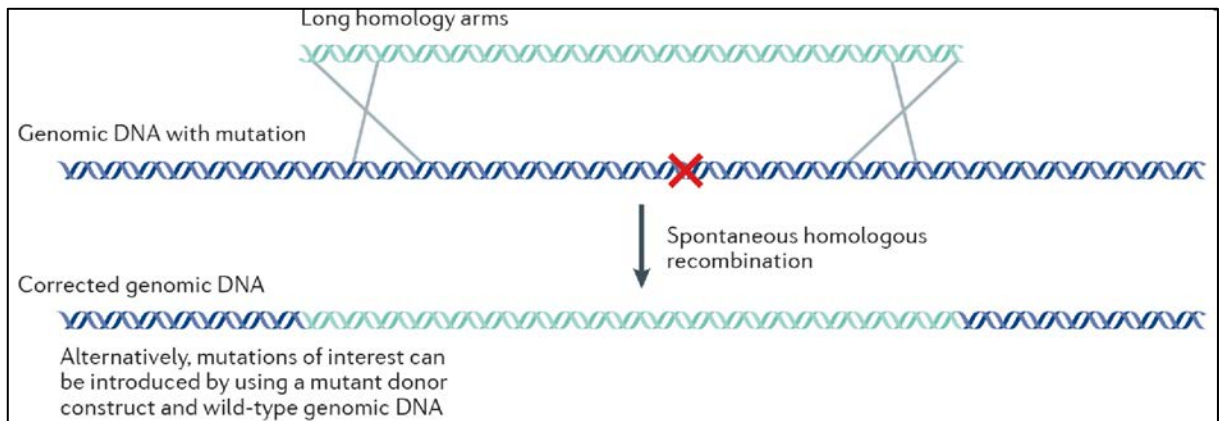
processus de différenciation, et aboutir à une meilleure compréhension de la maladie. Cependant, des cellules de patients ne sont pas toujours accessibles, dû aux contraintes de prélèvements, mais également au fait que certains patients disparaissent avant de pouvoir obtenir leurs cellules. De plus, chaque patient peut être porteur de mutations supplémentaires interconnectées à la mutation responsable de la maladie (Sterneckert et al., 2014). La mesure de l'impact d'une seule mutation parmi toutes est donc une tâche compliquée. C'est pourquoi de nouvelles techniques de gene editing ont été développées et adaptées aux cellules iPS

### *b) Gene editing*

Les techniques de gene editing sont des processus par lesquels des changements, tels que des insertions, délétions, mutations ponctuelles ou translocations, sont introduits dans la séquence d'ADN génomique de la cellule cible. Ces changements se font grâce à la génération d'une cassure double brin dans l'ADN, ce qui enclenche des mécanismes de réparation de l'ADN, comme l'HDR (Homology-Direct Repair) ou la NHEJ (Non-Homologous End Joining). Le mécanisme de la NHEJ est imprécis et provoque des délétions ou des insertions dans l'ADN, ce qui peut entraîner des décalages de la phase de lecture ou des codons stop prématurés (Bibikova et al., 2002; Perez et al., 2008). A l'inverse, si la cassure a lieu en présence d'un ADN double brin homologue exogène, celui-ci sera incorporé dans l'ADN de la cellule cible, par le mécanisme d'HDR (Bibikova et al., 2001, 2003), ce qui rend cette technique utile pour intégrer des séquences spécifiques dans l'ADN cible, introduire ou remplacer des mutations associées à des maladies (Rong et al., 2014; Sterneckert et al., 2014).

A l'origine, les techniques de gene editing utilisaient la recombinaison homologue spontanée, dans les cellules ES de souris. Bien que cette technique puisse être adaptée aux cellules ES et iPS humaines (Zwaka and Thomson, 2003), elle nécessite l'utilisation d'un long brin d'ADN homologue (de plus de 10 kb), intégré dans un chromosome artificiel (Figure 60 ; Heaney et al., 2004; Xue et al., 2009).

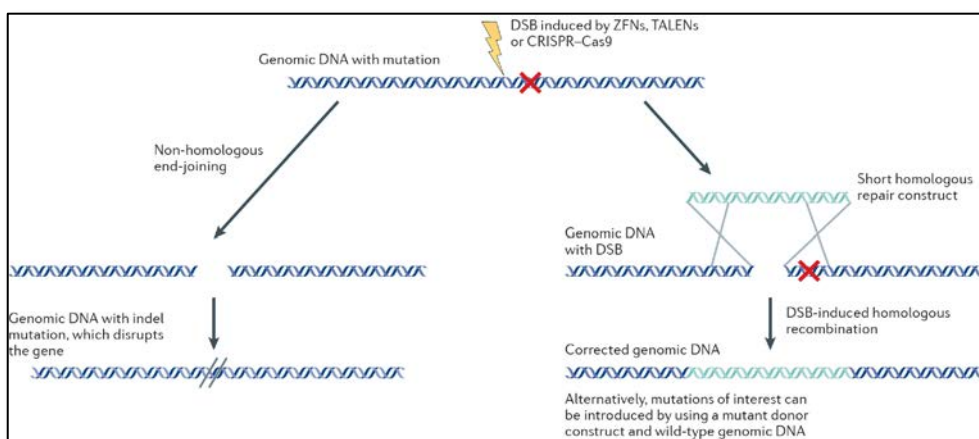




**Figure 60 : Gene editing dans les cellules ES, par la technique de la recombinaison homologue spontanée**

(Adapté de Sternecker, 2014).

Cependant, l'efficacité de ce processus est très faible (<1%), ce qui a encouragé le développement de technique de recombinaison assistée par des nucléases. Des protéines de fixation à l'ADN, reconnaissant des séquences spécifiques, telles que des protéines à doigts de zinc (ZNF), des TALEs (Transcription Activator-like Effectors) ou la protéine Cas9 (CRISPR Associated protein 9) du système Cas9/CRISPR, ont été adaptées pour introduire de manière spécifique une cassure de l'ADN double brin, pour activer les mécanismes de HDR ou NHEJ (Figure 61 ; Heaney et al., 2004; Xue et al., 2009; Zwaka and Thomson, 2003).



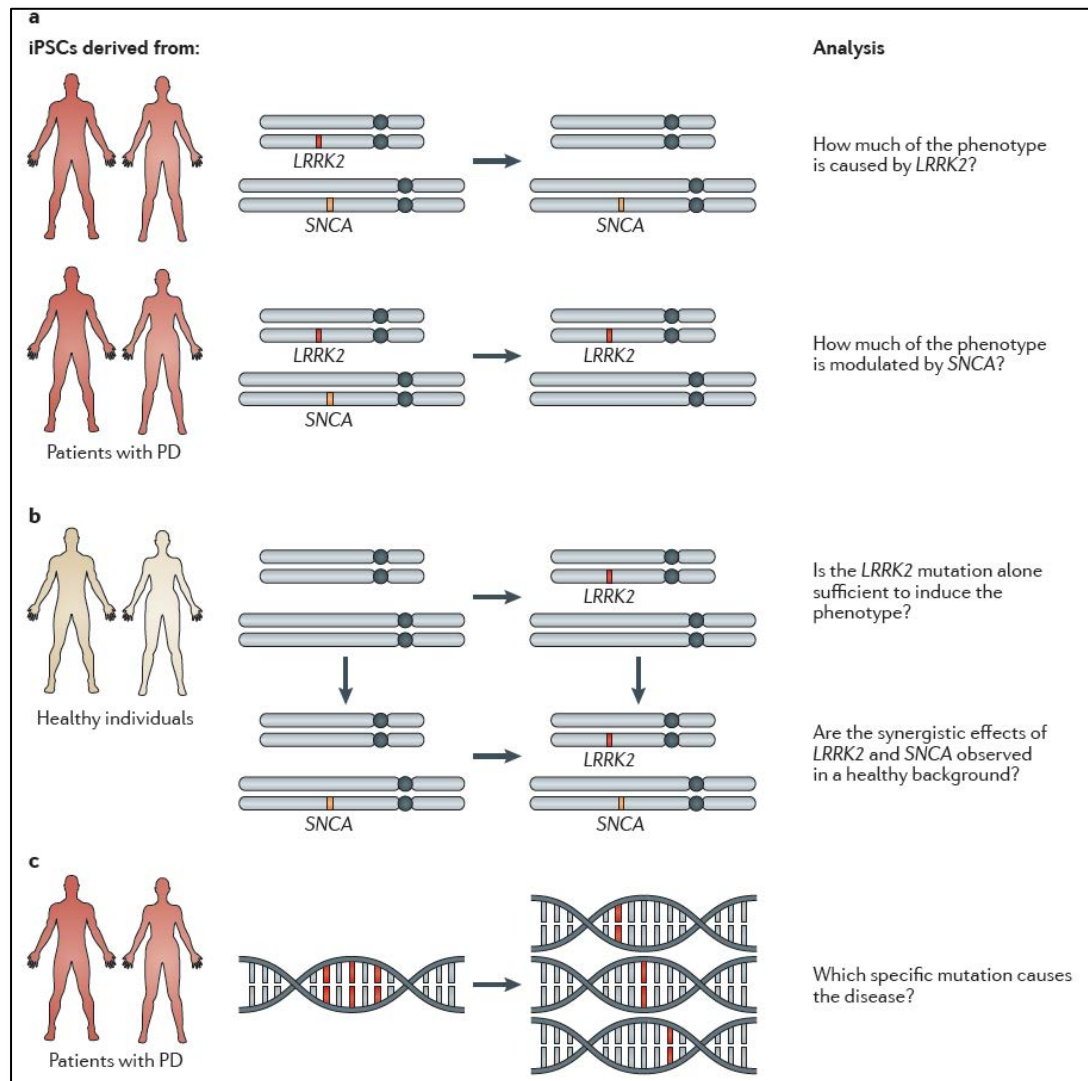
**Figure 61 : Gene editing dans les cellules ES et iPS, par des techniques de cassure spécifique de l'ADN**

(Adapté de Sternecker, 2014).

Lorsque ces cassures spécifiques se font sans ADN double brins homologues, le mécanisme de la NHEJ est activé, ce qui conduit à l'introduction de mutation d'insertion-délétion dans l'ADN cible, provoquant la perte d'expression du gène cible. A l'inverse, lorsque cette cassure spécifique se fait en présence d'un petit ADN double brin homologue (<1 kb), cela active le mécanisme de HDR, ce qui introduit dans l'ADN cible le brin d'ADN exogène.

Les techniques de gene editing ont été utilisées avec les cellules iPS pour créer des modèles de maladies en introduisant des mutations spécifiques, ou pour étudier l'implication d'un locus particulier dans la physiopathologie de maladies multigéniques. En effet, ces techniques peuvent être utilisées pour modifier des *loci* spécifiques et déterminer la contribution de chaque locus dans la physiopathologie. Le concept de ces différentes approches est représenté sur la Figure 62.





**Figure 62 : La combinaison des techniques de gene editing et de cellules iPS peut être utilisée pour évaluer l'implication d'un locus particulier dans la maladie.**

(D'après Sternecker, 2017).

Par exemple, la maladie de Parkinson est causée par des mutations sur le gène *LRRK2* et *SNCA*. Ces deux allèles peuvent être édités individuellement dans des cellules iPS de patients pour discriminer les contributions des mutations sur *LRRK2* de celles sur *SNCA* (Figure 62a ; Sternecker et al., 2014). De la même manière, chaque mutation peut être introduit individuellement dans des cellules iPS contrôles pour déterminer si une seule mutation ou une combinaison de plusieurs sont nécessaires pour induire le phénotype de la maladie et s'il y a un effet synergique entre ces mutations (Figure 62b, Sternecker et al., 2014. Enfin, si plusieurs mutations sont identifiées sur le génome d'un

patient, les techniques de gene editing peuvent être utilisées pour déterminer quelle mutation cause la maladie (Figure 62c, Sternecker et al., 2014).

Les cellules iPS permettent donc de décortiquer les mécanismes moléculaires des maladies aussi bien Mendéliennes que multigéniques. Ces techniques ont également été utilisées pour corriger les mutations responsables de maladies dans des iPS. Différentes études démontrent que la correction du gène associé à une maladie monogénique permet de corriger le phénotype de la maladie, et apportent donc la preuve de principe que cette mutation est la seule cause de la pathologie chez l'individu. La correction du gène *A1AT* par gene editing a permis aux hépatocytes de synthétiser une protéine A1AT fonctionnelle aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* (Choi et al., 2013; Yusa et al., 2011). D'autres maladies ont été soignées grâce au remplacement du gène muté dans les iPS. L'ostéopétrose autosomale récessive est une maladie rare et mortelle, provoquant une augmentation de la masse osseuse, et du risque de fractures, due à un arrêt de résorption de l'os par les ostéoclastes (Neri et al., 2015). La mutation la plus couramment retrouvée est une perte de fonction de la sous-unité  $\alpha 3$  de la pompe à proton vacuolaire codée par le gène *TCIRG1* (T cell immune regulator 1). A l'heure actuelle, le seul traitement est la greffe de moelle osseuse. La correction du gène *TCIRG1* dans des cellules iPS de souris ostéopétrotiques restaure la capacité de résorption des ostéoclastes (Neri et al., 2015). Les cellules iPS peuvent donc être utilisées pour corriger le gène défectueux et améliorer le phénotype de la maladie lorsque ces cellules sont greffées chez des souris.

Malgré la modélisation de nombreuses maladies, l'utilisation des cellules iPS continue à être limitée par certains facteurs, comme la mémoire épigénétique, l'absence de protocoles de différenciation efficaces et de variabilité génétique entre les cellules. De plus, il reste difficile de modéliser des maladies épigénétiques, les maladies impliquant plusieurs types cellulaires ou les maladies influencées par le microenvironnement, avec les cellules iPS. En effet, bien que les cellules iPS et ES soient très similaires, le profil de méthylation de l'ADN des cellules iPS ressemble à celui de la cellule d'origine, ce qui peut orienter la différenciation des cellules iPS dans le lignage de leur cellule de départ (Kim et al., 2010). Cette mémoire épigénétique peut affecter les capacités de différenciation des cellules iPS en cellules d'intérêt thérapeutique.

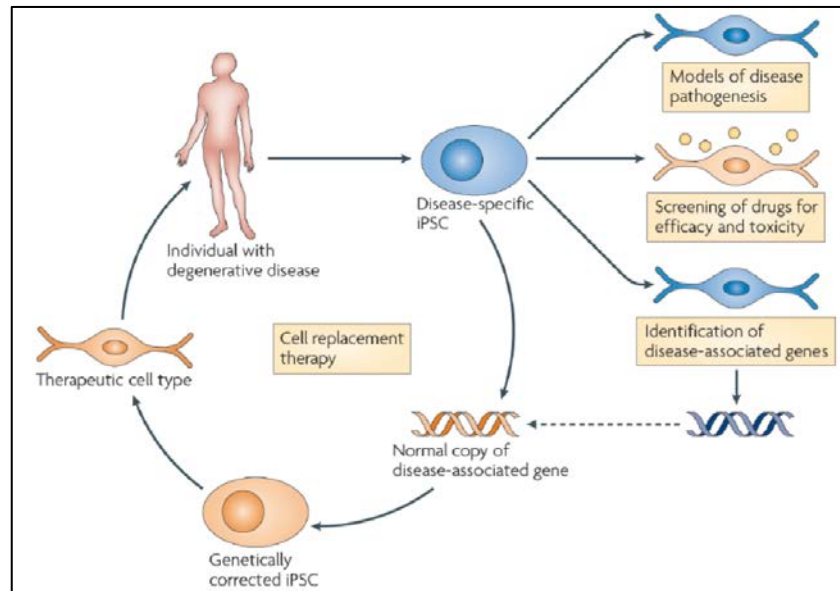
L'utilisation des cellules iPS est actuellement limitée aux types cellulaires pour lesquels un protocole de différenciation est disponible. En effet, la différenciation des

cellules iPS en cellules neurales est bien documentée, tandis que la différenciation des cellules iPS en cellules musculaires (myotubes) est très difficilement réalisable sans la surexpression de facteurs myogéniques (Osafune et al., 2008).

La possibilité de générer des cellules iPS spécifiques de pathologies est utile pour étudier les mécanismes moléculaires de ces maladies, mais est également utile pour générer des modèles d'études *in vitro*, déterminer l'implication de différents *loci*, ou la modélisation de maladies multigéniques, difficilement modélisables chez la souris (Seah et al., 2015; Sternecker et al., 2014). En effet, l'utilisation de cellules iPS humaines présente de nombreux avantages par rapport à la souris. D'une part, l'utilisation de cellules humaines pour modéliser des maladies est plus proche de la physiologie humaine que l'utilisation de modèles animaux. De plus, l'utilisation de cellules iPS permet de refléter plus efficacement la toxicité et l'efficacité des traitements actuels, mais elles permettent aussi de tester de nouveaux composés. A l'heure actuelle, de nombreuses molécules sont testées initialement chez l'animal, mais ce processus peut amener des faux positifs et négatifs. Par exemple, des molécules testées chez la souris permettent d'améliorer le phénotype d'une maladie, mais n'ont absolument aucun effet chez l'homme. De plus, la toxicité des molécules diffère entre les animaux, ce qui rend le modèle animal inapproprié pour le criblage de molécules (Singh and Gupta, 1985).

Enfin la possibilité de corriger les gènes responsables de maladies, mais également l'utilisation de cellules iPS des patients pour les soigner, font des cellules iPS un outil formidable pour la thérapie cellulaire. Récemment, des études ont montré qu'il était également possible d'utiliser les cellules iPS pour la reconstruction tissulaire. La co-culture des cellules iPS avec des cellules MSC humaines et des cellules endothéliales permet la formation d'un bourgeon hépatique, présentant les marqueurs hépatique mais également capable de se vasculariser et d'être fonctionnel une fois greffé chez une souris immunodéficente (Takebe et al., 2013). Le système doit encore être amélioré, notamment pour n'utiliser que des cellules iPS, mais ces travaux ouvrent la porte à des perspectives thérapeutiques formidables. En 2013, le premier essai clinique avec greffe de cellules iPS a été mené au Japon, pour traiter la dégénérescence maculaire liée au vieillissement. Après génération de cellules iPS spécifiques du patient, ces cellules ont été différenciées en épithélium rétinien pigmentée, caractérisées pour éviter tout problème tumorigénique, puis greffées chez le patient. Trois ans après l'opération, le patient ne présente aucun effet secondaire et montre une amélioration de son acuité

visuelle. Les cellules iPS sont donc un formidable outil thérapeutique, apportant de réels espoirs pour la régénération tissulaire, mais également la thérapie personnalisée (Figure 63).



**Figure 63 : Utilisation des iPS en thérapie humaine.**

(D'après Fairchild, 2010).

L'utilisation des cellules iPS en thérapie devra se faire dans un cadre très contrôlé, car il a été montré que même dans un système autologue, les cellules iPS peuvent être rejetées, dû à la réactivation d'antigène embryonnaire au cours du processus de reprogrammation, ou au processus de reprogrammation lui-même (Cao et al., 2014). L'utilisation de cellules tolérogéniques, telles que les MSC, devrait empêcher le rejet de greffe. En effet, les cellules MSC présentent une activité immunosuppressive, qui limite la réponse immunitaire lorsqu'elles sont greffées. La transplantation de MSC, ou de cellules tolérogéniques, en même temps que les cellules d'intérêts devrait empêcher tout rejet du greffon. Des travaux sont en cours pour valider cette hypothèse.

Au cours de mes travaux de thèse, j'ai généré des cellules iPS à partir de cellules de patients atteints par le syndrome d'Andersen. Après les avoir caractérisées, j'ai pu utiliser ces cellules pour étudier l'implication du canal potassique Kir2.1 au cours de la morphogenèse osseuse.

# Résultats

---

Les modèles d'étude du syndrome ont montré leurs limites : les modèles *in vivo* sont létaux, ou nécessitent l'invalidation de plusieurs gènes, tandis que les modèles *in vitro* ont des capacités de différenciation limitées. Grâce à une collaboration avec l'hôpital de Nice, mon laboratoire de thèse a eu accès à des biopsies musculaires de patients atteints par le syndrome d'Andersen, et a pu utiliser ces biopsies pour étudier les problèmes musculaires associés à la maladie. Cependant, l'absence de modèle d'étude complet de la perte de fonction du canal Kir2.1 m'a conduit au cours de ma thèse à aborder trois grands axes de recherche :

1. Dans un premier temps, j'ai généré des cellules souches pluripotentes induites (iPS) à partir de myoblastes de patients atteints du syndrome d'Andersen, et j'ai validé leur utilisation comme modèle de cette pathologie (Article numéro 1, Stem Cells and Development).
2. Dans un second temps, j'ai utilisé ces cellules iPS afin d'étudier l'implication du canal Kir2.1 dans la morphogenèse osseuse, *via* la différenciation des cellules iPS en cellules souches mésenchymateuses (MSC), puis en ostéoblastes. (Article numéro 2, en préparation)
3. Enfin, j'ai pu différencier les cellules MSC contrôle et Andersen en chondrocytes, et étudier le rôle du canal Kir2.1 dans ce processus (Article numéro 3, en préparation).

L'ensemble de mes travaux de thèse a permis de montrer que d'une part la génération de cellules iPS à partir de myoblastes de patients atteints par le syndrome d'Andersen est un bon modèle afin d'étudier la physiopathologie de cette maladie. D'autre part, j'ai pu mettre en évidence que la perte de fonction du canal Kir2.1 entraînait une altération de tout le processus d'ossification puisque les cellules de patients présentent un défaut de différenciation en ostéoblastes et en chondrocytes, ce qui pourrait expliquer les malformations osseuses associées au syndrome d'Andersen.

## Article 1 : Modeling Andersen's syndrome in human induced Pluripotent Stem cells

Le syndrome d'Andersen est une maladie rare, caractérisée par une triade de symptômes : paralysie périodique, arythmie ventriculaire et anomalies du développement. La plupart des patients présentent une mutation sur le canal potassique à rectification entrante Kir2.1. Ce canal joue un rôle central dans le maintien du potentiel de repos des tissus excitables, comme le cœur ou le muscle. Cependant, son rôle dans le tissu osseux n'est pas connu.

J'ai pu générer des cellules iPS à partir de cellules d'un patient Andersen, porteur de la mutation C154Y, mais également d'individus sains. Pour effectuer la reprogrammation, les cellules ont été infectées avec un lentivirus contenant une cassette de reprogrammation avec les quatre gènes *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* et *c-Myc*. Les cellules iPS générées sont capables d'auto-renouvellement mais expriment également des marqueurs typiques des cellules souches embryonnaires, aussi bien génétiques, tels que *Oct4*, *Sox2* et *Nanog*, que membranaires, tels que SSEA4 et TRA-1-81. De plus, tout comme les cellules souches embryonnaires, les cellules iPS générées présentent une forte activité phosphatase alcaline. Enfin, les cellules iPS de patients ont toujours la mutation C154Y sur le gène *KCNJ2*, démontrant que le processus de reprogrammation n'a pas affecté la mutation associée avec le syndrome d'Andersen, tandis que les cellules iPS contrôles présentent un gène *KCNJ2* normal.

Pour confirmer la présence d'autres caractéristiques des cellules souches embryonnaires, nous avons étudié les capacités de différenciation des cellules iPS générées par la formation de corps embryoides, et démontré que nos cellules iPS, aussi bien contrôles qu'Andersen, pouvaient se différencier en cellules des trois feuillets embryonnaires, et donc étaient bien pluripotentes. Les cellules iPS générées ont donc bien toutes les caractéristiques des cellules souches embryonnaires, à savoir auto-renouvellement et pluripotence, indiquant que le canal Kir2.1 n'intervient pas pendant le processus de reprogrammation, mais également lors des phases précoces du développement. En revanche, après différenciation spontanée par l'intermédiaire des corps embryoides, les cellules iPS Andersen présentent une expression de *RUNX2* qui est fortement réduite par rapport aux cellules contrôles. *RUNX2* est le master gene de la

différenciation osseuse, et est nécessaire à l'expression des gènes impliqués dans la production et la synthèse de la matrice osseuse. Son expression réduite provoque une expression diminuée de tous les gènes sous son contrôle et donc une altération de la différenciation osseuse. En revanche, aucune différence dans le niveau d'expression de *KCNJ2* n'est observée entre les cellules iPS contrôles et Andersen, suggérant que seule la fonction du canal est importante pour l'expression correcte de *RUNX2*.

Il est intéressant de noter que l'expression de la phosphatase alcaline n'est pas différente entre les cellules iPS Andersen non différenciées et différenciées. Ceci suggère qu'un canal Kir2.1 fonctionnel n'est pas requis pour l'expression de la phosphatase alcaline dans les cellules pluripotentes. La phosphatase alcaline retrouvée dans le tissu osseux est la même que dans les cellules pluripotentes : il s'agit de la phosphatase alcaline non spécifique. La similitude dans le niveau d'expression entre les cellules non différenciées et différenciées suggère que le canal Kir2.1 intervient tardivement au cours du développement, et que l'activité de la phosphatase alcaline dans les cellules pluripotentes ne dépend pas de la fonctionnalité du canal Kir2.1.

L'ensemble de ces résultats indique que le canal Kir2.1 intervient lors des phases tardives de la différenciation, probablement dans des types cellulaires spécifiques. L'expression des marqueurs ostéoblastiques réduite dans les cellules iPS de patients, comparée aux cellules iPS contrôles, récapitule un des phénotypes associés avec le syndrome d'Andersen et suggère que ces cellules iPS seraient un bon outil pour modéliser ce syndrome (Article 1, Stem Cells and Development).



## Modeling Andersen's Syndrome in Human Induced Pluripotent Stem Cells

Jonathan Pini,<sup>1</sup> Matthieu Rouleau,<sup>1</sup> Claude Desnuelle,<sup>2-4</sup> Sabrina Sacconi,<sup>2-4</sup> and Saïd Bendahhou<sup>1</sup>

Andersen's syndrome (AS) is a rare disorder characterized by a triad of symptoms: periodic paralysis, cardiac arrhythmia, and bone developmental defects. Most of the patients carry mutations on the inward rectifier potassium channel Kir2.1 encoded by the *KCNJ2* gene. *kenj2* knockout mice are lethal at birth preventing, hence, thorough investigations of the physiological and pathophysiological events. We have generated induced pluripotent stem (iPS) cells from healthy as well as from AS patient muscular biopsies using the four-gene cassette required for cellular reprogramming (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, and *c-Myc*). The generated AS-iPS cells exhibited the gold standard requirement for iPS cells: expression of genetics and surface pluripotent markers, strong alkaline phosphatase activity, self-renewal, and could be differentiated by the formation of embryoid bodies (EBs) into the three germ layers. Sequencing of the entire coding sequence of the *KCNJ2* gene, in AS-iPS cells, revealed that the reprogramming process did not revert the Andersen's syndrome-associated mutation. Moreover, no difference was observed between control and AS-iPS cells in terms of pluripotent markers' expression, self-renewal, and three germ layer differentiation. Interestingly, expression of osteogenic markers are lower in EB-differentiated AS-iPS compared to control iPS cells. Our results showed that the Kir2.1 channel is not important for the reprogramming process and the early step of the development in vitro. However, the osteogenic machinery appears to be hastened in AS-iPS cells, strongly indicating that the generated AS-iPS cells could be a good model to better understand the AS pathophysiology.

### Introduction

ANDERSEN'S SYNDROME (AS) is a rare and complex disorder, where patients exhibit a mixed clinical phenotype affecting skeletal muscle (with periodic paralyses), heart (prominent U wave), and bone (hypertelorism, broad forehead, short palpebral fissure, mandibular hypoplasia, cleft palate, mild facial asymmetry, dental anomalies, small hands and feet, two or three toes syndactyly and clinodactyly, and low set ears) [1].

Two genes have been associated with AS: *KCNJ2* and *KCNJ5* [2,3]. Over 30 mutations were identified on the *KCNJ2* gene, and led to a loss of function of the Kir2.1 channel with a dominant negative effect [2,4], and one mutation on the *KCNJ5* gene that was postulated to inhibit Kir2.1 channel function [3]. The role of the channel and the functional consequence of its loss of function have been investigated in vitro, in transfected cells or ex vivo in patient cells [4,5]. Myoblasts from *vastus lateralis* muscle biopsies of AS patients or control individuals were isolated and the

electrical properties of the channel were studied. These data confirmed those found in heterologously transfected cells.

Mutations in Kir2.1 led to a complete loss of the corresponding current in human myotubes [5]. However, in vivo investigations of the channel were difficult, because Kir2.1 knockout mice died few hours after birth because of a cleft of the secondary palate [6]. In a recent study, *kenj2* knockout newborn mice showed that the anterior and posterior palatine process and vomer bones were reduced in size; they also suffered from digit defects, and apparent decreased ossification in the pups [7]. The use of induced pluripotent stem (iPS) cells may turn out to be a good alternative to these animal models [8,9], in particular, to investigate the role of the dominant loss of Kir2.1 function associated with the mutations reported in humans.

In this study, we report for the first time the generation of functional iPS cells obtained from AS patients. This work shows that the functional Kir2.1 channel is not important for the reprogramming and the early steps of the development in vitro, but it is crucial during osteogenesis.

<sup>1</sup>UMR7370 CNRS, LP2M, Labex ICST, Faculté de Médecine, University Nice Sophia Antipolis, Nice, France.

<sup>2</sup>INSERM, U1081, Institute for Research on Cancer and Aging of Nice (IRCAN), Nice, France.

<sup>3</sup>CNRS, UMR 7284, Institute for Research on Cancer and Aging of Nice (IRCAN), Nice, France.

<sup>4</sup>Faculty of Medicine, Neuromuscular Diseases and ALS Specialized Center, University of Nice-Sophia-Antipolis, Nice, France.

## Materials and Methods

### Standard protocol approvals, registrations, and patient consents

The human samples were derived from a declared collection of samples (#DC-2008-391). This work was approved by the French Ethics Committee and all the patients signed an informed consent.

### Cell culture and iPS cell generation

Control and AS myoblasts used to generate iPS cells were obtained from *vastus lateralis* muscle biopsies, and were cultured as previously described [5]. Patient myoblasts, carrying the C154Y mutation, were characterized phenotypically and showed functionally the absence of the inward rectifier current.

Control and patient iPS cells were obtained after lentiviral infection. Lentiviral preparation was made at the Plateforme de Vectorologie with the human STEMCCA plasmid [10]. Control and patient myoblasts were plated at  $1 \times 10^5$  cells per dish and infected at one multiplicity of infection with lentiviruses carrying the STEMCCA reprogramming cassette [octamer-binding transcription factor 4 (*Oct4*), sex-determining region Y-box 2 (*Sox2*), Kruppel-like factor 4 (*Klf4*), and *c-Myc*], in myoblasts' culture medium containing Ham's-F10, 20% fetal bovine serum (FBS), 2 mM Glutamine, 1 mM penicillin/streptomycin, and 10 ng/mL basic fibroblast growth factor.

A second round of infection was performed at day 1. At day 3, the medium was changed to Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% FBS, 2 mM glutamine, and 1 mM penicillin/streptomycin. At day 4, infected cells were plated on mitotically inactivated mouse embryonic fibroblasts (MEF). At day 6, the medium was changed to classical iPS cell medium containing 80% DMEM-F12, 20% knockout serum replacer (KSR; Invitrogen), 1 mM nonessential amino acids, 1 mM penicillin/streptomycin, 100  $\mu$ M 2-mercaptoethanol, and 10 ng/mL FGF2, and changed every day.

From day 8 to 20, medium was supplemented with 2  $\mu$ M SB431542, 3  $\mu$ M CHIR99021, 5  $\mu$ M PS48, and 250  $\mu$ M sodium butyrate. These molecules are histone deacetylase (sodium butyrate), TGF $\beta$  signaling (SB431542), GSK3 inhibitor (CHIR99021), and PDK activator (PS48).

At day 24, colonies with embryonic stem (ES) cell morphology were individually picked, and transferred into a 48-well plate, with inactivated MEF. iPS cells were maintained in classical iPS cell medium, as described above, with inactivated MEF feeder and passaged twice a week. See Fig. 1A for detailed protocol.

### Embryoid bodies formation

To form embryoid bodies (EBs), iPS cells were detached from the feeder layer with a dissociation buffer containing 0.25% trypsin without EDTA, 1 mg/mL collagenase type IV, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 20% KSR, and phosphate-buffered saline (PBS). The clumps of the iPS cells were maintained 1 h in suspension and the floating EBs were cultured in 1 g/mL poly(2-hydroxyl methacrylate) (polyHema)-coated low-attachment dishes in FGF2-depleted iPS cell medium. The medium was changed every other day. After 5 days as floating culture, EBs were

transferred in 0.1% gelatin-coated dishes and cultured in the same medium for 3 days, to carry out RNA analysis of ectoderm, endoderm, and mesoderm markers' expression (8 days of differentiation in total).

For osteogenic marker analysis, iPS cells were differentiated as floating EB for 20 days, to carry out RNA analysis for *RUNX2*, osterix (*OSX*), alkaline phosphatase (*ALP*), collagen 1A1 (*Coll1A1*), osteocalcin (*OCN*), and *KCNJ2* expression.

### Genomic DNA extraction and sequencing

Genomic DNA was extracted with the REDEExtract-N-Amp Tissue Polymerase Chain Reaction (PCR) Kit (Sigma) following the manufacturer's instructions. Specific *KCNJ2* oligonucleotides were used to directly amplify the second *KCNJ2* exon (encoding the entire open reading frame) [11]. PCR product was purified with the PCR Purification Kit (Qiagen) and DNA was analyzed by direct sequencing to ensure *KCNJ2* sequence integrity.

### Immunohistochemistry

Cells were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS for 10 min at room temperature, and permeabilized in 0.2% Triton in PBS. Cells were then blocked in 5% horse serum in PBS for 1 h at room temperature. The following primary antibodies and dilution were used: mouse anti-stage specific embryonic antigen 4 (SSEA4) 1:1,000 (R&D system), mouse anti-TRA1-81 1:500 (Santa Cruz), and mouse anti-Oct4 1:500 (Santa Cruz).

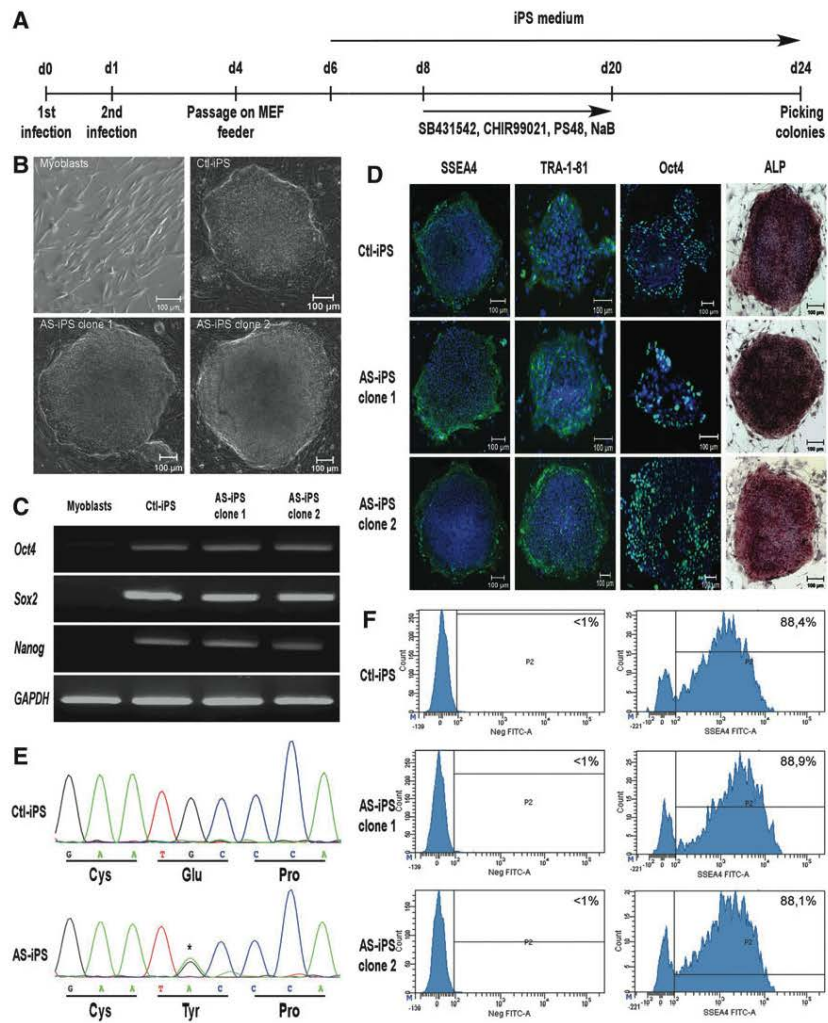
Cells were incubated overnight at 4°C with the primary antibody. Secondary antibody was Alexa 488 donkey anti-mouse (Invitrogen), used at 1:1,000 dilution. Images were acquired using a fluorescence microscope (Zeiss Axio Observer D1) and pictures were taken with a fluorescence camera (Orca Flash 4.0 LT) using the ZEN software.

### ALP activity

ALP activity was measured using the Leukocyte ALP Staining Kit (Sigma), following the manufacturer's instruction. Briefly, cells were first fixed in a citrate/acetone solution for 30 s. After several washes, cells were incubated 30 min in a Fast Violet solution, until coloration appeared. After several washes, cells were stained with Mayer's Hematoxylin, and images were taken using the Zeiss Axio Observer D1 microscope, with a color camera (Zeiss).

### Gene expression analysis

mRNA were isolated using the Nucleo Spin RNA Kit (Macherey-Nagel), following the manufacturer's recommendations. Reverse transcription was performed using the RETROscript Kit (Ambion) following the manufacturer's instructions. PCR reactions were performed using the GoTaq DNA polymerase (Promega). Real-time PCR assays were run on a StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystem), using the SensiFAST SYBR Hi-ROX Kit (Bioline). Transcript expression levels were evaluated using a comparative CT method (delta delta CT). Human *36B4* and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) were used as reference genes, for quantitative polymerase chain reaction (qPCR) and PCR, respectively. Specific primers were used for amplification (PCR in Table 1; qPCR in Table 2).



**FIG. 1.** Generation and characterization of control and AS-iPS cells. (A) A schematic representation of the protocol used to generate iPS cells. Cells were infected at day 0, with a lentivirus carrying the four reprogramming genes (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, and *c-Myc*). Between days 8 and 20, cocktail of small molecules was added in the culture medium. Colonies with embryonic stem cell morphology were picked up from day 24. (B) Morphological changes of control and AS myoblasts after lentiviral infection show that cells display a different morphology after their reprogramming. The upper left panel shows noninfected myoblasts, the three other panels show control iPS and AS-iPS cells (clones 1 and 2), respectively. (C) Reverse transcription-polymerase chain reaction experiments show that control and AS-iPS clones 1 and 2 express pluripotent *Oct4*, *Sox2*, and *Nanog* markers, whereas nonreprogrammed myoblasts do not. These experiments also show that control and AS-iPS cell clones 1 and 2 did not express *KCNJ2* gene. (D) Immunofluorescence staining for pluripotent markers SSEA4, TRA-1-81, and Oct4 (three first columns), and alkaline phosphatase activity, show characteristics of embryonic stem and iPS cells. Control and both AS-iPS cell clones 1 and clone 2 are positive for these markers. (E) Sequencing of the entire ORF of the *KCNJ2* gene in control and AS-iPS cell clones 1 and clone 2 show that control iPS cells have a wild-type *KCNJ2* gene, whereas AS-iPS cell clone 1 and 2 carry the Andersen-associated mutation C154Y. Only one control and one AS-iPS clone are shown. (F) Fluorescence-activated cell sorting (FACS) experiments show that more than 85% of the entire population of control (upper line) and AS-iPS cells clone 1 (middle line) and clone 2 (bottom line) express an SSEA4 marker. The left part shows isotype control stained cells, as a negative control. AS: Andersen's syndrome; iPS, induced pluripotent stem; SSEA4, stage-specific embryonic antigen 4.

TABLE 1. PRIMERS USED FOR POLYMERASE CHAIN REACTION

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>Oct4</i>	CGACCATCTGCCGCTTTGAG	CCCCCTGTCCCCATTCTTA
<i>Sox2</i>	CCCCCGGCGCAATAGCA	TCGGCGCGGGGAGATACAT
<i>Nanog</i>	CAGAAGGCCTCAGACCTAC	CTGTTCCAGGCCTGATTGTT
<i>KCNJ2</i>	GTGTCACGGATGAATCCCAAT	CCACTCGCCACATCAAACAC
<i>GAPDH</i>	CCACATCGCTCAGACACCAT	TGACCAGGCGCCCAAT

#### Flow cytometric analysis

Cell suspensions of undifferentiated iPS cells were prepared by a 0.25% trypsin/EDTA treatment, and suspended in a solution containing 1% FBS, 2 mM EDTA in PBS. Approximately  $2 \times 10^5$  cells were incubated with specific cell surface marker antibodies or isotype control, at 4°C for 15 min. A specific antibody for SSEA4 (clone MC813-70; BD Biosciences) was used for the labeling. Antibodies were diluted in PBS containing 1% FBS, 2 mM EDTA. After three washes in PBS/FBS/EDTA, samples were fixed in 0.4% paraformaldehyde, and analyzed on a FACS Canto II (BD), using the BD FACSDiva software.

#### Statistical analysis

To test for statistical significance, the Student's *t*-test for paired data was used. *P* value <0.05 was considered as statistically significant.

## Results

#### Control and AS-iPS cell generation and characterization

Control and AS-iPS cells were generated from myoblasts obtained from *vastus lateralis* muscle biopsies. Around day 24 post infection, colonies with typical ES cell morphology were found and were individually picked and amplified to obtain pure iPS clones, derived from the same colony. We

have successfully isolated two AS-iPS clones, derived from one AS patient and five control iPS clones. To minimize epigenetic or transcriptional pattern specific to the non-reprogrammed cells, we selected colonies at passage 10 or more to establish the control and AS-iPS cell lines. These iPS cell lines were cultured for several passages, and still displayed ES cell morphology (Fig. 1B).

We then investigated the expression of pluripotent markers of the generated cells by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemistry. AS cells expressed genetic (*Oct4*, *Sox2*, and *Nanog*) as well as membrane (SSEA4, TRA1-81) pluripotent markers, at the same level than control iPS cells, whereas nonreprogrammed myoblasts did not (Fig. 1C, D). The generated control and AS-iPS cells expressed also *Oct4*, shown by PCR and immunohistochemistry. Moreover, control and AS-iPS cells have strong ALP activity (Fig. 1D). We have also tested the pluripotent markers expression on the whole iPS cell population. As shown in Fig. 1F, around 90% ( $P < 0.05$ ) of control and AS-iPS clones 1 and 2 expressed high level of SSEA4.

The Kir2.1 channel is mainly involved in maintaining the resting membrane potential in excitable cells, but its precise role during the development is still unknown. We have tested the expression of *KCNJ2* gene in undifferentiated iPS cells by RT-PCR. Control and AS-iPS cells did not express any *KCNJ2* transcript (Fig. 1C).

To ensure that the integrity of the *KCNJ2* gene sequence in the generated iPS was preserved, the entire coding region (exon 2), which contains the ORF of the *KCNJ2* gene, was

TABLE 2. PRIMERS USED FOR QPCR

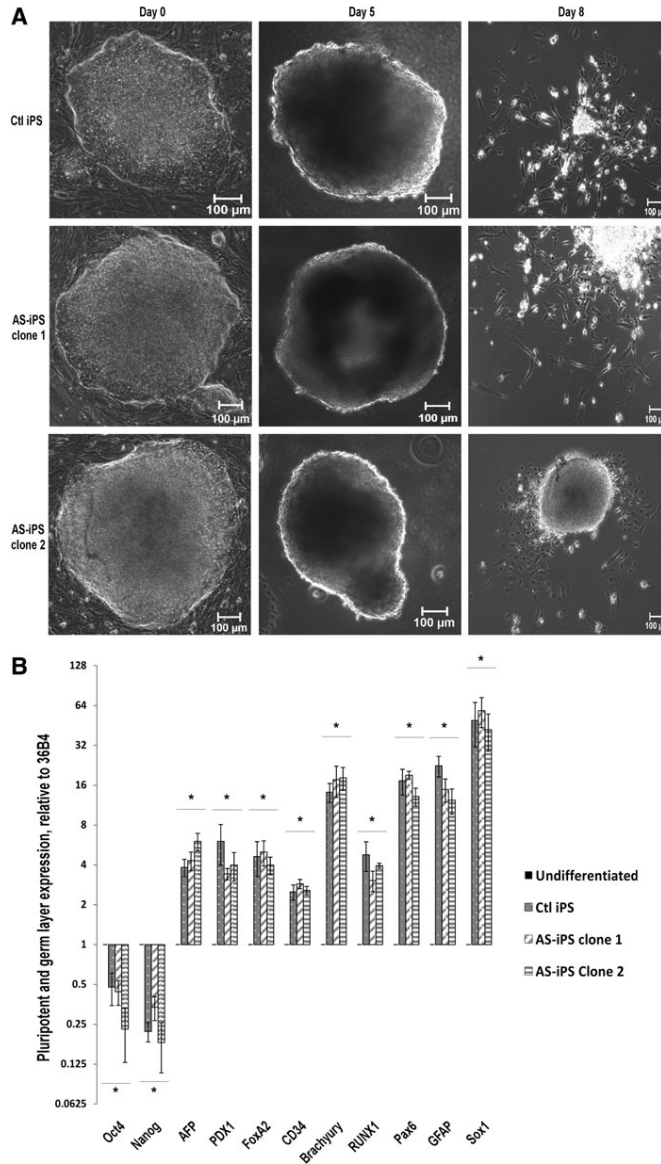
Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>36B4</i>	CAGATCCGCATGTCCCTTCG	AACACAAAGCCCACATTCCC
<i>Oct4</i>	TGGAGTTTGTGCCAGGGTTT	CTGTGTCCCAGGTTCTTT
<i>Nanog</i>	GTCCCAAAGGCAACAACCC	GCTGGGTGGAAGAGAACACA
<i>AFP</i>	CATATGCCAACAGGAGGCCA	CTGAGCTTGGCAGAGATCCT
<i>PDX1</i>	AAGCCGGCTCTCAAAGACA	GGTCGCCGAGTAAGAATGG
<i>FOXA2</i>	GCACCTCGGCTTCCAGTATGC	TGTTTCATGCCGTTTCATCCCC
<i>CD34</i>	TCTAGGCTCCAGCCAGAAAA	AAAACGTGTTGCCTTGAACC
<i>Brachyury</i>	GCTCTGCCCCCTAGAATGTG	ACAAAAGGAGGGGCTTCACT
<i>RunX1</i>	GGAAGTCAACCTCTGCTGCT	TCGGACCACAGAGCACTTTC
<i>Pax6</i>	TCCTTCTCGCTGGCTGTAAT	CCTGGAGCTCTGTTTGGAA
<i>Sox1</i>	CAACCAGGACCGGGTCAAAC	CCTCGGACATGACCTTCCAC
<i>GFAP</i>	CAGAGCCTCAAGGACGAGAT	GCTTTTGCCCTCGAATC
<i>RUNX2</i>	AGTGGACGAGGCAAGAGTTTCA	GGGTTCCCGAGGTTCCATCTA
<i>OSX</i>	CTCTGCGGGACTCAACAAC	GGTAATCATTAGCATAGCCT
<i>ALP</i>	GCGCAAGAGACTGAAATATGC	TGGTGGAGCTGACCCCTGAG
<i>Coll1A1</i>	AACGCCACAGGCATAAAGG	CAGGAATGCCTTGTCTCTCT
<i>OCN</i>	CACCGAGACACCATGAGAGC	CTGGGTCTTCACTACCTC
<i>KCNJ2</i>	TCCGAGGTCAACAGCTTAC	TTGGGCATTTCACCTGACA

qPCR, quantitative polymerase chain reaction.

sequenced from the iPS genomic DNA for all the generated control and AS-iPS clone. Our data show that AS-iPS genome harbored the G461A transition that leads to the C154Y mutation on the Kir2.1 channel, whereas control iPS cells showed a wild-type *KCNJ2* gene sequence (Fig. 1E, one control and one AS-iPS clone represented).

*Three germ layer differentiation of control and AS-iPS cell types*

One of the characteristics of iPS cells is the ability to differentiate into cells of the three germ layers. We have tested this property by the formation of EBs. EBs were formed from



**FIG. 2.** Control and AS-iPS cells are able to differentiate into the three germ layers by EB formation. **(A)** Morphological changes in control and AS-iPS cells (clones 1 and 2) during the differentiation into the three germ layers by the EB formation are shown. The upper panels show control iPS cells, the two other panels show AS-iPS cells clone 1 and 2 at day 8. The image represents a typical floating EB, and at day 15 the differentiated cells after EB formation. **(B)** Expression of pluripotent, endodermic, mesodermic, and ectodermic gene markers for control-iPS cells (gray) and AS-iPS cells (clones 1 and 2), relative to nondifferentiated cells (black). The RT-qPCR relative expression values were normalized to 36B4 expression, using delta delta CT method. \*Significantly different with nondifferentiated iPS cells ( $P < 0.05$ ). EB, embryoid body; RT-qPCR, reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction.

control as well as from AS-iPS cells, by floating culture of iPS cells for 5 days; followed by the adhering culture of EBs for an extra 3 days. After 8 days of culture, cells obtained from AS and control EBs displayed a completely different morphology compared to nondifferentiated iPS cells. After differentiation, we obtained a heterogeneous population of cells, containing epithelial cells, fibroblast-like cells, and other cell types, in both EBs differentiated control and AS-iPS cells (Fig. 2A).

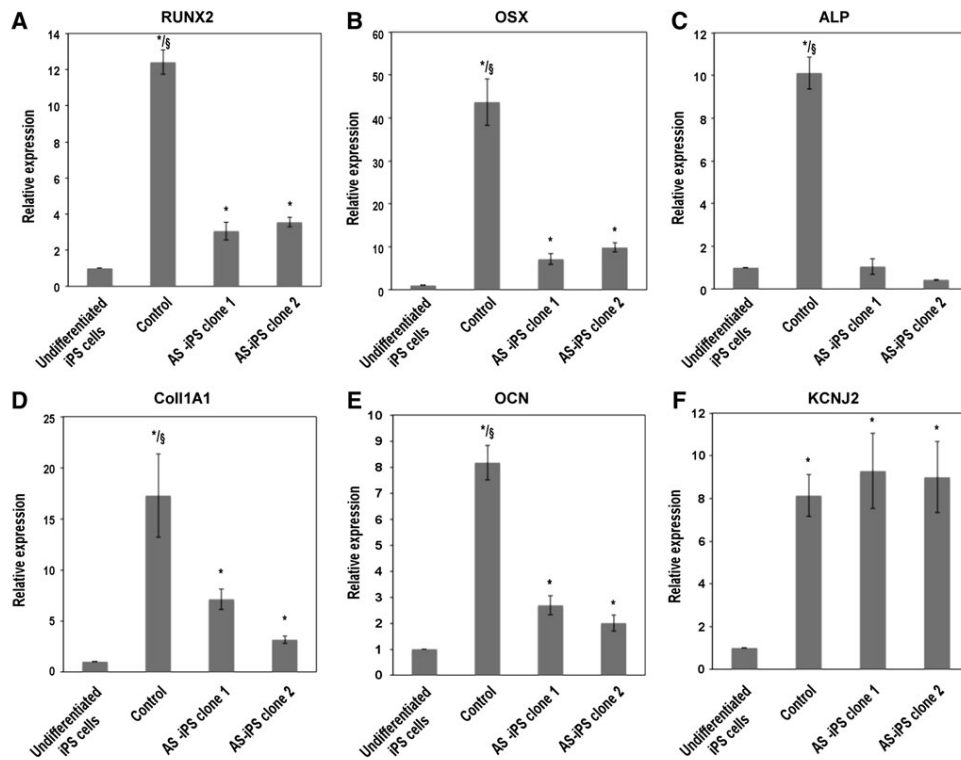
To test the three germ layer differentiation, EBs were collected and their RNA were analyzed for specific germ layer markers. As shown in Fig. 2B, expression of the pluripotent markers *Oct4* and *Nanog* significantly decreased in differentiated cells from control and AS-iPS-derived EB. Moreover, expression of alpha-fetoprotein (*AFP*), insulin promoter factor (*PDX1*), and hepatocyte nuclear factor-3-beta (*HNF-3B*, *FOXA2*) for the endoderm; cluster differentiation 34 (*CD34*), *Brachyury*, runt-related transcription factor 1 (*RUNX1*) for the mesoderm; paired box gene 6 (*Pax6*), glial fibrillary acidic protein (*GFAP*), and sex determining region Y-box 1 (*Sox1*) for the ectoderm, signifi-

cantly increased after the differentiation process. No significant difference was observed in the level of expression of the three germ layer markers between control and AS-differentiated iPS cells (Fig. 2B).

*EB-differentiated AS-iPS cells present a lower expression of early osteogenic markers compared to control iPS cells*

To investigate the role of the channel during the differentiation process, we have tested its expression after 20 days of differentiation, by EB formation. *KCNJ2* expression increased after differentiation for control and AS-iPS cells, but no difference was found between EB differentiated from control and from AS-iPS cells (Fig. 3F).

We have then tested the expression of the main osteoblastic markers in EB-differentiated control and AS-iPS cells, after 20 days of differentiation. As shown in Fig. 3, differentiated cells from control and AS-iPS-derived EB showed an increased expression of osteoblastic differentiation master



**FIG. 3.** Expression of osteoblastic markers in control and AS-iPS cells, after EB differentiation. Expression of osteoblast-associated genes *RUNX2* (A), *OSX* (B), *ALP* (C), *Col1A1* (D), *OCN* (E), and *KCNJ2* (F) in control and AS-iPS cells (clone 1 and 2), relative to nondifferentiated iPS cells. The RT-qPCR relative expression values were normalized to *36B4* expression, using delta delta CT method. \*Significantly different from the undifferentiated iPS cells ( $P < 0.05$ ). §Significantly different from differentiated AS-iPS cells ( $P < 0.05$ ).

genes *RUNX2* (Fig. 3A), *OSX* (Fig. 3B), and early osteoblast markers *ALP* (Fig. 3C), *Coll1A1* (Fig. 3D), and *OCN* (Fig. 3E) compared to undifferentiated iPS cells. Significant increase in the marker expression was observed between undifferentiated and differentiated control and AS-iPS cells ( $P < 0.05$ ), except for the *ALP* expression, but the extent of this increase is three to five times less compared to control EB.

## Discussion

AS is associated with a loss of function of the *KCNJ2* gene, encoding the strong inward rectifier  $K^+$  channel Kir2.1 channel [2]. This loss of function was demonstrated in vitro and ex vivo [4,5]. This disorder revealed that this channel was not only involved in maintaining the resting membrane potential in excitable tissues, but may also play an unexpected role in bone development.

In this study, we have generated iPS cells from control and AS myoblasts from *vastus lateralis* muscular biopsies [5,12]. The patient's DNA harbored a missense mutation on the *KCNJ2* gene that led to a loss of the Kir2.1 channel function in vitro. To perform myoblast reprogramming, cells were infected with a lentivirus carrying the four reprogramming genes (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, and *c-Myc*). These genes are known as the Yamanaka's factors, and are widely used to generate human iPS cells [9,13,14].

Few studies reported the generation of iPS cells from skeletal muscle cells [15–17]. The difficulty to obtain iPS cells from myoblasts could arise from the MyoD-mediated Oct4 inhibition. This inhibition may prevent the reprogramming of myoblasts into iPS cells [17]. To improve the reprogramming efficiency, we added a cocktail of small molecules between days 8 and 20. These molecules were described to enhance the reprogramming process in myoblasts [16].

iPS cells have the same characteristics of ES cells. At early passages, the generated iPS cells can lose their stem cell properties because of epigenetic factors or spontaneous differentiation [13]. To encounter such problems, we have selected colonies at passage 10 at least to establish control and AS-iPS cell lines. These iPS cell lines might represent fully reprogrammed cells. Control and AS-iPS cells still displayed ES cell morphology after several passages in culture, showing that the cells are capable of self-renewal. Moreover, control and AS-iPS cells were characterized at the molecular and genetic levels and both cell types showed expression of multiple undifferentiating markers (SSEA4, TRA1-81, ALP, *Oct4*, *Sox2*, *Nanog*), demonstrating the successful reprogramming of the myoblasts of both genotypes.

*KCNJ2* gene is located on the long arm of the chromosome 17 (17q24.3). As chromosome 17 is known as a hotspot for genetic anomalies in iPS cells [18], we sequenced the entire coding region of the *KCNJ2* gene. Control and AS-iPS cells still displayed a wild-type and a mutant *KCNJ2* gene, respectively, showing that the reprogramming process did not revert the mutation and no genetic anomalies were introduced in the open reading frame of the *KCNJ2* gene during reprogramming. Interestingly, control and AS-iPS cells did not express the *KCNJ2* mRNA, suggesting that the Ik1 current, carried by the Kir2.1 channel, does not play an important role in the undifferentiated cell stages, and may act later during the development process.

To confirm the presence of other ES cell characteristics, we have formed EBs from both control and AS-iPS cells. EBs are three-dimensional structures made of aggregated iPS cells, in which the cells could spontaneously differentiate into the three germ layers, reproducing in vitro the in vivo early steps of the development [19]. Control and AS-iPS could differentiate into the three germ layers (ectoderm, mesoderm, and endoderm) in such EB structures. Pluripotent marker expression decreased, and typical three germ layer marker expression increased upon the differentiation as expected. Interestingly, control and AS-iPS cells exhibited the same differentiation ability by having the same expression pattern in the three germ layers. These results suggest that the channel activity was not important for the early steps of the development, but rather later in the embryogenesis process.

Although all the iPS cell lines generated around the world are morphologically indistinguishable, they can present a variable pluripotency marker expression and behavior upon differentiation. This could be due to the reprogramming process, culture conditions, or batch effect [13,20]. Moreover, the different methodology used to generate iPS cells, in different laboratories, and the use of those cells for comparison can improve this differential expression [20]. In this study, the same cell type, that is myoblasts, was used to generate control and AS-iPS cells. The common origin of these cells could explain the similar pluripotent marker expression, and behavior upon the differentiation process, in the EBs.

AS is characterized by bone developmental defects. Several iPS cell differentiation protocols are based on EB formation [21–23]. Based on this, we have investigated the osteoblastic differentiation process in control and AS-iPS cells, through the EB formation. Both control and AS-iPS cells showed an increased expression level of the main osteogenic markers, but this increase was hastened in AS-iPS cells. *RUNX2* and *OSX* are the two master genes of the osteoblastic differentiation. Their expression is required for the expression of all the genes involved in the differentiation process and the bone matrix production [24,25]. *RUNX2* or *OSX* knockout mice present a complete lack of bone [26,27]. Their low expression, in AS-iPS cells, should indeed have major consequences on the ability of these cells to differentiate into the osteoblastic lineage.

Bone mineralization is a two-step process where osteoblasts synthesize first a collagen type 1 extracellular matrix and then hydroxyapatite is deposited in the extracellular matrix [28]. ALP is a key enzyme for this process, as it provides inorganic phosphate to promote mineralization [28]. Interestingly, the level of expression of ALP is not different between nondifferentiated and EB-differentiated AS-iPS cells, whereas all the other early osteogenic markers present an increased expression.

*KCNJ2* expression is not different between control and patient cells meaning that only the function of the channel is important for osteogenesis. These results are in agreement with previous findings showing that in vivo models presented developmental features. Indeed, *kcnj2* knockout mice had an abnormal skeleton development [7]. *Drosophila* invalidated for the three kir2.1 orthologs (Irk channels) exhibited a wing patterning defect [7]. In a Zebra fish model, transient expression of human mutated *kcnj2* gene and fish wild-type *kcnj2-12* also displayed dysmorphic features [29]. Further investigations are needed to better understand the precise role of the

Kir2.1 channel in the osteoblastic differentiation process. Despite the fact that a *KCNJ2* mutation can produce different clinical phenotypes among the same family members, generating iPSC cells carrying other *KCNJ2* mutations may be helpful in investigating the complex AS pathophysiology.

In this study we report for the first time the generation of iPSC cells from AS patient. The lower expression of osteoblastic genes in EB differentiated from AS-iPSC cells that recapitulate one of the three AS clinical phenotypes, indicates that AS-iPSC cells could be a valuable cell model to further investigating the developmental events requiring Kir2.1 channel function.

### Acknowledgments

The authors would like to thank the patient and her family for their participation and the members of the RESOCANAUX. The authors thank G. Mostoslavsky (Boston University School of Medicine) for providing the STEMCA vector. This work was supported by CNRS, Association Française contre les Myopathies (AFM)-Téléthon (research grant to S.B.), and Labex ICST (fellowship to J.P.).

### Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

### References

- Andersen ED, PA Krasilnikoff and H Overvad. (1971). Intermittent muscular weakness, extrasystoles, and multiple developmental anomalies. A new syndrome? *Acta Paediatr Scand* 60:559–564.
- Plaster NM, R Tawil, M Tristani-Firouzi, S Canún, S Bendahhou, A Tsunoda, MR Donaldson, ST Iannaccone, E Brunt, et al. (2001). Mutations in kir2.1 cause the developmental and episodic electrical phenotypes of Andersen's syndrome. *Cell* 105:511–519.
- Kokunai Y, T Nakata, M Furuta, S Sakata, H Kimura, T Aiba, M Yoshinaga, Y Osaki, M Nakamori, et al. (2014). A Kir3.4 mutation causes Andersen-Tawil syndrome by an inhibitory effect on Kir2.1. *Neurology* 82:1058–1064.
- Bendahhou S, MR Donaldson, NM Plaster, M Tristani-Firouzi, Y-H Fu and LJ Ptáček. (2003). Defective potassium channel Kir2.1 trafficking underlies Andersen-Tawil syndrome. *J Biol Chem* 278:51779–51785.
- Sacconi S, D Simkin, N Arrighi, F Chapon, MM Larroque, S Vicart, D Sternberg, B Fontaine, J Barhanin, C Desnuelle and S Bendahhou. (2009). Mechanisms underlying Andersen's syndrome pathology in skeletal muscle are revealed in human myotubes. *Am J Physiol Cell Physiol* 297:C876–C885.
- Zaritsky JJ, DM Eckman, GC Wellman, MT Nelson and TL Schwarz. (2000). Targeted disruption of Kir2.1 and Kir2.2 genes reveals the essential role of the inwardly rectifying K(+) current in K(+)-mediated vasodilation. *Circ Res* 87:160–166.
- Dahal GR, J Rawson, B Gassaway, B Kwok, Y Tong, LJ Ptáček and E Bates. (2012). An inwardly rectifying K+ channel is required for patterning. *Development* 139:3653–3664.
- Takahashi K and S Yamanaka. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663–676.
- Takahashi K, K Tanabe, M Ohnuki, M Narita, T Ichisaka, K Tomoda and S Yamanaka. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131:861–872.
- Sommer CA, AG Sommer, TA Longmire, C Christodoulou, DD Thomas, M Gostissa, FW Alt, GJ Murphy, DN Kotton and G Mostoslavsky. (2010). Excision of reprogramming transgenes improves the differentiation potential of iPSC cells generated with a single excisable vector. *Stem Cells* 28:64–74.
- Bendahhou S, E Fournier, S Gallet, D Ménard, M-M Larroque and J Barhanin. (2007). Corticosteroid-exacerbated symptoms in an Andersen's syndrome kindred. *Hum Mol Genet* 16:900–906.
- Sacco S, S Giuliano, S Sacconi, C Desnuelle, J Barhanin, E Amri and S Bendahhou. (2015). The inward rectifier potassium channel Kir2.1 is required for osteoblastogenesis. *Hum Mol Genet* 24:471–479.
- Jang J, J-E Yoo, J-A Lee, DR Lee, JY Kim, YJ Huh, D-S Kim, C-Y Park, D-Y Hwang, et al. (2012). Disease-specific induced pluripotent stem cells: a platform for human disease modeling and drug discovery. *Exp Mol Med* 44:202–213.
- Soldner F, D Hockemeyer, C Beard, Q Gao, GW Bell, EG Cook, G Hargus, A Blak, O Cooper, et al. (2009). Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* 136:964–977.
- Tan KY, S Eminli, S Hettmer, K Hochedlinger and AJ Wagers. (2011). Efficient generation of iPSCs from skeletal muscle stem cells. *PLoS One* 6:e26406.
- Trokovic R, J Weltner, T Manninen, M Mikkola, K Lundin, R Hämmäläinen, A Suomalainen and T Otonkoski. (2013). Small molecule inhibitors promote efficient generation of induced pluripotent stem cells from human skeletal myoblasts. *Stem Cells Dev* 22:114–123.
- Watanabe S, H Hirai, Y Asakura, C Tastad, M Verma, C Keller, JR Dutton and A Asakura. (2011). MyoD gene suppression by Oct4 is required for reprogramming in myoblasts to produce induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 29:505–516.
- Mayshar Y, U Ben-David, N Lavon, J-C Biancotti, B Yakir, AT Clark, K Plath, WE Lowry and N Benvenisty. (2010). Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 7:521–531.
- Sheridan SD, V Surampudi and RR Rao. (2012). Analysis of embryoid bodies derived from human induced pluripotent stem cells as a means to assess pluripotency. *Stem Cells Int* 2012:738910.
- Ohi Y, H Qin, C Hong, L Blouin, JM Polo, T Guo, Z Qi, SL Downey, PD Manos, et al. (2011). Incomplete DNA methylation underlies a transcriptional memory of somatic cells in human iPSCs. *Nat Cell Biol* 13:541–549.
- Ardehshirylajimi A, M Soleimani, S Hosseinkhani, K Parivar and P Yaghmaei. (2014). A comparative study of osteogenic differentiation human induced pluripotent stem cells and adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *Cell J* 16:235–244.
- Grigoriadis AE, M Kennedy, A Bozec, F Brunton, G Stenbeck, I-H Park, EF Wagner and GM Keller. (2010). Directed differentiation of hematopoietic precursors and functional osteoclasts from human ES and iPSC cells. *Blood* 115:2769–2776.
- Lee T-J, J Jang, S Kang, SH Bhang, G-J Jeong, H Shin, D-W Kim and B-S Kim. (2014). Mesenchymal stem cell-conditioned medium enhances osteogenic and chondrogenic differentiation of human embryonic stem cells and human



- induced pluripotent stem cells by mesodermal lineage induction. *Tissue Eng Part A* 20:1306–1313.
24. Bruderer M, RG Richards, M Alini and MJ Stoddart. (2014). Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis. *Eur Cell Mater* 28:269–286.
  25. Komori T. (2010). Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res* 339:189–195.
  26. Komori T, H Yagi, S Nomura, A Yamaguchi, K Sasaki, K Deguchi, Y Shimizu, RT Bronson, Y-H Gao, et al. (1997). Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89:755–764.
  27. Tang W, Y Li, L Osimiri and C Zhang. (2011). Osteoblast-specific transcription factor Osterix (*Osx*) is an upstream regulator of *Satb2* during bone formation. *J Biol Chem* 286:32995–33002.
  28. Orimo H. (2010). The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J Nippon Med Sch* 77:4–12.
  29. Leong IUS, JR Skinner, AN Shelling and DR Love. (2014). Expression of a mutant *kcnj2* gene transcript in Zebrafish. *Intl Sch Res Not* 324839:1–14.

Address correspondence to:

*Dr. Saïd Bendahhou*  
*UMR7370 CNRS*  
*LP2M*  
*Labex ICST*  
*Faculté de Médecine*  
*University Nice Sophia Antipolis*  
*Nice 06107*  
*France*

*E-mail:* said.bendahhou@unice.fr

Received for publication August 10, 2015

Accepted after revision November 16, 2015

Prepublished on Liebert Instant Online November 17, 2015

## Article 2 : The inward rectifier potassium channel Kir2.1 drives master genes expression during osteoblastogenesis.

Dans l'étude précédente, nous avons décrit la génération et la caractérisation de cellules iPS issues de myoblastes de patients atteints par le syndrome d'Andersen. Nous avons également démontré que lors de la différenciation spontanée des cellules iPS Andersen par la formation de corps embryoïdes, l'expression des marqueurs ostéogéniques était très atténuée par rapport aux cellules iPS contrôles, suggérant un défaut de différenciation osseuse des cellules iPS Andersen.

La différenciation des cellules en ostéoblastes se fait, *in vivo*, à partir de cellules souches mésenchymateuse (MSC) qui sont les cellules précurseurs du lignage mésodermiques, bien qu'elles puissent également se différencier en cellules d'autres feuilletts embryonnaires, comme des neurones. Pour étudier la différenciation osseuse des cellules iPS Andersen, nous les avons différenciées en cellules mésenchymateuses que nous avons caractérisées, par expression de marqueurs et leur capacité de différenciation en adipocytes. Les cellules iPS Andersen ont la même capacité de différenciation en cellules MSC que les cellules iPS contrôles. En effet, après différenciation, les cellules iPS-MSC des deux génotypes (contrôle et patient) expriment très fortement les marqueurs typiques des cellules mésenchymateuses CD90, CD73, CD105, CD44 et HLA-ABC, et n'expriment pas les marqueurs hématopoïétiques CD34, CD11b, CD45, CD14 et HLA-DR. De plus, les MSC des deux génotypes sont capables de se différencier en adipocytes fonctionnels, présentant des gouttelettes lipidiques dans le cytoplasme, ainsi qu'une expression des marqueurs adipocytaires peroxisome proliferator-activated gamma-2 (*PPAR $\gamma$ 2*) et la Perilipin B (*PLNB*), suggérant qu'un canal Kir2.1 fonctionnel n'est pas requis pour la différenciation des cellules en MSC et en adipocytes.

Cependant, l'étude de la différenciation osseuse des cellules iPS-MSC contrôles ou Andersen a montré que la perte de fonction du canal Kir2.1 conduisait à une mauvaise différenciation osseuse, *via* une faible production de matrice extracellulaire et une activité phosphatase alcaline très affectée. L'invalidation du canal Kir2.1 par traitement des cellules contrôles avec un inhibiteur spécifique, le BaCl<sub>2</sub>, produit le même phénotype que les cellules de patients : faible production de matrice

extracellulaire, et faible activité phosphatase alcaline, suggérant un rôle du canal lors de la maturation des ostéoblastes.

Pour déterminer le rôle précis du canal Kir2.1 au cours de la différenciation osseuse, nous avons étudié l'ensemble du processus de différenciation au niveau génétique. Nos résultats montrent d'une part que le canal Kir2.1 est exprimé tout au long de la différenciation, que ce soit chez les cellules iPS-MSC contrôles, Andersen ou traitées au BaCl<sub>2</sub>, et d'autre part que tout le processus de différenciation est altéré par la perte de fonction du canal Kir2.1. En effet, en absence d'un canal fonctionnel, l'expression de *RUNX2* et d'*OSTERIX* est réduite, chez les cellules de patients et traitées au BaCl<sub>2</sub>, par rapport à des cellules contrôles. *RUNX2* et *OSTERIX* sont les master genes de la différenciation ostéoblastique, et leur perte de fonction provoque une absence de squelette. L'expression de *RUNX2* est cruciale au cours de la différenciation osseuse, car il permet d'une part d'engager les cellules MSC dans le lignage osseux, en permettant l'expression d'*OSTERIX*, et d'autre part il permet l'expression des gènes impliqués dans la production et la synthèse de la matrice osseuse, comme l'ostéopontine ou le Collagène de type I. La faible expression de *RUNX2* lorsque le canal Kir2.1 est non fonctionnel suggère donc un rôle de ce dernier dans la signalisation conduisant à l'expression de *RUNX2*, au début de la différenciation.

Le blocage du canal Kir2.1 une fois que les cellules sont engagées dans le lignage osseux (après l'expression d'*OSTERIX*, au jour 4) conduit au même phénotype que l'absence de canal tout au long de la différenciation (faible production de matrice extracellulaire), malgré une activité phosphatase alcaline normale. De plus, malgré un début de différenciation normale, avec une forte expression de *RUNX2* et d'*OSTERIX*, le blocage du canal au jour 4 entraîne l'arrêt de l'expression de *RUNX2* et de tous les gènes sous son contrôle, suggérant un rôle du canal Kir2.1 dans le processus de maturation des ostéoblastes, probablement en contrôlant une ou plusieurs voies de signalisation.

L'ensemble de ces résultats montre qu'un canal Kir2.1 fonctionnel est requis tout au long de la différenciation, pour engager les cellules dans le lignage osseux mais également pour permettre leur maturation, *via* la sécrétion de matrice extracellulaire. En effet, l'expression tardive de *RUNX2* est bloquée par la perte de fonction tardive du canal Kir2.1, démontrant qu'un canal fonctionnel est requis pour l'expression normale de *RUNX2* tout au long de la différenciation.

Enfin, l'expression d'un canal Kir2.1 sauvage dans les cellules de patients permet de retrouver une différenciation osseuse normale, avec une production de matrice extracellulaire, une forte activité phosphatase alcaline mais également une expression de *RUNX2* normale, démontrant ainsi que le canal Kir2.1 contrôle la différenciation osseuse en contrôlant l'expression de *RUNX2*. Cette faible expression de *RUNX2* dans les cellules de patients peut expliquer les phénotypes développementaux retrouvés chez les patients Andersen.

**Modeling Andersen's syndrome with induced pluripotent stem cells: the inward rectifier potassium channel Kir2.1 drives master genes expression during osteoblastogenesis.**

Jonathan Pini<sup>1</sup>, Serena Giulano<sup>1</sup>, Matthieu Rouleau<sup>1</sup>, and Saïd Bendahhou<sup>1</sup>

*<sup>1</sup>UMR7370 CNRS, LP2M, Labex ICST, University Nice Sophia-Antipolis, Faculté de Médecine, Nice, France.*

Correspondence to: Saïd Bendahhou

Phone: +33 6 24 60 84 12 Fax: +33 4 93 37 70 24 Email: [said.bendahhou@unice.fr](mailto:said.bendahhou@unice.fr)

Key words: Mesenchymal Stromal Cells, Andersen's Syndrome, Kir2.1, iPS cells, Osteoblasts

**Abstract**

*Andersen's (AS) and foetal alcoholic (FAS) syndromes are disorders that share similar developmental birth defects in humans and mice. It is well established that Andersen's syndrome is due to genetic mutations leading to a loss of function in the inward rectifier K<sup>+</sup> channel Kir2.1. However, the genetic and molecular defects in FAS are still unknown, but begin only to point toward alcohol tempering with the Kir2.1 channel during pregnancy. It is still unclear how a K<sup>+</sup> channel can interfere with bone morphogenesis.*

*Induced pluripotent stem cells (iPSCs) from an Andersen's syndrome patient, were used to identify molecular defects that led to the bone malformations reported in Andersen's syndrome patients. We demonstrate that the down regulation of osteogenic master genes, such as Runx2, is the initiation signal toward defective osteoblasts. Restoring master genes expression, by rescuing the Kir2.1 channel function in Andersen's syndrome iPSCs, restored normal osteoblast behaviour, suggesting that targeting RUNX2 expression through BMP pathway could be a good therapeutic target for Andersen and foetal alcoholic syndromes.*

## Introduction

Andersen's syndrome is a rare and complex disorder which presents with several clinical phenotypes that affect at least three distinct tissues: skeletal muscle with periodic paralysis, heart with cardiac arrhythmia, and bones with dysmorphic features (hypertelorism, broad forehead, short palpebral fissure, mandibular hypoplasia, cleft palate, mild facial asymmetry, dental anomalies, small hands and feet, two or three toes syndactyly and clinodactyly, low set ears) (1; 2). To date, two genes have been associated with Andersen's syndrome: *KCNJ2* and *KCNJ5* (3,4), coding for inward rectifier potassium channels Kir2.1 and Kir3.4, respectively. A Mutation on the *KCNJ5* gene is supposed to inhibit *KCNJ2* channel function, leading to Andersen's syndrome (4). The *KCNJ2* gene, encoding for the inwardly rectifying potassium channel Kir2.1, carries over thirty mutations that have been associated with Andersen's syndrome (loss of function mutations), and other mutations that were identified in patients with short QT syndrome and atrial fibrillation (gain of function mutations) (5,6). The Kir2.1 protein was found in a variety of tissues such as heart, skeletal muscle, brain, kidneys, and bone. Its function is essential for maintaining resting membrane potential in excitable tissues, and intervenes in the late repolarization phase of the cardiac action potential. These channels are expressed in these tissues among other K<sup>+</sup> channels (7). The role of the Kir2.1 channel and the functional consequence of its loss of function in excitable cells have been investigated *in vitro*, in transfected cells or *ex vivo* in patient cells (8,9). A study in myoblasts from *Vastus lateralis* muscle biopsies of Andersen's patients confirmed the loss of the corresponding inward rectifying current (Ik1), in human myotubes (9).

However, the precise implication of the Kir2.1 channels in bone tissue has not been well established. The development features in Andersen's syndrome unravelled an unprecedented role of the Kir2.1 channel during bone development (3). *In vivo* investigations of the channel are limited, because Kir2.1 knockout mice die few hours after birth due to a cleft of the secondary palate (10). In a recent study, *kcnj2* knockout new born mice showed that the anterior and posterior palatine process and vomer bones were reduced in size; they also suffered from digit defects, and apparent decreased ossification in the pups (11), highlighted the crucial role of Kir2.1 channel in bone tissue.

Bone is a complex tissue, where specialized cells form it, i.e osteoblasts, and resorb it, i.e osteoclasts. Osteoblasts are derived *in vivo* from bone marrow mesenchymal

progenitors and *in vitro* can be differentiated from Mesenchymal Stromal Cells (MSC) (<sup>12</sup>). Several key genes control this process and the most important one is *RUNX2* (<sup>13,14</sup>). Indeed, *RUNX2* is a transcription factor, which trigger expression of all the genes, involved in the osteoblastic differentiation, such as *Collagen1A1* (*Coll1A1*), *Osteopontin* (*OPN*) (<sup>15,16</sup>). More importantly, *RUNX2* knockout mice presented a complete lack of bone (<sup>17</sup>). *RUNX2* is expressed at the very beginning of the differentiation in order to engage MSC to the osteoblast pathway (<sup>15,16</sup>). Its expression is controlled by key signalling pathways such as BMP, Wnt, or Notch (<sup>18</sup>) and disruption of signalling pathways or *RUNX2* expression leads to major developmental phenotypes, including bone anomalies (<sup>11</sup>).

We have generated functional iPS cells, from AS patients, and shown that embryoid bodies differentiated AS-iPS cells have a lower expression of early osteogenic markers compared to the control (<sup>19</sup>). To better understand the role of the Kir2.1 channel in bone morphogenesis, we subsequently investigated the potential of control and AS-iPS cells to differentiate into MSC, adipocytes and osteoblasts. Our data show that Kir2.1 channel is not required to differentiate iPS cells into mesodermal cells such as MSC and adipocytes. However, showing that the differentiation of MSC from AS-iPS cells into osteoblasts is impaired, our results demonstrate that the Kir2.1 channel is controlling *RUNX2* expression, during osteogenesis. Restoring channel function in AS cells allow them to differentiate into osteoblasts, silencing the channel in control cells prevent the osteoblasts differentiation, showing that functional channel, assuring the correct resting membrane potential, is a key factor to ensure a proper osteoblastic differentiation. Our results demonstrate for the first time that loss of Kir2.1 function strongly decrease *RUNX2* expression, and lead to an abnormal osteoblastic differentiation.

## **Material and methods**

### *Cell culture*

Healthy control and AS-iPS cells were cultured as previously described (<sup>19</sup>). Briefly, undifferentiated iPS cells were cultured in classical iPS cell medium composed of 80% DMEM-F12, 20% Knock out Serum Replacer (KSR, Invitrogen), 1 mM non-essential amino acids, 1 mM Penicillin/Streptomycin, 100  $\mu$ M 2-mercapthoethanol and 10 ng/mL



FGF2, and changed every day. Cells were passaged twice a week, in a 6-well plate coated with mitotically inactivated Mouse Embryonic Fibroblasts (MEF).

#### *Electrophysiology*

Recordings were conducted in the whole-cell configuration<sup>8,9</sup> at room temperature (~24°C), using an EPC-10 amplifier (HEKA Electronic, Germany). The pipette solution contained (mM): 140 KCl, 5 NaCl, 2 MgCl<sub>2</sub>, 10 EGTA, and 5 mM Hepes, pH 7.3. The bathing medium was (mM): 140 NaCl, 5 KCl, 4 MgCl<sub>2</sub>, 5 KCl, 2 CaCl<sub>2</sub>, and 10 HEPES, pH 7.3. Membrane currents were elicited from a holding potential of -80 mV by depolarizations ranging from -120 mV to +60 mV. For accurate voltage clamp recordings, only cells with series resistance less than 5 MΩ were used for analysis. Data acquisition and analysis were performed using Patchmaster and Fitmaster (HEKA Electronic, Germany), and IgorPro (WaveMetrics Inc., OR, USA) softwares. Glass capillaries (Borosilicate, Harvard Apparatus, UK) were pulled with a PC-10 Narishige puller, and had resistances of 3-5 MΩ.

#### *iPS cells differentiation into MSC (iPS-MSC).*

Differentiation into MSC was performed directly on undifferentiated iPS cells. Briefly, iPS medium was replaced by MSC-inducing medium containing Duplecco's-Modified Eagle Medium (DMEM)-F12, 10% fetal bovine serum (FBS), 1 mM sodium pyruvate, 1 mM Penicillin/Streptomycin, 1 mM non-essential amino acid, 110 μM 2-mercaptoethanol, 50 μg/mL ascorbate-2-phosphate, and 10 ng/mL EGF. The medium was changed every other day. After one week of differentiation, cells were recovered using 0.25% trypsin-EDTA and transferred in a 0.1% gelatin-coated dish during one additional week. At this time, cells were harvested, and phenotypically characterized.

Cells were characterized by flow cytometry for their expression of MSC markers CD73, CD90, CD105, CD44, HLA I and for the lack of expression of hematopoietic markers CD34, CD45, HLA II, CD11b and CD14.

#### *In vitro differentiation assay of iPS-MSC*

##### *Adipogenesis*

Adipocytes differentiation was performed using the StemPro adipogenesis differentiation kit (Life Technologies). Cells were seeded at 5x10<sup>4</sup> per well, in a 24-well

plate, and cultured for 2-3 weeks, in complete adipogenesis differentiation medium. Lipid deposits were observed following staining with Oil Red O. Adipogenic differentiation of iPS-MSC was also monitored with RNA analysis for adipocyte markers expression.

#### *Osteogenesis*

The differentiation medium was changed once a week and consisted in DMEM, 10% FBS, 2 mM glutamine, 1 mM penicillin/streptomycin, 50 µg/mL ascorbate-2-phosphate, 5 mM β-glycerophosphate, 100 nM dexamethasone, 10 µM vitamin D3, and 10 µg/mL EGF. After 2 weeks of differentiation, mineral deposit formation was monitored using Alizarin Red and Von Kossa (Silver Nitrate) stainings, and the RNA expression was analyzed for osteogenic markers expression using RNA-reverse transcription and RT-qPCR.

#### *BaCl<sub>2</sub> treatment*

Inhibition of the Kir2.1 function was performed by addition of 100 µM of BaCl<sub>2</sub> directly to the differentiation medium, at day 0 or day 4 of the differentiation.

#### *Adenovirus transduction*

One day before the beginning of the osteoblastic differentiation, cells were infected with adenovirus (8×10<sup>5</sup> pi per well) with 5 µg/ml of polybrene to enhance infection efficiency. Twelve hours after the infection, the viruses were removed and the medium was switched to the differentiation medium.

Cells from AS patients were infected with adenovirus carrying the Kir2.1-WT fused to the EGFP or carrying the EGFP alone. Cells from healthy individuals were infected with adenovirus carrying the mutant Kir2.1 fused to the EGFP or the EGFP alone (Δ314-315-EGFP). At Day 15 of differentiation, cells were stained with Alizarin Red S, Von Kossa, and for alkaline phosphatase activity, and visualized by phase microscopy.

#### *Alizarin Red S staining*

Alizarin Red S staining was performed as previously described (<sup>20</sup>). Briefly, after 14 days of differentiation, cells were washed with PBS, and fixed for 10 min in a 4% paraformaldehyde solution. After fixation, cells were washed once in PBS and three

times with distilled water and incubated for 10 min in a 1% Alizarin solution. After staining, cells were washed four times with water and visualized by phase microscopy. Alizarin quantification was performed as previously described (<sup>20,21</sup>). Briefly, after Alizarin staining, cells were incubated 30 min in a 10% acetic acid solution at room temperature. Cells were then scrapped from the plate and transferred into a 1.5-mL microtube. After 30 sec. of vortexing, the solution was heated to 85°C for 10 min, then cooled on ice for 5 min. The solution was subsequently centrifuged at 20000xg for 15 min, and 500 µL of the supernatant were transferred into a 1.5-mL microtube. The pH was adjusted to 4.1-4.5 with ammonium hydroxide and the amount of alizarin was determined after reading the optical density at 405 nm with a photo-spectrophotometer.

#### *Silver nitrate staining*

Von Kossa staining was performed as previously described (<sup>20</sup>). Briefly, cells were washed in PBS and fixed in a 4% paraformaldehyde solution for 10 min at room temperature. After fixation cells were washed once in PBS and twice in distilled water. Cells were then incubated in a 1% silver nitrate solution and exposed to the light until apparition of dark staining. After staining, cells were washed three times in distilled water and visualized by phase microscopy.

#### *Alkaline phosphatase staining*

Alkaline phosphatase activity was assayed using the leukocyte alkaline phosphatase staining kit (SIGMA), following the manufacturers instruction. Briefly, cells were first fixed in a citrate/acetone solution for 30 sec. After several washes, cells were incubated 30 minutes in a Fast Violet solution, until coloration appears. After several washes, cells were stained with Mayer's hematoxilin, and images were taken using the Zeiss Axio Observer D1 microscope, with a color camera (Zeiss).

#### *Gene expression analysis*

mRNAs were isolated using the Nucleo Spin RNA kit (Macherey-Nagel), following manufacturer's recommendations. Reverse transcription was performed using the RETROscript kit (Ambion), following the manufacturer instructions. Real-time PCR assays were run on a StepOnePlus real-time PCR system (Applied Biosystem), using

SensiFAST SYBR Hi-Rox kit (Bioline). Transcript expression levels were evaluated using a comparative CT method (delta deltaCT). Human *36B4* was used as a reference gene. Specific primers were used for amplification (Table 1).

#### *Immunoblotting*

Control (CTR) and AS-iPS-MSC osteoblasts were scraped, lysated in lysis buffer (8M urea, 4% CHAPS, and 65mM DTE) containing protease inhibitors cocktail (Sigma-Aldrich, MO, USA), sonicated, and stored at -20°C. The RC/DC protein assay kit (Bio-Rad, CA, USA), with BSA as standard, was used to determine the protein concentration. The proteins were separated onto 10%T gels and were transferred onto Millipore PVDF membranes (Millipore, MA, USA) at 100V for 90 min by using a Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, CA, USA). Membranes were blocked in 5% of non-fat dry milk overnight at 4°C, and incubated 90 min at room temperature with Anti-Alkaline Phosphatase (B4-78) (DSHB, IA, USA) and Anti Rux2 (Sigma-Aldrich) antibodies. The primary antibodies were, respectively, revealed with peroxidase-conjugated goat anti-mouse (Santacruz, CA, USA) and anti-rabbit (Dako, Denmark). Proteins were visualized using an enhanced chemiluminescence kit (Immobilon Western, Millipore) and finally visualized using Fusion Fx (Vilber Lourmat, Germany).

#### *Flow cytometry analysis*

Cell suspensions of iPS-MSC were prepared by a 0.25% trypsin/EDTA treatment, and suspended in a PBS solution containing 1% FBS, and 2 mM EDTA. Approximately  $2 \times 10^5$  cells were incubated with the desired cell surface marker antibodies or isotype control, at 4°C for 15 min. Specific antibodies for CD73 (BD Biosciences, clone AD2), CD90 (eBiosciences, clone eBIO5E10), CD105 (eBiosciences, clone SN6), CD44 (eBiosciences, clone IM7) and HLA ABC (eBiosciences, clone W6/32) for MSC markers; CD11b (eBiosciences, clone CBRM/5), CD14 (BD Biosciences, clone MΦP9), CD34 (BD Biosciences), CD45 (eBiosciences, clone HI30) and HLA DR (eBiosciences, clone LM3) for hematopoietic markers; and isotype control immunoglobulin IgG1 (BD Biosciences) were used for labelling. Antibodies were diluted in a PBS solution containing 1% FBS, and 2 mM EDTA. After 3 washes in PBS/FBS/EDTA, samples were fixed in 0.4% paraformaldehyde, and then analysed using a FACS Canto II (BD Bioscience), and the BD FACS Diva software (BD Bioscience).

### *Statistical analysis*

To test statistical significance, the Student's *t-test* for paired data was used. P-value <0.05 was considered as statistically significant.

## **Results**

### ***Mesenchymal Stromal Cells (MSC) from control- and AS-iPS cells show similar characteristics.***

We performed differentiation of two control iPS cells and two clones of AS-iPS cells into MSC by a spontaneous differentiation protocol using a defined medium. During the differentiation process, control and AS-iPS cells displayed morphological changes (Figure 1A). Two weeks after the induction of the differentiation, the cells were passaged, and a homogenous population of fibroblast-like cells was obtained, in the control as well as in AS-iPS cells (Figure 1A, last panel). Flow cytometry analysis using selected MSC and hematopoietic markers was performed to determine if the control and AS-iPS cells had successfully differentiated into MSC-like cells. Both control (Figure 1B) and AS-iPS-MSC (Figure 1C) expressed the typical MSC markers CD90, CD73, CD105, CD44 and HLA-ABC in more than 99% of cells, and had an expression of hematopoietic markers CD45, CD34, CD11b, CD14 and HLA-DR in less than 1% of cells. No significant difference was observed in the level of expression of MSC markers and hematopoietic markers between control and AS-iPS-MSC. Additionally, control and AS-iPS-MSC maintained expression of MSC markers and their negative expression of the hematopoietic markers, during all the culture time (data not shown). Noteworthy, whole cell patch clamp recordings from control and AS-iPS-MSC didn't show any inward rectifying current (Figure 2).

MSC are multipotent cells, with a multi-lineage differentiation potential into osteoblasts and adipocytes, *in vitro*. Therefore, we tested these abilities in control and AS-iPS-MSC.

To perform the adipogenic differentiation, control and AS-iPS-MSC were cultured in adipogenic medium for three weeks. Differentiated control and AS-iPS-MSC showed oil Red O positive lipidic droplets, at a similar level (Figure 3A, right column) whereas non-differentiated iPS-MSC had no positive staining (Figure 3A, left column). Quantitative RT-PCR experiment (Figure 3B and C) showed that expression levels of adipogenic

markers were significantly different between non-differentiated and adipocyte-differentiated MSC cells from both genotypes. Furthermore, no significant difference was found between control and AS-iPS-MSC in the level of *peroxisome proliferator-activated gamma-2 (PPAR $\gamma$ 2)*, the adipocyte differentiation master gene (Figure 3B), and *perilipin (PLIN1)*, a functional marker of lipidic droplets (Figure 3C) after differentiation.

#### ***Extracellular matrix production is markedly reduced in AS iPS-MSC osteoblasts***

We have then investigated the osteoblast differentiation ability of the generated iPS-MSC. We differentiated control and AS-iPS-MSC into osteoblasts using an osteogenic medium. About 14 days post differentiation, the cultures were assayed for the presence of calcium and hydroxyapatite deposits as determined by the presence of Alizarin red or Von Kossa (silver nitrate) mineralized nodules. Control iPS-MSC demonstrated their ability to undergo normal osteogenic differentiation showed by strong alizarin and Von Kossa stainings (Figure 4A and B) compare to non-differentiated iPS-MSC. Positive staining was also observed in AS-iPS-MSC (Figure 4A and B), but to a much lesser extent than the controls. In order to quantify the differentiation in both control and AS-iPS-MSC, we measured the amount of Alizarin fixed on the positive cells. As shown in Figure 5, AS-iPS-MSC produced about 3 times less hydroxyapatite matrix compared to the control ( $3.63 \pm 0.11$  mM for control in green;  $1.23 \pm 0.05$  mM,  $1.13 \pm 0.06$  mM for AS-iPS MSC clone 1 in orange and clone 2 in blue, respectively). During osteoblast differentiation, the alkaline phosphatase (ALP) activity increased, allowing extracellular matrix secretion. As shown in Figure 4C, non-differentiated iPS-MSC didn't display any ALP activity. However, after osteogenic differentiation, only control iPS-MSC displayed a high ALP activity, whereas AS-iPS-MSC had a very low ALP activity (Figure 4C). As expected, only control iPS-MSC present an I<sub>k1</sub> current, corresponding to the Kir2.1 channel activity, whereas such current is absent in patient iPS-MSC (Figure 2).

Barium Chloride (BaCl<sub>2</sub>) is known to be a specific inhibitor of the Kir2.1 channel, at low concentrations (micromolar range). Therefore, we have treated control iPS-MSC with 100  $\mu$ M BaCl<sub>2</sub>, in order to chemically inhibit the function of the channel. As shown in Figure 5, control iPS-MSC treated with 100  $\mu$ M BaCl<sub>2</sub> presented the same behaviour than AS-iPS-MSC, upon osteoblast differentiation: low Alizarin Red S staining (Figure 4A), and low silver nitrate staining (Figure 4B). The extracellular matrix production was reduced in Ba<sup>2+</sup>-treated cultures compared to untreated ( $3.63 \pm 0.11$  mM for control in green,

0.47 ± 0.02 mM for BaCl<sub>2</sub>-treated iPS-MSC in red) (Figure 5). We also observed low ALP activity (Figure 4C).

#### ***Decreased osteogenic marker expression in AS-iPS-MSC***

In order to determine the role of the channel and the consequences of its loss of function during the osteoblastogenesis, we performed RNA analysis during the entire differentiation process. As shown in Figure 6A, *KCNJ2* transcripts were detected at the early stages of the differentiation, and its expression was maintained during the entire process with an increase between day 1 and 4 and between day 6 and 10, in both control, AS-iPS-MSC, and BaCl<sub>2</sub>-treated control iPS-MSC. No significant difference was found in the level of expression of *KCNJ2* transcripts between all types of differentiated cells.

To test expression levels of the two master genes of the osteoblast differentiation process, *RUNX2* and *OSX*, RT-qPCR was performed. As shown in Figure 6B, *RUNX2* expression increased during the differentiation with a first increase between days 1 and 4, and a second increase between days 6 and 10, for control iPS-MSC. Overall expression was significantly different compared to the non-differentiated iPS-MSC. While the initial expression profile of *RUNX2* was similar between control and AS-iPS-MSC, with an increased expression at days 1 – 4 (Figure 6B), this increase was dramatically and significantly reduced in AS-iPS-MSC compared to those found in control iPS-MSC. Moreover, the second peak of expression, seen between day 6 and 10 in control iPS-MSC was absent in AS-iPS-MSC. BaCl<sub>2</sub>-treated control iPS-MSC presented the same *RUNX2* expression profile than AS-iPS-MSC (Figure 6B). Western blot analysis of the differentiation process revealed that *RUNX2* protein is detected at day one, after the beginning of the differentiation in control iPS-MSC, whereas in patient cells, a very low level of protein is detected (Figure 7A), confirming the qPCR experiment results. MDCK cells were used as positive control, and actin was used as charge control.

As shown in Figure 6C, *OSX* was expressed in control iPS-MSC during the entire differentiation process, with a strong increase between days 1 and 4. However, *OSX* expression was significantly reduced in AS-iPS-MSC and in the BaCl<sub>2</sub>-treated iPS-MSC (Figure 6C). Moreover, expression of the *ALP*, an early osteoblastic, marker was monitored. As shown in figure 6D, *ALP* expression increased in control iPS-MSC from day 1 to day 8, and then decreased, but with an overall higher expression during all the

differentiation process compared to non-differentiated cells. However, *ALP* expression in AS-iPS-MSC and BaCl<sub>2</sub>-treated control iPS-MSC was significantly decreased compared to control iPS-MSC (Figure 6D). Moreover, western blotting analysis revealed that ALP protein is detected in control iPS-MSC at day 1, 2 and 15 whereas a very low level of expression was found in AS-iPS-MSC, confirming RNA expression analysis (Figure 7B). Hela cells were used as a positive control, and actin was used as charge control.

Further, the expression levels of the main osteogenic markers were quantified using RT-qPCR analyses. As shown in Figure 8A, 8B and 8C, control iPS-MSC expressed, with a significant difference compared to non-differentiated iPS-MSC, *Osteopontin (OPN)*, *Osteocalcin (OCN)* and *Collagen 1 alpha1 (Coll1A1)* during all the differentiation process tested, while *Osteonectin (ON)* was expressed with a maximum level at days 7-9 (Figure 8D). However, these increases did not occur in differentiated AS-iPS-MSC or in differentiated BaCl<sub>2</sub>-treated control iPS-MSC.

Finally, we tested the expression level of osteocyte-associated gene markers *Sclerostin (SOST)* and *Podoplanin (PDPN)* in control, AS and BaCl<sub>2</sub>-treated control iPS-MSC. As shown in Figure 8E and F, *PDPN* and *SOST* expressions were detected at days 6 and 8, respectively, in control iPS-MSC, while their expression was absent in AS and BaCl<sub>2</sub>-treated control iPS-MSC.

#### **Functional Kir2.1 channels control RUNX2 expression**

In order to shed the light on the role of the I<sub>k1</sub> current during the differentiation process, we performed a blockade of the channel with 100 μM BaCl<sub>2</sub> at day 4 of the differentiation, just after the end of the first peak of *RUNX2* expression, and we have monitored the extracellular matrix production, and the gene expression.

As shown in figure 4A and B, addition of 100 μM BaCl<sub>2</sub> to the culture medium at day 4 prevented extracellular matrix formation, showed by the low Alizarin Red S. and Von Kossa stainings. The amount of Alizarin Red S was reduced compared to untreated culture cells (3.63 ± 0.11 mM for untreated, 0.34 ± 0.02 mM for BaCl<sub>2</sub>-treated iPS-MSC) (Figure 5). Surprisingly, ALP activity was not different between untreated and BaCl<sub>2</sub>-treated iPS-MSC at day 4 (Figure 4C).

In order to understand the impact of this blockade on the osteoblastic gene expression, we performed RNA analysis during the entire differentiation process. *KCNJ2* expression was similar between untreated and BaCl<sub>2</sub>-iPS-MSC at day 4 (Figure 6A). Interestingly,



addition of BaCl<sub>2</sub> at day 4 prevented also *RUNX2*, and *ALP* expression (Figure 6B, 6D). The sustained *OSX* expression (after its peak at day 2) was not affected by the blockade of the channel at day 4 (Figure 6C). Moreover, this blockade inhibited the additional expression occurring after day 4 (if any) of all the osteogenic markers tested (Figure 8). In summary, the expression profile remained similar for all the tested genes between day 1 and day 4, but blockade of the channel at day 4 led to a loss in the over expression of those genes occurring after day 4, concomitantly with the second peak of *RUNX2* expression.

***Rescued Kir2.1 functionality rescued also RUNX2 expression and osteoblasts differentiation ability in AS-iPS-MSC.***

Finally, we have performed rescue experiment in AS-iPS MSC. Over expression of a wild type *KCNJ2* gene in patient cells led to a restoration of extracellular matrix production, shown by the strong Alizarine and Von Kossa stainings (Figure 9A). Quantification of the Alizarine deposit demonstrated that, compared to non infected and GFP infected AS-iPS MSC, rescued AS-iPS-MSC were able to produce two times more extracellular matrix ( $1.18 \pm 0.05$  mM for AS-iPS-MSC,  $2.33 \pm 0.05$  mM for WT Kir infected AS-iPS-MSC; Figure 9B). Moreover, overexpression of WT *KCNJ2* gene led to a normal ALP activity in patient cells (Figure 9A). GFP alone-infected cells have the same behaviour than normal AS-iPS-MSC: low Alizarine and Von Kossa staining, low ALP activity (Figure 9A) and a similar extracellular matrix production, compared to non-infected AS-iPS-MSC ( $1.18 \pm 0.05$  mM for AS-iPS-MSC,  $1.45 \pm 0.07$  mM for GFP infected AS-iPS-MSC; Figure 9B).

Infection with a WT-Kir2.1 channel in patient cells led to a strong increase in the level of expression of *KCNJ2*, just after the infection (Figure 9D). Moreover, rescuing Kir2.1 led to a significant increase in *RUNX2* transcripts at the beginning of the differentiation, shown by RT-qPCR experiment (Figure 9C). Moreover, expression of the entire *RUNX2* downstream gene was increased after overexpression of WT *KCNJ2* (data not shown).

**Discussion**

AS is characterized by a triad of symptoms: periodic paralysis, cardiac arrhythmia and dysmorphic features (<sup>1</sup>). These phenotypes are related to different cell types (*i.e.* myocytes, cardiomyocytes and bone cells) suggesting that the absence of a functional Kir2.1 channel affects the functional integrity of these tissues. These findings are

corroborated with animal models <sup>(10,11)</sup> that highlighted the key role of this channel family in bone development. However, the mechanism by which an ionic channel can control the bone morphogenetic pathways is still unclear. *kcnj2* knockout mice die few hours after birth due to a cleft of the secondary palate, rendering thorough investigations unlikely. We have generated iPSC from healthy individuals as well as from an AS patient. Interestingly, iPSC could differentiate into MSC that are multi-potent cells capable of differentiating into osteoblasts and adipocytes, *in vitro*, and many other cell types, including myocytes *in vivo* <sup>(12,22,23)</sup>, and therefore they could be valuable in defining the impact of Kir2.1-associated mutations on cell physiology.

Here, we have differentiated control as well as AS-iPS cells into MSC. We have characterized those cells and showed that the generated control and AS-iPS-MSC have all the MSC characteristics: plastic adhesion, strong MSC marker expression and lack of expression of hematopoietic markers. Interestingly, control and AS-iPS cells have the same ability to differentiate into MSC suggesting that a functional channel is not a prerequisite for the differentiation into early mesodermal cells. Moreover, control and AS-iPS-MSC were able to differentiate into functional adipocytes, and to form functional lipid droplets, with the same efficiency between control and AS-iPS-MSC. These results strongly suggest that a functional Kir2.1 channel is not important for the differentiation and the function of adipocytes *in vitro*.

Bone has a dynamic structure, which is continuously formed and resorbed. Three distinct cell types compose bone: osteoblasts, the bone forming cells; osteoclasts, the bone resorbing cells and osteocytes, osteoblasts entrapped within the bone matrix. The latter have a mechanosensory role instructing osteoclasts where and when to resorb bone, and osteoblasts where and when to (re-)form it <sup>(24)</sup>. Osteoblasts are specialized MSC-derived cells, characterized by the unique property to secrete an organic/inorganic extracellular matrix, composed by CollagenIA1 and hydroxyapatite when they become mature <sup>(24,25)</sup>. We have differentiated control as well as AS-iPS-MSC into osteoblasts. Control iPS-MSCs were able to differentiate into functional osteoblasts forming extracellular matrix. Interestingly, AS-iPS-MSC could differentiate into functional osteoblasts, but were unable to efficiently form extracellular matrix. Inhibition of Kir2.1 channels with BaCl<sub>2</sub> treatment prevented extracellular matrix secretion in control iPS-MSCs as well, confirming our findings with AS iPS-MSCs. Taken together, these results

suggest that normo-functional Kir2.1 channels are required for normal bone forming function of osteoblasts (the secretion of the hydroxyapatite matrix, *i.e.* mineralization).

In order to understand the role of the channel during the entire differentiation process, we monitored the *KCNJ2* and osteogenic markers expression during fourteen days of differentiation (corresponding to the time required for *in vitro* matrix formation). Our data show that Kir2.1 channels are expressed during the entire differentiation process of MSC into osteoblast, suggesting that the role of the Kir2.1 channel is not limited to the osteoblast maturation, but it might have a critical role during the early steps of the differentiation process as well. Finally, its expression decreased at the end of the differentiation indicating that its function is not required anymore in matured cells.

Osteoblast differentiation is a well-controlled phenomenon, characterized by a specific gene expression pattern<sup>(15,16)</sup>. *RUNX2* and *OSX* are considered to be the master genes of the osteoblast differentiation. Indeed, both *RUNX2* and *OSX* knock out mice present a complete lack of bone<sup>(17,26)</sup>. The RUNX family of transcription factors encodes a nuclear protein with a Runt DNA-binding domain. During osteoblasts differentiation, RUNX2 protein presents a two-time expression profile: at the beginning of the differentiation, in order to engage the MSC in the osteoblast lineage, and at the middle of the differentiation, in order to allow the expression of the gene involved in the extracellular matrix production<sup>(15,16)</sup>. Indeed, RUNX2 triggers expression of all the genes involved in the osteoblast differentiation by binding to the *cis-acting element OSE2* (*Osteoblasts Specific Element 2*), present in the promoter of these genes<sup>(13,27)</sup>. *RUNX2* is required for *OSX* expression. Indeed, *RUNX2* expression is not affected in *OSX* knock-out mice, whereas no expression of *OSX* is detected in *RUNX2* knock-out mice<sup>(26)</sup>. Recently, it has been shown that invalidation of Kir2.1 channel homolog in drosophila led to a wing-patterning defect similar to a BMP mutant<sup>(11)</sup>.

Our data showed that RUNX2 and ALP expression and protein level, and ALP activity were reduced in patient cells, and in control iPS-MSC treated from day 0 with BaCl<sub>2</sub>, compare to control iPS-MSC. Moreover, restoring a Wild Type Kir2.1 channel in AS-iPS-MSC, at the beginning of the differentiation restored *RUNX2* expression and the ability of patient cells to differentiate into osteoblast suggesting that functional Kir2.1 channel could control the early differentiation events and is required for normal RUNX2 expression.

Kir2.1 channel may also control the production of the extracellular matrix. Indeed, blocking the channel activity later, after the expression of *RUNX2* was insured during the early steps of differentiation, led to a loss of extracellular matrix production, despite the unimpaired activity of the ALP, a key enzyme for the mineralization. Indeed, the consequences of blocking the Kir2.1 channel activity at day 4 had similar effects on the complete osteoblast differentiation process than that when the channel was blocked from the beginning of the differentiation and also comparable to the effects observed in patient cells. The late *RUNX2* expression requires a functional Kir2.1 channel, and the late loss of *RUNX2* expression, and that of the other downstream genes, impaired the differentiation process. Altogether, our data indicate that a Kir2.1 channel must remain functional all along the osteoblast differentiation and maturation processes.

In this study, we demonstrated for the first time that a K<sup>+</sup> channel could control the normal expression of the osteoblast master genes, namely *RUNX2* and *OSX*, most likely by maintaining the integrity of the membrane potential at rest as has been recently shown <sup>(28)</sup>.

Our findings shed light on the precise mechanisms underlying the development features not only in AS but also in foetal alcoholic syndrome (FAS) disorders. Indeed, the genetic and molecular defects in FAS are still unknown, but begin only to point toward alcohol tempering with the Kir2.1 channel during pregnancy <sup>(29)</sup>. Tempering with Kir2.1 channel function (genetically, alcohol or drug intake) during the embryonic stages may interfere with bone formation signalling and expression of master genes in cascade leading to major development and skeletal defects. In human, *RUNX2* haploinsufficiency is associated with Cleidocranial Dysplasia Syndrome (CCD), in which the patients presented severe skeletal anomalies, including clavicle hypoplasia, short stature, scoliosis and dental anomalies <sup>(30)</sup>. The reduced expression of *RUNX2* in non-functioning Kir2.1 cells could explain the developmental features associated with Andersen's syndrome. Indeed, some developmental anomalies found in Andersen patients are common with CCD, such as short stature and scoliosis.

Our findings raise great hope in public health by the use of Kir2.1-targeting drugs to prevent the developmental defects.

## **Acknowledgments**

We would like to thank the patient and her families for their participation, the members of the RESOCANAUX. This work was supported by CNRS, Association Française contre les Myopathies (AFM) - Téléthon (research grants to SB and to MR), Labex ICST (fellowship to JP).

## References

1. Andersen, E. D., Krasilnikoff, P. A. & Overvad, H. Intermittent muscular weakness, extrasystoles, and multiple developmental anomalies. A new syndrome? *Acta Paediatr. Scand.* **60**, 559–564 (1971).
2. Sansone, V. *et al.* Andersen's syndrome: a distinct periodic paralysis. *Ann. Neurol.* **42**, 305–312 (1997).
3. Plaster, N. M. *et al.* Mutations in Kir2.1 cause the developmental and episodic electrical phenotypes of Andersen's syndrome. *Cell* **105**, 511–519 (2001).
4. Kokunai, Y. *et al.* A Kir3.4 mutation causes Andersen-Tawil syndrome by an inhibitory effect on Kir2.1. *Neurology* **82**, 1058–1064 (2014).
5. Priori, S. G. *et al.* A novel form of short QT syndrome (SQT3) is caused by a mutation in the KCNJ2 gene. *Circ. Res.* **96**, 800–807 (2005).
6. Xia, M. *et al.* A Kir2.1 gain-of-function mutation underlies familial atrial fibrillation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **332**, 1012–1019 (2005).
7. Yellowley, C. E., Hancox, J. C., Skerry, T. M. & Levi, A. J. Whole-cell membrane currents from human osteoblast-like cells. *Calcif. Tissue Int.* **62**, 122–132 (1998).
8. Bendahhou, S. *et al.* Defective Potassium Channel Kir2.1 Trafficking Underlies Andersen-Tawil Syndrome. *J. Biol. Chem.* **278**, 51779–51785 (2003).
9. Sacconi, S. *et al.* Mechanisms underlying Andersen's syndrome pathology in skeletal muscle are revealed in human myotubes. *AJP Cell Physiol.* **297**, C876–C885 (2009).
10. Zaritsky, J. J., Eckman, D. M., Wellman, G. C., Nelson, M. T. & Schwarz, T. L. Targeted Disruption of Kir2.1 and Kir2.2 Genes Reveals the Essential Role of the Inwardly Rectifying K<sup>+</sup> Current in K<sup>+</sup>-Mediated Vasodilation. *Circ. Res.* **87**, 160–166 (2000).
11. Dahal, G. R. *et al.* An inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel is required for patterning. *Development* **139**, 3653–3664 (2012).
12. Pittenger, M. F. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells.

*Science* **284**, 143–147 (1999).

13. Vimalraj, S., Arumugam, B., Miranda, P. J. & Selvamurugan, N. Runx2: Structure, function, and phosphorylation in osteoblast differentiation. *Int. J. Biol. Macromol.* **78**, 202–208 (2015).

14. Komori, T. Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J. Cell. Biochem.* **99**, 1233–1239 (2006).

15. Komori, T. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res.* **339**, 189–195 (2010).

16. Bruderer, M., Richards, R. G., Alini, M. & Stoddart, M. J. Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis. *Eur. Cell. Mater.* **28**, 269–286 (2014).

17. Komori, T. *et al.* Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* **89**, 755–764 (1997).

18. Lin, G. L. & Hankenson, K. D. Integration of BMP, Wnt, and notch signaling pathways in osteoblast differentiation. *J. Cell. Biochem.* **112**, 3491–3501 (2011).

19. Pini, J., Rouleau, M., Desnuelle, C., Sacconi, S. & Bendahhou, S. Modeling Andersen's Syndrome in Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Dev.* **25**, 151–159 (2016).

20. Sacco, S. *et al.* The inward rectifier potassium channel Kir2.1 is required for osteoblastogenesis. *Hum. Mol. Genet.* (2014). doi:10.1093/hmg/ddu462

21. Gregory, C. A., Grady Gunn, W., Peister, A. & Prockop, D. J. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal. Biochem.* **329**, 77–84 (2004).

22. Jiang, Y. *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* **418**, 41–49 (2002).

23. Dominici, M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315–317 (2006).

24. Caetano-Lopes, J., Canhão, H. & Fonseca, J. E. Osteoblasts and bone formation. *Acta Reumatol. Port.* **32**, 103–110 (2007).

25. Mahamid, J. *et al.* Bone mineralization proceeds through intracellular calcium phosphate loaded vesicles: A cryo-electron microscopy study. *J. Struct. Biol.* **174**, 527–535 (2011).

26. Nakashima, K. *et al.* The novel zinc finger-containing transcription factor osterix

- is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* **108**, 17–29 (2002).
27. Ducy, P. Cbfa1: a molecular switch in osteoblast biology. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* **219**, 461–471 (2000).
  28. Adams, D. S. *et al.* Bioelectric signalling via potassium channels: a mechanism for craniofacial dysmorphogenesis in KCNJ2-associated Andersen-Tawil Syndrome. *J. Physiol.* n/a–n/a (2016). doi:10.1113/JP271930
  29. Bates, E. A. A potential molecular target for morphological defects of fetal alcohol syndrome: Kir2.1. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **23**, 324–329 (2013).
  30. Otto, F. *et al.* Cbfa1, a Candidate Gene for Cleidocranial Dysplasia Syndrome, Is Essential for Osteoblast Differentiation and Bone Development. *Cell* **89**, 765–771 (1997).

**Figure 1: Differentiation of control and AS-iPS cells into MSC.**

A: iPS cell morphological changes during the MSC differentiation. Images of iPS cells from both genotypes before differentiation (day 0), during the differentiation (days 7 and 14), and at the third passage.

B-C: Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) experiments showed that more than 99% of control (B) and AS-iPS MSC (C) expressed typical MSC markers (CD105, CD90, CD73, CD44, HLA ABC) and lacked the expression of hematopoietic markers (CD34, CD45 CD11b, CD14, HLA DR).

**Figure 2: I<sub>k1</sub> current is missing in Andersen' osteoblasts**

A: Current density-voltage relationship obtained from current recordings performed on control and AS-iPS-MSC, before and after undergoing an osteogenic differentiation. Cells were clamped to a holding potential of -80 mV and depolarized to test potentials ranging from -120 mV to +60 mV in 20-mV increments.

B: Current densities were shown at the most hyperpolarizing potential (-120 mV) used for the all cell types recorded in A.

**Figure 3: Control and AS-iPS-MSC adipogenic differentiation.**

A: The adipocyte differentiation of control and AS-iPS-MSC for 21 days revealed the presence of positive lipidic droplets, showed by Oil Red O coloration.

B-C: Expression of *PPAR  $\gamma$  2* and *PLNB* (Perilipin), two adipocyte markers, in adipocyte differentiated control (green), and AS-iPS MSC (blue), relative to non-differentiated iPS-MSC. The RT-qPCR relative expression values were normalized to *36B4* gene expression.

\*: Significantly different to non-differentiated iPS-MSC (p<0.05).

**Figure 4: Osteogenic differentiation of iPS-MSC.**

A: Alizarin Red S coloration of undifferentiated (upper panels) and differentiated (lower panels) control, AS-iPS-MSC, BaCl<sub>2</sub> treated control iPS-MSC and day 4 BaCl<sub>2</sub> treated control iPS-MSC showed that differentiated control iPS-MSC were able to form hydroxyapatite extracellular matrix whereas non functional Kir2.1 cells presented only few positive mineralized zone.

B: Von Kossa staining of undifferentiated (upper panels) and differentiated (lower panels) control, AS-iPS-MSC, BaCl<sub>2</sub> treated control iPS-MSC and day 4 BaCl<sub>2</sub> treated



control iPS-MSC showed that differentiated control iPS-MSC were able to produce hydroxyapatite extracellular matrix whereas non functional Kir2.1 cells produced a poor mineralization of the extracellular matrix.

C: The alkaline phosphatase activity, a key enzyme for the mineralization, measured in undifferentiated (upper panels) and differentiated (lower panels) control, AS-iPS-MSC, BaCl<sub>2</sub> treated control iPS-MSC and day 4 BaCl<sub>2</sub> treated control iPS-MSC showed that only differentiated control iPS-MSC and day 4 BaCl<sub>2</sub> treated control iPS-MSC displayed a detectable ALP activity, whereas AS-iPS-MSC and BaCl<sub>2</sub> treated control iPS-MSC presented few positive cells only.

**Figure 5: Extracellular matrix production is reduced when Kir2.1 is blocked**

Quantification of alizarin staining for control iPS-MSC (green), AS-iPS-MSC clone 1 (orange) and clone 2 (blue), BaCl<sub>2</sub> treated control iPS-MSC (red) and day 4 BaCl<sub>2</sub> treated control iPS-MSC (purple) before (undifferentiated) and after (differentiated) osteoblast differentiation, showed that only control iPS-MSC are able to greatly produced extracellular matrix

\*: Significantly different with undifferentiated cells (p<0.05).

§: Significantly different with differentiated AS-iPS-MSC clone 1 and 2 (p<0.05).

**Figure 6: *KCNJ2* and master gene expression during iPS-MSC osteoblast differentiation.**

Expression of *KCNJ2* (A), *RUNX2* (B), *OSX* (*Osterix*; C) and *ALP* (*Alkaline Phosphatase*; D) during osteogenic differentiation in osteoblast-differentiated control (green), AS-iPS-MSC (blue), control iPS-MSC treated with 100 µM BaCl<sub>2</sub> (red), and day 4 BaCl<sub>2</sub> treated control iPS-MSC (purple) relative to non-differentiated iPS-MSC. The RT-qPCR relative expression values were normalized to 36B4 expression.

E: Immunoblotting of ALP in undifferentiated iPS-MSC (D0), preosteoblasts (D1, 2) and differentiated osteoblasts (D15) CTR and AS cells. Hela cells were used as positive control.

**Figure 7: *RUNX2* and *ALP* protein level is reduced in AS-iPS-MSC compared to control cells**

A: Immunoblotting of RUNX2 in undifferentiated iPS-MSC (D0), preosteoblasts (D1, 2) and differentiated osteoblasts (D15) control and AS-IPS-MSC showed that RUNX2

protein level is strongly reduced in patient cells. MDCK cells were used as positive control, and actin was used as loading control.

B: Immunoblotting of ALP in undifferentiated iPS-MSC (D0), preosteoblasts (D1, 2) and differentiated osteoblasts (D15) control and AS-IPS-MSC showed that ALP protein level is strongly reduced in patient cells. Hela cells were used as positive control and actin was used as loading control.

**Figure 8: Osteoblast and Osteocytes gene expression during the differentiation process.**

Expression of osteoblast associated gene *OPN* (*Osteopontin*, A), *OCN* (*Osteocalcin*, B), *Coll1A1* (*Collagen 1alpha1*, C), *ON* (*Osteonectin*, D) and osteocyte associated gene *SOST* (*Sclerostin*, E) and *PDPN* (*Podoplanin*, F) in osteoblast-differentiated control (green), AS-iPS-MSC (blue), control iPS-MSC treated with 100  $\mu$ M BaCl<sub>2</sub> (red) and day 4 BaCl<sub>2</sub> treated control iPS-MSC (purple), relative to non-differentiated iPS-MSC. The qRT-PCR relative expression values were normalized to 36B4 expression.

**Figure 9: Kir2.1 channels rescue restores osteoblast function in patient cells**

A: Alizarin Red S and Von Kossa coloration and ALP activity of EGFP- (upper panels) and WT Kir-infected AS-IPS-MSC (lower panels) showed that rescued cells are able to produce extracellular matrix and display a strong ALP activity.

B: Quantification of alizarin staining for AS-iPS-MSC (blue), GFP-infected AS-iPS-MSC (orange) and WT Kir-infected AS-iPS-MSC (light blue) before (undifferentiated) and after (differentiated) osteoblast differentiation.

\*: Significantly different with undifferentiated cells (p<0.05).

§: Significantly different with differentiated AS-iPS-MSC clone (p<0.05).

C: Expression of *RUNX2* during osteogenic differentiation in osteoblast-differentiated control (square green), AS (triangle blue) and WT Kir-infected AS-iPS-MSC (cross light blue), relative to non-differentiated iPS-MSC. The RT-qPCR relative expression values were normalized to 36B4 expression.

D: Expression of *KCNJ2* during osteogenic differentiation showed that infection greatly enhance *KCNJ2* expression during all the differentiation process.

**Figure 1**

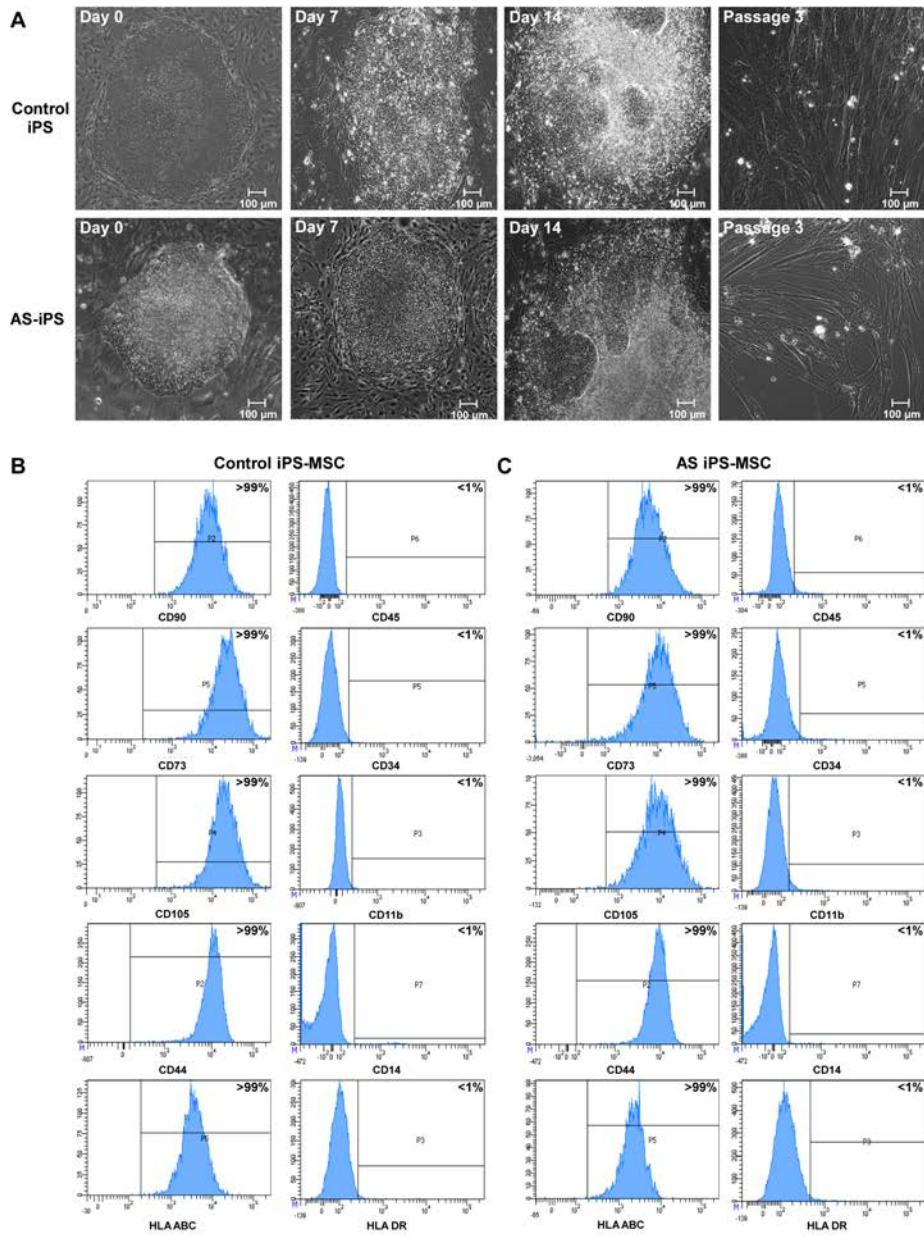
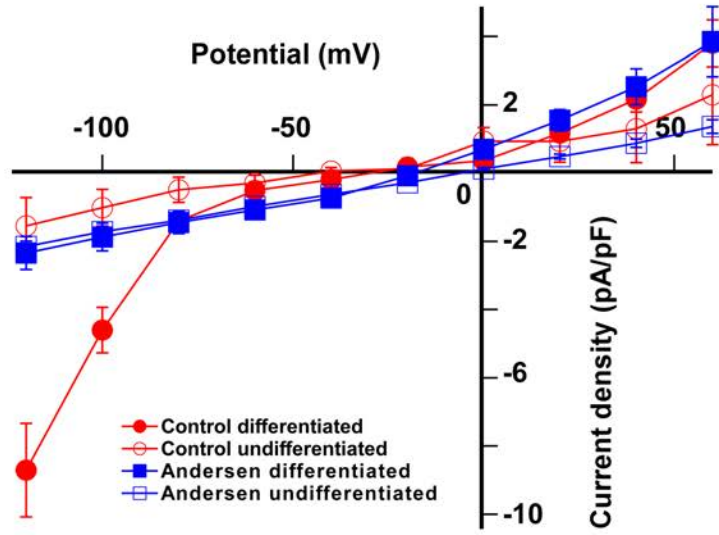
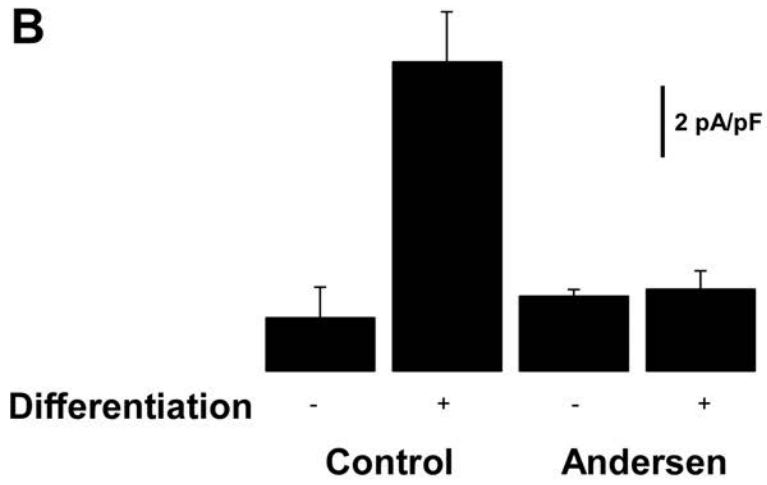


Figure 2

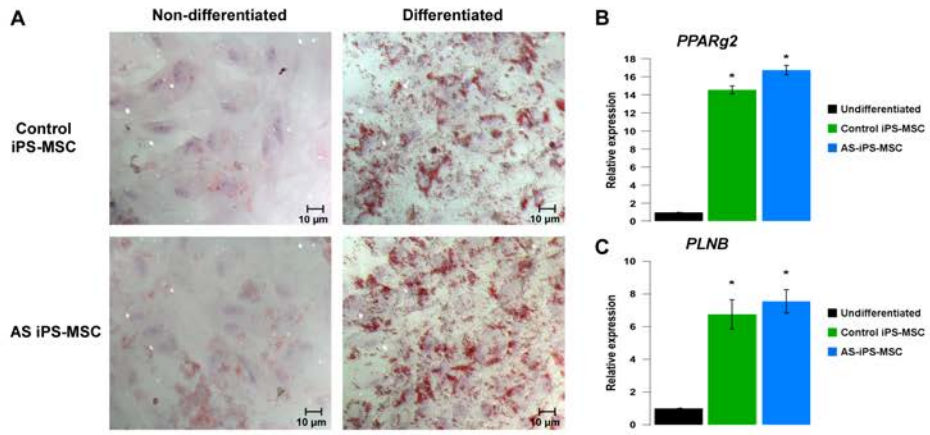
**A**



**B**



**Figure 3**



**Figure 4**

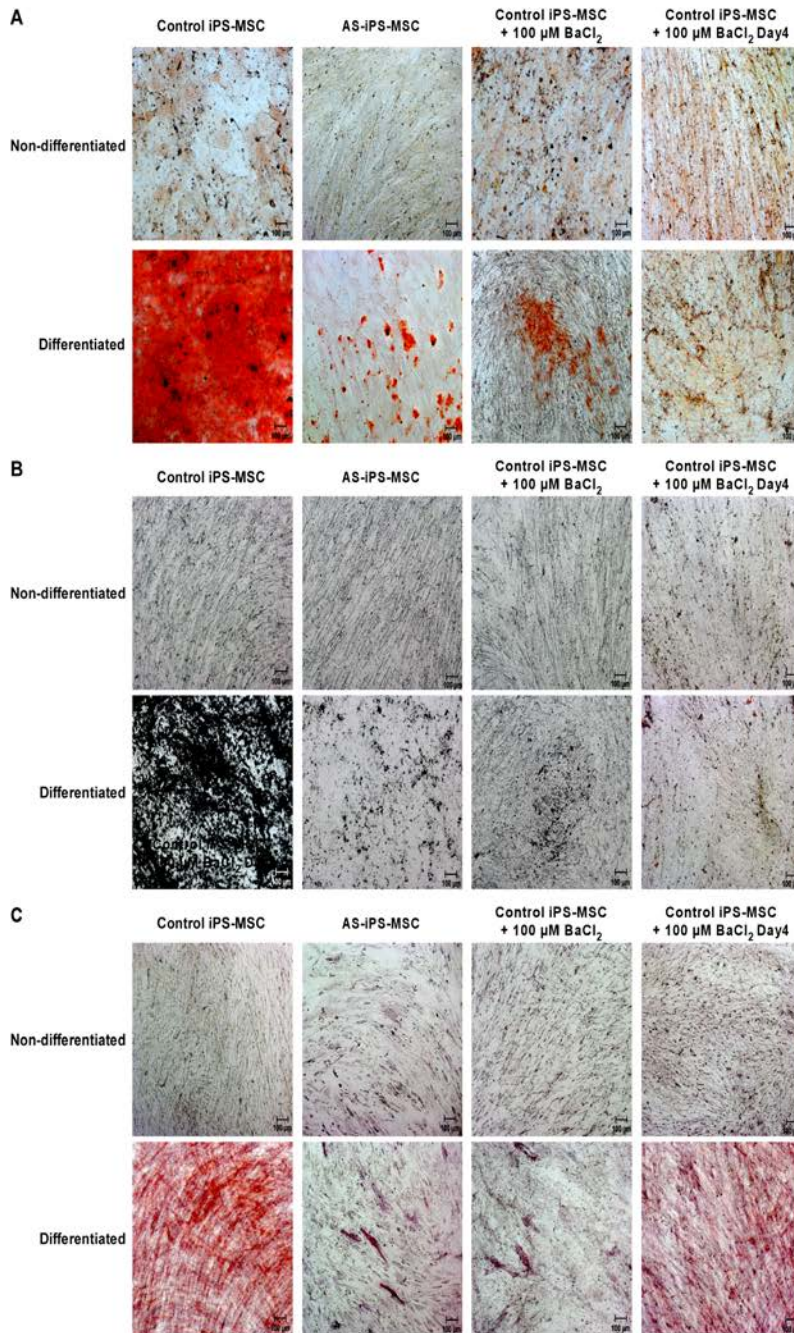


Figure 5

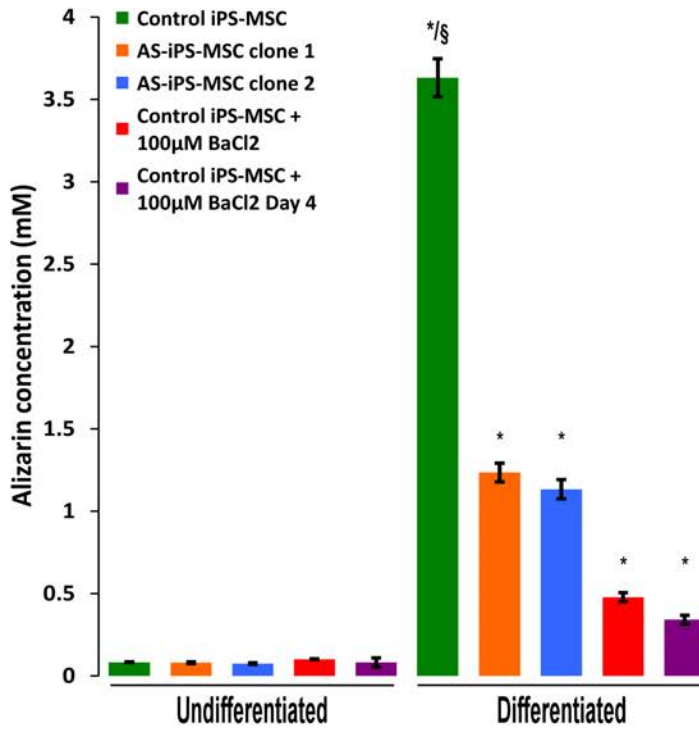
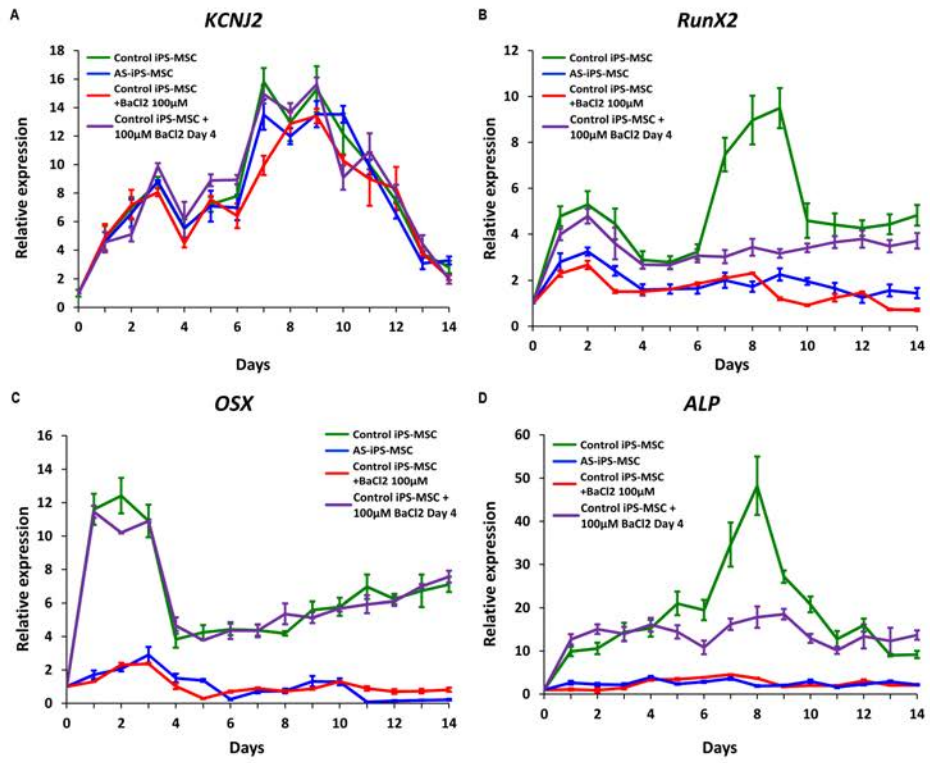


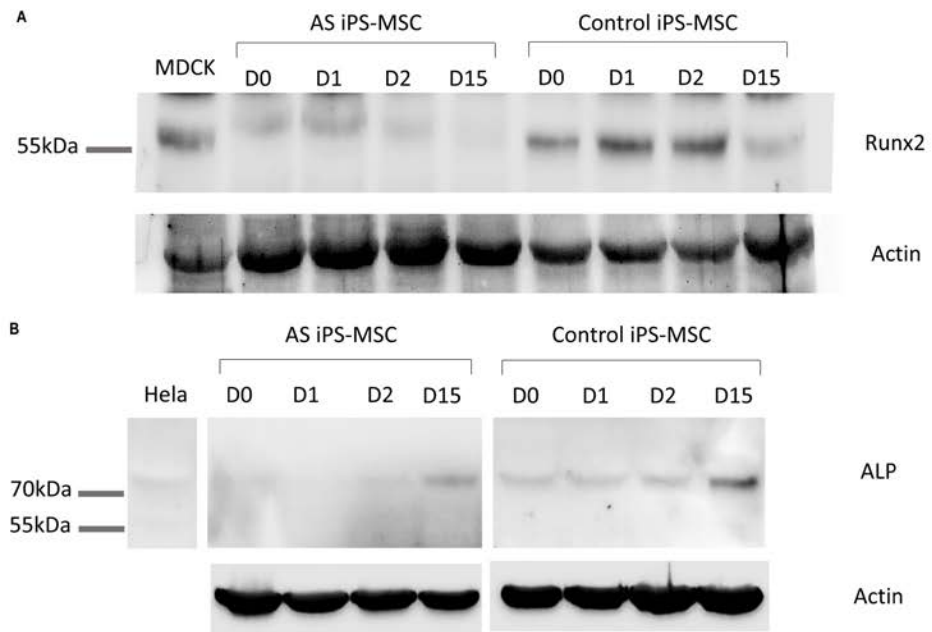


Figure 6

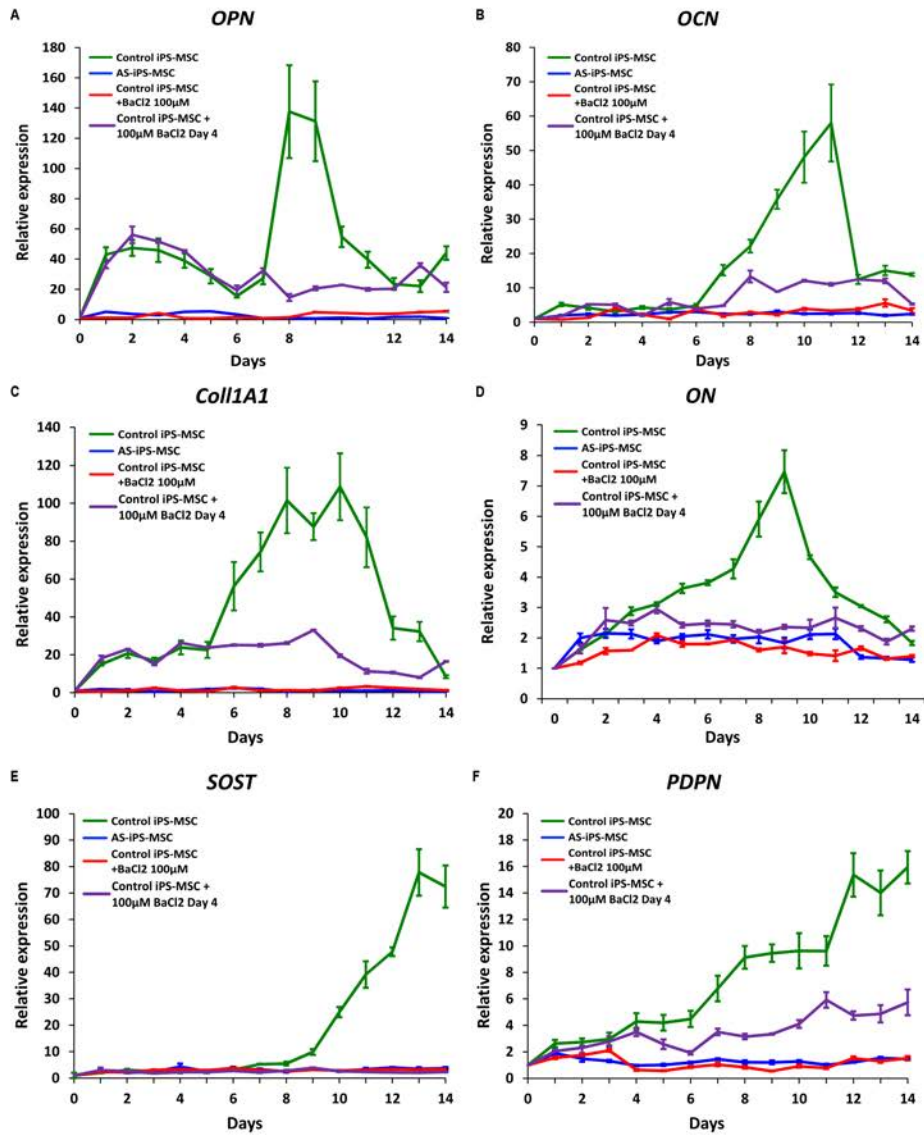




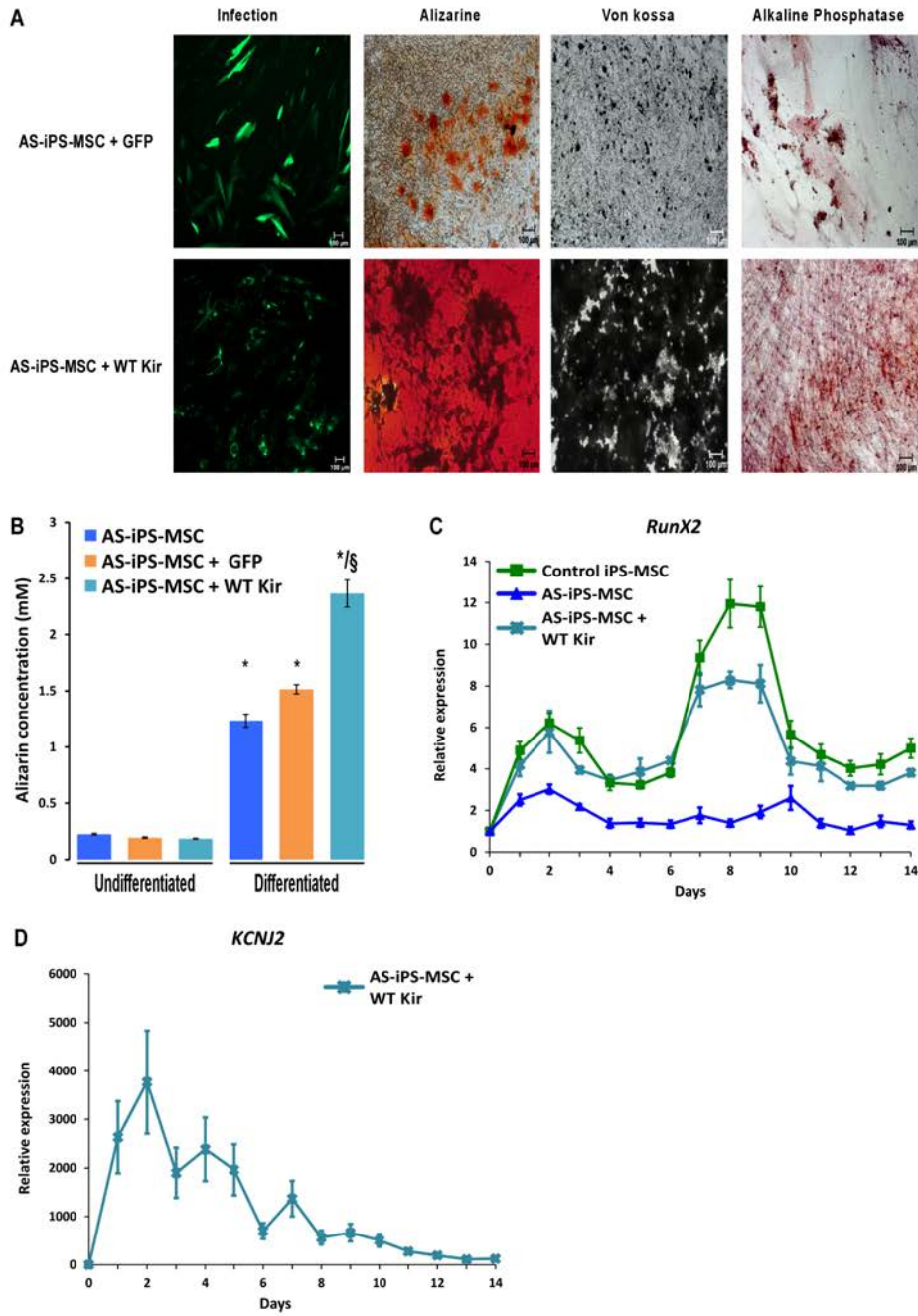
**Figure 7**



**Figure 8**



**Figure 9**



**Table 1:** Primers used for qRT-PCR :

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>36B4</i>	CAGATCCGCATGTCCCTTCG	AACACAAAGCCCACATTCCC
<i>PPAR<math>\gamma</math>2</i>	CAAGACAACCTGCTACAAGC	CTCCGTCTTCTTGATCACCT
<i>PLNB</i>	AGAAACAGCATCAGCGTTCC	GCCCCTCCAGAAGCCAGTCG
<i>KCNJ2</i>	TCCGAGGTCAACAGCTTCAC	TTGGGCATTTCATCCGTGACA
<i>RUNX2</i>	AGTGGACGAGGCAAGAGTTTCA	GGGTTCCTCCGAGGTCCATCTA
<i>OSX</i>	CTCTGCGGGACTCAACAACCT	GGTAATCATTAGCATAGCCT
<i>OPN</i>	TCTAAGAAGTTTCGCAGACC	ATGTCCTCGTCTGTAGCATC
<i>OCN</i>	CACCGAGACACCATGAGAGC	CTGGGTCTCTTCACTACCTC
<i>Col11A1</i>	AACGCCACAGGCATAAAGG	CAGGAATGCCTTGTCTCCTCT
<i>ALP</i>	GCGCAAGAGACACTGAAATATGC	TGGTGGAGCTGACCCTTGAG
<i>ON</i>	CCACTGCAAACACGGCAAGG	TGCACACCTTCTCAAACCTCG
<i>PDPN</i>	CTCAGAATCTTGCTGCTCGG	CCACATCATCTTCGGCACCT
<i>SOST</i>	GCGCGTGGTTTGATTGTTTAT	GATTCCTCAGGGCCTGGAA

## Article 3 : Kir2.1 channel controls the chondrogenic differentiation of human iPS derived Mesenchymal Stem Cells.

Le syndrome d'Andersen est caractérisé par la perte de fonction du canal potassique Kir2.1. Les patients présentent des anomalies de l'excitabilité musculaires, dans les muscles squelettiques et cardiaques, mais également des anomalies développementales, incluant des malformations craniofaciales, dentaires, des clinodactylies et des syndactylies, et une taille plus réduite que la moyenne, indiquant un rôle du canal Kir2.1 dans le développement et la mise en place du squelette.

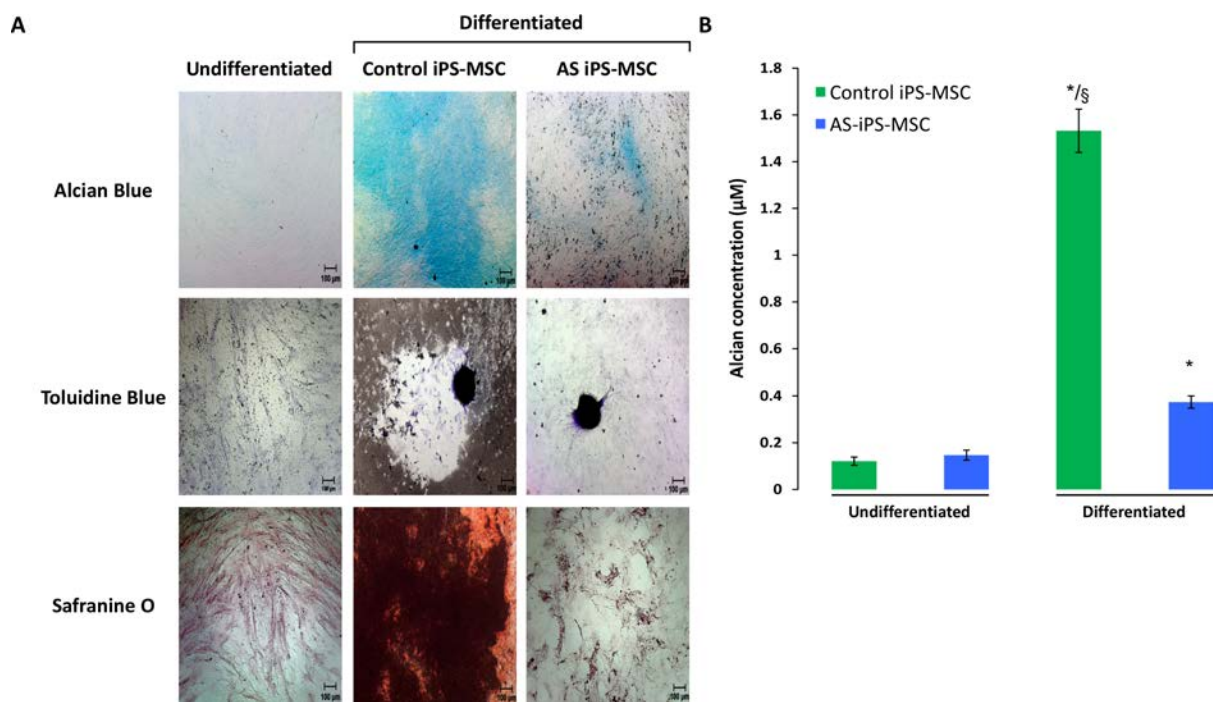
La formation du tissu osseux peut se faire de deux façons : soit par ossification membranaire, où le processus d'ossification est direct ; soit par ossification endochondrale où une ébauche cartilagineuse préfigure l'élément squelettique, puis sera ensuite ossifié pour former l'os final. Ces deux processus d'ossification repose sur les ostéoblastes, qui ont la capacité de former la matrice osseuse. L'ossification endochondrale repose également sur les chondrocytes, qui sont responsables de l'ébauche cartilagineuse qui sera ossifiée par les ostéoblastes. Ces deux types cellulaires dérivent des cellules souches mésenchymateuses ou MSC.

Au cours des études précédentes, nous avons généré des cellules iPS issues de patients Andersen, et nous avons pu démontrer que le processus de différenciation ostéoblastique était sous le contrôle de la fonctionnalité du canal potassique Kir2.1. En effet, des cellules iPS-MSC dérivées de cellules iPS Andersen présentaient une capacité de différenciation en ostéoblastes réduite par rapport à des cellules iPS-MSC contrôles. Cette faible efficacité de différenciation est due à l'expression réduite de *RUNX2* dans les cellules de patients au cours de tous le processus de différenciation ostéoblastique.

Nous avons ensuite étudié les capacités de différenciation en chondrocytes des cellules iPS Andersen. Les chondrocytes sont des cellules dérivées des cellules MSC, et sont caractérisées par leur capacité à synthétiser une matrice cartilagineuse riche en protéoglycans. *In vivo*, la différenciation chondrocytaire se fait en condition hypoxique (à faible concentration d'oxygène) car le tissu cartilagineux n'est pas vascularisé. *In vitro*, la différenciation peut se faire en formant des agrégats très concentrés en nombre

de cellules, ce qui mime des conditions hypoxiques. Après différenciation, la production de matrice cartilagineuse peut être observée, par des techniques de colorations.

Comme représenté sur la figure 64, les cellules iPS-MSC contrôle peuvent se différencier en chondrocytes fonctionnels, capables de produire une matrice cartilagineuse. En effet, après différenciation, les cellules iPS-MSC contrôles présentent une forte coloration au bleu d'Alcian, au bleu de toluidine mais également à la Safranine O (Figure 64A, colonne du milieu).



**Figure 64 : Les cellules iPS-MSC contrôle peuvent se différencier en chondrocytes fonctionnels, tandis que les cellules iPS-MSC Andersen présentent une capacité de différenciation réduite.**

A : Colorations au bleu d'Alcian, au bleu de Toluidine, et à la Safranine O des cellules iPS-MSC non différenciées (colonne de gauche) et cellules iPS-MSC contrôles (colonne du milieu) et Andersen (colonne de droite) différenciées en chondrocytes montrent que seules les cellules iPS-MSC contrôles présentent une forte production de matrice cartilagineuse.

B : La quantification de la quantité de bleu d'Alcian après différenciation montre que les cellules iPS-MSC Andersen produisent moins de matrice cartilagineuse par rapport aux cellules iPS-MSC contrôle.

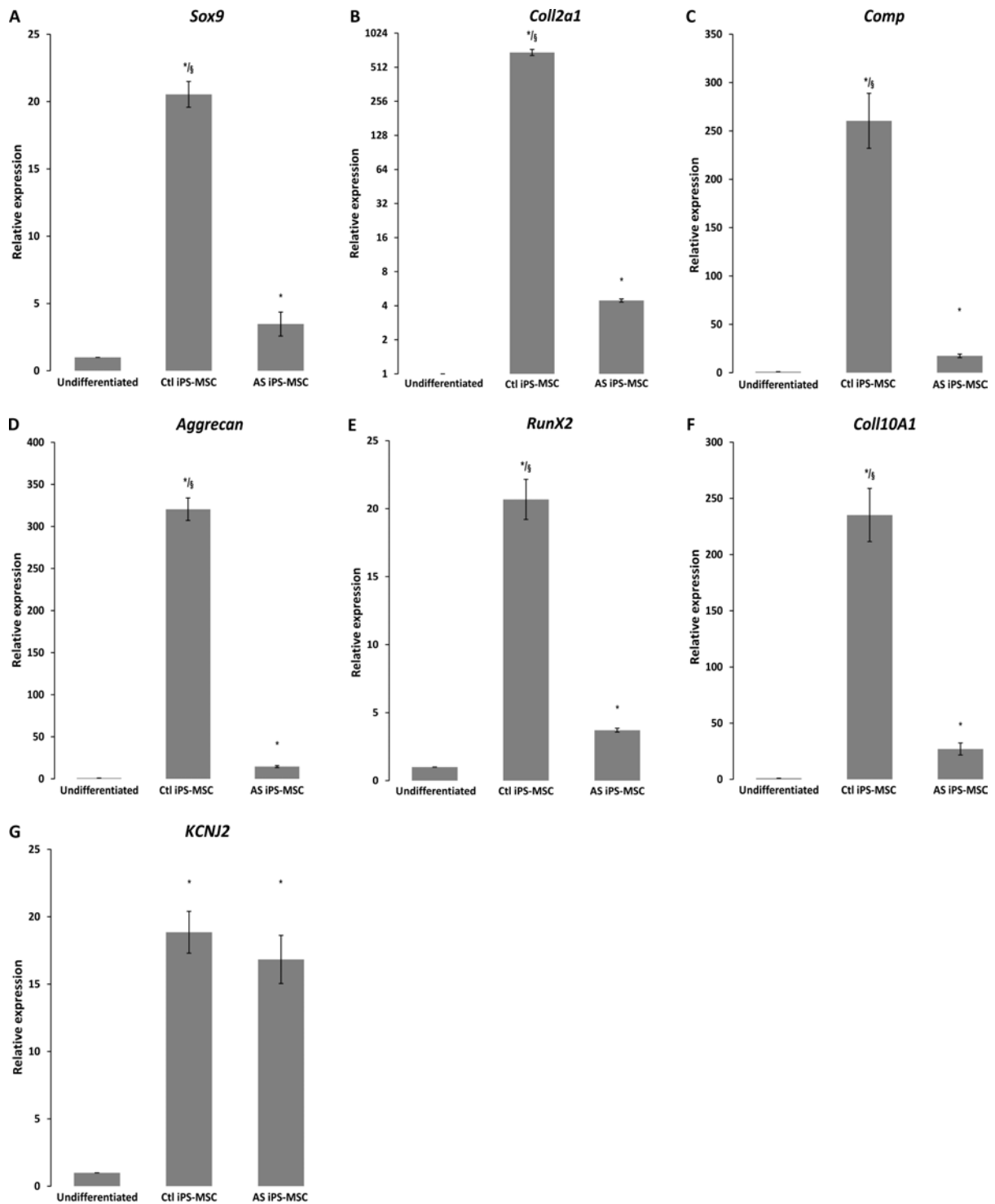
\* : Significativement différent des cellules non différenciées ( $p < 0,05$ )

§ : Significativement différent des cellules iPS-MSC Andersen ( $p < 0,05$ )

A l'inverse des cellules iPS-MSC contrôles, les cellules iPS-MSC Andersen présentent une capacité de différenciation en chondrocyte réduite. En effet, les

colorations au bleu d'Alcian, au bleu de Toluidine et à la Safranine O sont plus faibles par rapport au contrôle (Figure 64A). De plus, la quantification du bleu d'Alcian fixé après différenciation montre des valeurs trois fois inférieures chez les patients par rapport à celle retrouvée dans les cellules iPS-MSC contrôle (Figure 64B). La quantité de matrice cartilagineuse produite par les cellules iPS-MSC différenciées en chondrocyte est donc réduite lorsque le canal Kir2.1 est silencieux, suggérant un rôle de celui-ci dans la production de la matrice cartilagineuse.

Afin de déterminer l'impact de la perte de fonction du canal Kir2.1 sur la différenciation chondrocytaire, nous avons réalisé une étude des transcrits des principaux marqueurs cartilagineux. Dans un premier temps, nous avons déterminé si le canal Kir2.1 était exprimé dans les chondrocytes. Comme montré sur la figure 65G, l'expression de *KCNJ2* n'est détectée dans les cellules iPS-MSC qu'après différenciation, aussi bien chez les contrôles que les patients. L'étude des différents marqueurs chondrocytaires a révélé que l'expression de tous ces gènes était fortement diminuée en absence d'un canal Kir2.1 fonctionnel (Figure 65).



**Figure 65 : L'expression des marqueurs chondrocytaire est réduite lorsque le canal Kir2.1 est non fonctionnel.**

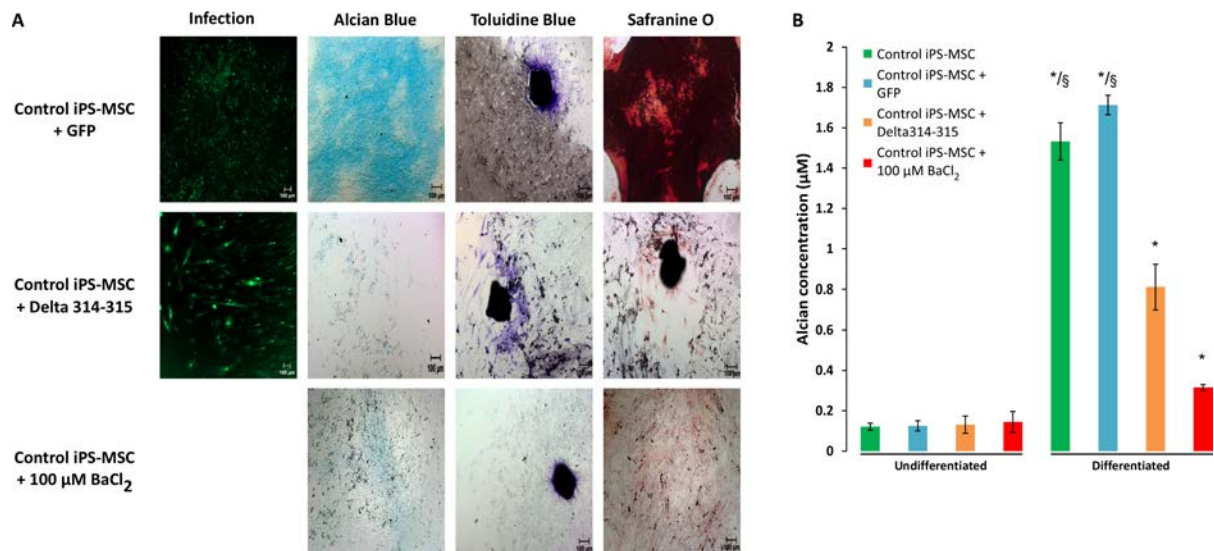
Expression des marqueurs chondrocytaire *Sox9* (A), *Collagène 2a1* (*Coll2a1*, B), *Cartilage Oligomeric Matrix Protein* (*Comp*, C), *Agrecan* (D), *RUNX2* (E), *Coll10A1* (F) et le gène *KCNJ2* (G), codant pour le canal Kir2.1, dans les cellules iPS-MSC contrôles et Andersen par rapport aux cellules iPS-MSC non différenciées. L'expression a été normalisée par rapport au gène de ménage 36B4.

\* : Significativement différent des cellules non différenciées (p<0,05)

§ : Significativement différent des cellules iPS-MSC Andersen (p<0,05)



Pour confirmer que le canal Kir2.1 était nécessaire à la différenciation en chondrocytes, nous avons infecté des cellules iPS-MSC contrôles avec un canal Kir porteur de la mutation  $\Delta 314-315$ , avant la différenciation. Cette mutation a un effet dominant négatif sur le canal Kir2.1 sauvage endogène. Nous avons en parallèle traité les cellules iPS-MSC contrôles avec du  $\text{BaCl}_2$  à 100  $\mu\text{M}$ , un inhibiteur sélectif des canaux Kir2.1. La perte de fonction du canal Kir2.1 dans les cellules contrôles, que ce soit avec un dominant négatif ou un traitement chimique, au début de la différenciation chondrocytaire, produit le même phénotype que celui observé avec les cellules iPS-MSC de patients. En effet, les coloration au bleu d'Alcian, au bleu de Toluidine, et la Safranine O sont fortement réduites lorsque les cellules iPS-MSC contrôles sont infectées avec une forme mutée du canal Kir2.1 (Figure 66A ; ligne du milieu), tandis que les cellules infectées avec la EGFP seule présente des capacités de différenciation similaires aux cellules iPS-MSC non infectées (Figure 66A, ligne du haut). De plus, l'inhibition chimique du canal Kir2.1 par un traitement au  $\text{BaCl}_2$  produit le même phénotype que les cellules iPS-MSC Andersen ou infectées avec la forme mutée du canal Kir2.1 (Figure 66A, ligne du bas). La quantification du bleu d'Alcian confirme les résultats observés précédemment : la perte de fonction du canal Kir2.1 réduit très fortement la quantité de bleu d'Alcian fixé (Figure 66B).



**Figure 66:** L'inhibition du canal Kir2.1 dans les cellules iPS-MSC diminue la quantité de matrice cartilagineuse produite.

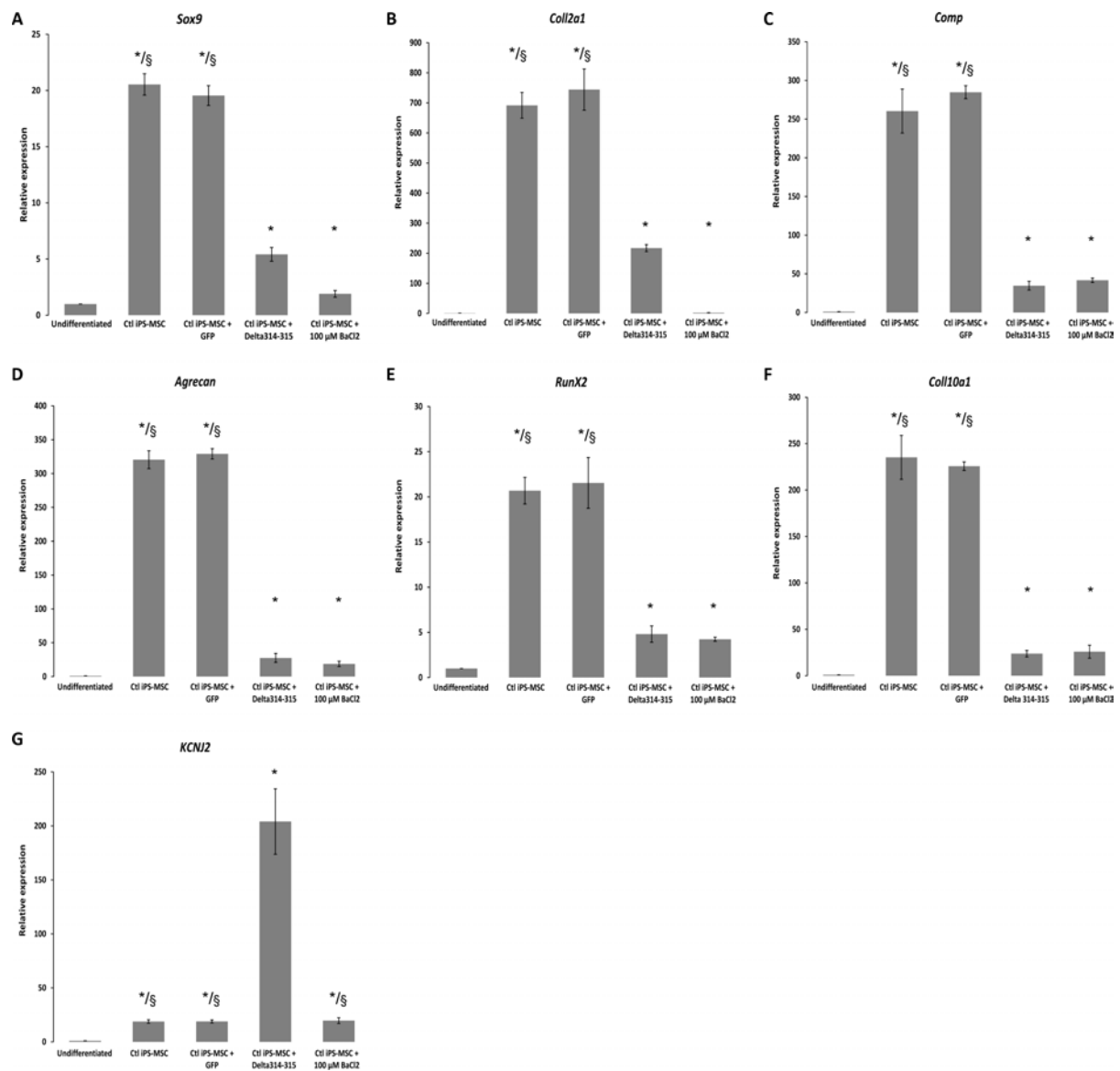
A : Les Colorations au bleu d'Alcian, au bleu de Toluidine, et à la Safranine O des cellules iPS-MSC contrôles infectées avec l'EGFP (ligne du haut), une forme mutée du canal Kir2.1 (ligne du milieu), ou traitées avec 100 μM de BaCl<sub>2</sub> (ligne du bas) différenciées en chondrocytes montrent que seules les cellules iPS-MSC contrôles infectées avec l'EGFP présentent une forte production de matrice cartilagineuse.

B : La quantification du bleu d'Alcian après différenciation montre que les cellules iPS-MSC contrôles invalidées pour le canal Kir2.1 produisent moins de matrice cartilagineuse par rapport aux cellules iPS-MSC contrôles.

\* : Significativement différent des cellules non différenciées (p<0,05)

§ : Significativement différent des cellules iPS-MSC Andersen (p<0,05)

De la même manière qu'avec les cellules iPS-MSC Andersen, la perte de fonction du canal Kir2.1 dans les cellules iPS-MSC contrôles entraîne une forte diminution dans l'expression des marqueurs chondrocytaires (Figure 67).



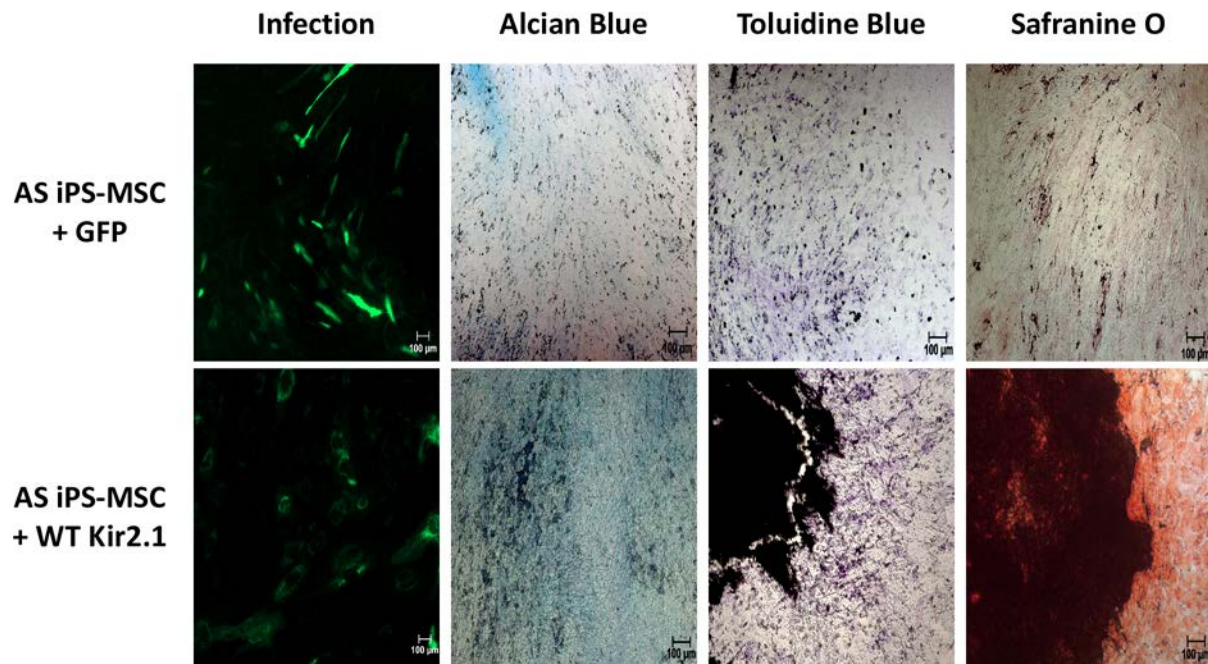
**Figure 67 : L'inhibition du canal Kir2.1 dans les cellules iPS-MSC contrôle entraîne une forte diminution dans l'expression des marqueurs chondrocytaires.**

Expression des marqueurs chondrocytaires *Sox9* (A), *Collagène 2a1* (*Coll2a1*, B), *Cartilage Oligomeric Matrix Protein* (*Comp*, C), *Agrecan* (D), *RUNX2* (E), *Coll10A1* (F) et le gène *KCNJ2* (G), codant pour le canal Kir2.1, dans les cellules iPS-MSC contrôles, ou infectées avec l'EGFP, ou infectées avec une forme mutée du canal Kir2.1, ou traitées au BaCl<sub>2</sub>, après différenciation par rapport aux cellules iPS-MSC non différenciées. L'expression a été normalisée par rapport au gène de ménage 36B4.

\* : Significativement différent des cellules non différenciées (p<0,05)

§ : Significativement différent des cellules iPS-MSC Andersen (p<0,05)

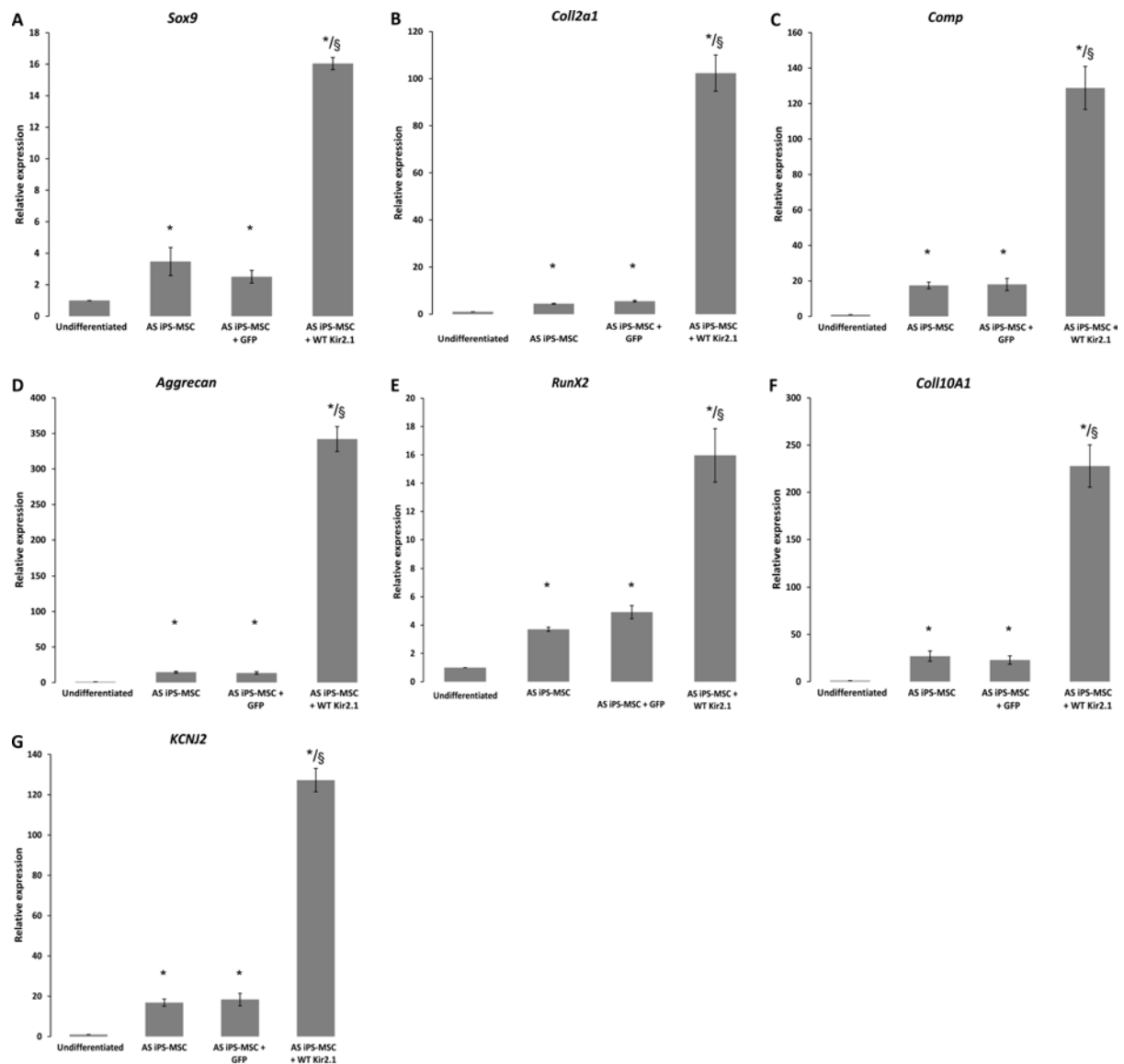
Afin de compléter notre étude, nous avons réalisé des expériences de sauvetage, en utilisant des cellules iPS-MSC Andersen infectées avec la forme sauvage du canal Kir2.1. Comme montré sur la figure 68, la réexpression d'un canal Kir2.1 fonctionnel dans les cellules de patients induit une différenciation chondrocytaire normale.



**Figure 68 : La réexpression d'un canal Kir2.1 sauvage dans les cellules iPS-MSC Andersen restaure leur capacité à se différencier en chondrocytes.**

Les colorations au bleu d'Alcian, au bleu de Toluidine, et à la Safranine O des cellules iPS-MSC Andersen infectées avec l'EGFP (ligne du haut), ou la forme sauvage du canal Kir2.1 (ligne du bas) différenciées en chondrocytes montrent que seules les cellules iPS-MSC Andersen infectées avec la forme sauvage du canal Kir2.1 présentent une forte production de matrice cartilagineuse.

En effet, les cellules iPS-MSC Andersen infectées avec l'EGFP seule ont un phénotype similaire aux cellules iPS-MSC Andersen non infectées, après différenciation : faible coloration au bleu d'Alcian, au bleu de Toluidine, et à la Safranine O (Figure 68, ligne du haut), donc une faible production de matrice cartilagineuse. En revanche, l'expression d'un canal sauvage dans les cellules de patients restaure leur capacité à se différencier en chondrocytes et à synthétiser de la matrice cartilagineuse (Figure 68, ligne du bas). De plus, la réexpression d'un canal Kir2.1 sauvage permet de retrouver une expression normale des marqueurs chondrocytaires, montrant que les cellules se sont bien différenciées en chondrocytes (Figure 69).



**Figure 69 : La réexpression d'un canal Kir2.1 sauvage dans les cellules iPS-MSC Andersen permet une forte augmentation de l'expression des marqueurs chondrocytaires.**

Expression des marqueurs chondrocytaires *Sox9* (A), *Collagène 2a1* (*Coll2a1*, B), *Cartilage Oligomeric Matrix Protein* (*Comp*, C), *Aggrecan* (D), *RUNX2* (E), *Coll10A1* (F) et le gène *KCNJ2* (G), codant pour le canal Kir2.1, dans les cellules iPS-MSC Andersen, infectées avec l'EGFP, ou infectées avec la forme sauvage du canal Kir2.1, après différenciation par rapport aux cellules iPS-MSC non différenciées. L'expression a été normalisée par rapport au gène de ménage 36B4.

\* : Significativement différent des cellules non différenciées (p<0,05)

§ : Significativement différent des cellules iPS-MSC Andersen (p<0,05)

Le canal potassique Kir2.1 semble donc être extrêmement important pour la différenciation chondrocytaire, aussi bien au niveau de l'expression génique, que pour la production de la matrice cartilagineuse. En effet, sa perte de fonction entraîne un défaut de la formation de chondrocytes.

Tout comme pour la différenciation ostéoblastique, la formation des chondrocytes se fait en plusieurs étapes. Les cellules MSC vont s'engager dans le lignage cartilagineux, sous l'influence du facteur de transcription *Sox9* et devenir des chondrocytes immatures. A ce stade, les cellules peuvent avoir deux devenir, en fonction du tissu concerné : soit elles se différencient en chondrocytes articulaires, continuant à exprimer *Sox9*, soit elles se différencient en chondrocytes hypertrophiques, sous l'influence du facteur de transcription *RunX2*. Ces deux facteurs de transcription vont activer l'expression de leurs gènes cibles, qui vont être importants pour la synthèse et la production de la matrice cartilagineuse.

La perte de fonction du canal Kir2.1, dans les cellules iPS-MSC Andersen, et contrôles que l'on a infectées avec une forme mutées du canal, ou traitées avec du BaCl<sub>2</sub>, provoque une faible expression de *Sox9*. Ce dernier est considéré comme le master gene de la différenciation chondrocytaire. En effet, sa perte de fonction provoque une absence de cartilage chez la souris. De plus, *Sox9* est exprimé dès le début de la différenciation en chondrocytes, et permet l'expression de tous les gènes importants pour la synthèse et la production de la matrice cartilagineuse, tels que *Comp*, *Agreacan* ou le *Coll2a1*. Sa faible expression dans les cellules invalidées pour le canal Kir2.1 peut donc expliquer la faible efficacité de différenciation chondrocytaire de ces cellules.

D'autre part, l'invalidation du canal Kir2.1 entraîne une diminution de l'expression de *RunX2*. Ce facteur de transcription contrôle la différenciation hypertrophique des chondrocytes en permettant l'expression des marqueurs des chondrocytes hypertrophiques, comme le *Coll10A1*, mais également la diminution des gènes impliqués dans la différenciation des chondrocytes articulaires, comme *Sox9* ou le *Coll2a1*. Ces résultats suggèrent que le canal Kir2.1 est également important pour la différenciation hypertrophique des cellules.

Enfin, la réexpression d'un canal sauvage dans les cellules iPS-MSC Andersen suffit à elle seule à restaurer leur capacité à se différencier en chondrocytes, avec une forte production de matrice cartilagineuse, mais également une forte expression de *Sox9* et *RunX2* ainsi que des gènes qui sont sous leur contrôle. Le canal Kir2.1 est donc essentiel pour assurer une différenciation chondrocytaire correcte des cellules iPS-MSC.

La faible expression de *Sox9* et de *RunX2* retrouvée dans les cellules de patients entraîne un défaut de formation des chondrocytes, et peut expliquer les problèmes de développement ainsi que la petite taille des patients Andersen.

L'ensemble de mes travaux de thèse a permis de montrer que d'une part la génération de cellules iPS à partir de myoblastes de patient atteints par le syndrome d'Andersen est un bon modèle afin d'étudier la physiopathologie de cette maladie. De plus, j'ai pu mettre en évidence que la perte de fonction du canal Kir2.1 entraînait une altération de tout le processus d'ossification puisque les cellules de patients présentent un défaut de différenciation en ostéoblastes, dû à une faible expression de *RunX2*, mais également un défaut de différenciation en chondrocytes, aussi bien articulaire qu'hypertrophique, de par la faible expression de *Sox9* et de *RunX2*. L'ensemble de ces résultats indique que le canal potassique Kir2.1 est un acteur majeur de l'ostéogenèse en contrôlant l'expression des deux master genes de la différenciation ostéogénique, à savoir *Sox9* et *RunX2*. Leur faible expression dans les cellules exprimant un canal Kir2.1 non fonctionnel peut expliquer les anomalies développementales retrouvées chez les patients.

# Discussion

---



L'ensemble de mes travaux de thèse avait pour objectif de déterminer l'implication du canal potassique Kir2.1 dans la morphogenèse osseuse. En effet, les patients atteints par le syndrome d'Andersen et porteurs d'une mutation sur le canal Kir2.1 présentent des malformations osseuses suggérant un rôle inattendu de ce canal dans le développement. De plus, les différents modèles animaux du syndrome d'Andersen présentent tous des anomalies développementales, allant jusqu'à la létalité juste après la naissance. Il est donc très difficile d'étudier les conséquences fonctionnelles de la perte de fonction du canal Kir2.1 dans les différents tissus atteints par le syndrome d'Andersen. L'absence de modèle *in vivo* m'a conduit, au cours de ma thèse, à développer un modèle d'étude *in vitro* et à générer des cellules iPS, à partir de cellules de patients, mais également à partir d'individus sains.

Ces cellules iPS ont été générées par une infection lentivirale avec une cassette de reprogrammation contenant les quatre gènes décrits pour générer des cellules iPS, à savoir *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* et *c-Myc*. Ces gènes sont connus comme étant les facteurs de Yamanaka, et ont été très largement utilisés pour générer des cellules iPS, à partir de plusieurs types cellulaires. Après la reprogrammation, les colonies avec une morphologie de cellules souches embryonnaires ont été repiquées individuellement pour obtenir une population clonale de cellules iPS. Nous avons ainsi pu isoler et amplifier 2 clones iPS issus de cellules d'un patient Andersen, et 4 clones iPS issus de cellules d'individus sains.

Au cours des passages précoces, les cellules iPS générées peuvent perdre leurs propriétés souches. En effet, si la reprogrammation est partielle, les gènes nécessaires au maintien de l'état souche, comme *Nanog*, ne sont pas exprimés et les cellules partiellement reprogrammées entrent en apoptose. Pour pallier à ce problème, nous avons sélectionné nos clones iPS à partir du passage 10. En effet, à partir de ce passage, le transgène devient silencieux, et si la reprogrammation s'est correctement effectuée, les gènes endogènes prennent le relais pour maintenir l'état souche des cellules. Les cellules iPS générées ont été gardées en culture pendant de nombreux passages, et ont toujours présentés une morphologie de cellules souches embryonnaires, ce qui signifie qu'elles sont capables d'auto-renouvellement. De plus les cellules iPS contrôles et Andersen expriment les marqueurs de la pluripotence, aussi bien génétiques que membranaires, et elles ont aussi une forte activité phosphatase alcaline. Bien que le rôle de cette enzyme dans les cellules souches embryonnaires ne soient pas bien connu, son

activité est considérée comme étant un marqueurs des cellules pluripotentes. Ainsi, les cellules iPS générées expriment les marqueurs de la pluripotence, suggérant que le canal Kir2.1 n'est pas essentiel au processus de reprogrammation.

Le gène *KCNJ2* est situé sur le bras long du chromosome 17. Ce chromosome est connu comme étant très sensible aux modifications lors du processus de reprogrammation. En effet, des délétions, des insertions ou des mutations ponctuelles peuvent être introduites lors de la reprogrammation (Mayshar et al., 2010). Nous avons séquencé l'intégralité de la séquence codante du gène *KCNJ2* et montré que le processus de reprogrammation n'avait pas modifié l'intégrité du gène. En effet, les cellules iPS Andersen présentent toujours la mutation C154Y associée à la pathologie tandis que les cellules iPS contrôles ont un gène *KCNJ2* sauvage.

Nous avons ensuite démontré que les cellules iPS que nous avons générées étaient capables de se différencier en cellules des trois feuillets embryonnaires *in vitro*, par la formation de corps embryoïdes. Ces structures particulières sont des agrégats flottant de cellules iPS dans lesquels les cellules se différencient spontanément en cellules des trois feuillets embryonnaires. Ces corps embryoïdes miment *in vitro* les étapes précoces du développement *in vivo* (Sheridan et al., 2012). Aucune différence n'a été observée dans les capacités de différenciation en cellules des trois feuillets embryonnaires entre les cellules iPS contrôles et Andersen, suggérant que le canal Kir2.1 n'est pas requis pour les étapes précoces du développement. Les cellules iPS générées présentent donc toutes les caractéristiques des cellules embryonnaires : auto-renouvellement et pluripotence.

Enfin, nous avons démontré que les cellules iPS Andersen présentaient une expression réduite des marqueurs ostéogéniques, par formation de corps embryoïdes. En effet, après différenciation, l'expression de *RUNX2* est réduite dans les cellules iPS de patient, ainsi que tous les gènes sous son contrôle au cours de la différenciation ostéoblastique, comme *Osterix* ou le *Collagène 1a1*. Bien que nous n'ayons pas différencié directement les cellules en ostéoblastes, ces résultats nous ont permis de valider l'utilisation des cellules iPS Andersen pour modéliser ce syndrome.

L'utilisation de cellules iPS pour modéliser des maladies rares est aujourd'hui très largement répandue. En effet, il suffit de récupérer n'importe quelle cellule de patients pour pouvoir générer des cellules iPS, qui pourront ensuite être différenciées en cellules d'intérêt. Cette approche permet de comprendre la pathophysiologie de

certaines maladies. Cependant, comme décrit dans l'introduction, cette approche présente certaines limitations, notamment par leur mémoire épigénétique. De plus, bien que les différentes cellules iPS générées à travers le monde soit morphologiquement indifférenciables, ces cellules présentent des capacités de différenciation différentes, due à la façon dont elles ont été générées, les conditions de culture et le type cellulaire utilisé pour obtenir les cellules iPS. Dans notre étude, nous avons utilisé le même type cellulaire pour générer nos cellules iPS, à savoir des myoblastes. Cette origine commune peut expliquer les similitudes dans l'expression des marqueurs de la pluripotence mais également dans leur capacité de différenciation.

Très peu d'études décrivent la génération de cellules iPS à partir de myoblastes. En effet, il a été démontré que MyoD, le master gene de la différenciation myogénique, avait un effet inhibiteur sur l'activité d'Oct4, ce qui limite fortement l'efficacité de reprogrammation (Watanabe et al., 2011). Pour augmenter le taux de reprogrammation, nous avons ajouté de petites molécules lors de la reprogrammation. Ces molécules sont des inhibiteurs de la GSK3, des histones déacétylases, de la signalisation TGF $\beta$  ainsi qu'un activateur de la PDK. Ce cocktail de petites molécules est décrit pour augmenter l'efficacité de reprogrammation (Trokovic et al., 2013).

Malgré cela, nous n'avons réussi à isoler et à amplifier que deux clones iPS Andersen, à partir d'un seul patient et quatre clones contrôles. Bien qu'aucune corrélation entre le génotype et le phénotype des patients n'ait pas été, à ce jour, faite, c'est à dire que la même mutation n'a pas le même phénotype clinique au sein des membres de la même famille ou entre individus différents, il serait intéressant de générer des cellules iPS à partir de cellules de patients portant une autre mutation que la C154Y. De plus, bien que le même type cellulaire ait été utilisé pour générer nos cellules iPS, les cellules d'origine ne proviennent pas du même individu. Il est démontré que les cellules iPS gardent la mémoire épigénétique de leur cellule d'origine, c'est à dire le profil de méthylation de l'ADN. Cette mémoire épigénétique peut influencer sur les capacités de différenciation des différents clones iPS. Ainsi, des différences entre nos cellules iPS peuvent être dues à cette mémoire épigénétique. Grâce aux techniques de gene editing, il est aujourd'hui possible de modifier directement un gène pour introduire ou réverter une mutation dans une cellule. Il serait très intéressant d'introduire différentes mutations associées au syndrome d'Andersen dans nos cellules iPS contrôles, ou de réverter la mutation dans les cellules iPS Andersen. Ainsi les deux types cellulaires

n'auraient pour unique différence que la présence de la mutation sur le gène *KCNJ2*. Cette approche permettrait de s'affranchir des problèmes liés à la mémoire épigénétique des cellules iPS.

Après avoir généré, caractérisé et validé l'utilisation des cellules iPS Andersen pour modéliser ce syndrome, nous avons étudié les conséquences fonctionnelles de la perte de fonction du canal Kir2.1 sur le développement osseux. Pour cela, nous avons, dans un premier temps, différencié les cellules iPS en cellules souches mésenchymateuse (MSC). Alors que de nombreux protocoles de générations de cellules MSC à partir de cellules iPS passent par une étape de différenciation en corps embryoïdes (Hynes et al., 2014; Mohsen-Kanson et al., 2014), nous avons mis au point un protocole de différenciation spontanée, avec un milieu spécifique. Les cellules iPS-MSC générées présentent toutes les caractéristiques phénotypiques de cellules MSC tissulaires, et répondent aux différents critères pour qualifier une population cellulaire de MSC (Dominici et al., 2006). En effet, nos cellules iPS-MSC sont adhérentes au plastique et présentent une expression des marqueurs typiques de MSC CD105, CD73, CD90 ainsi qu'une absence d'expression des marqueurs hématopoïétiques CD34, CD14 et CD11b. Alors que les protocoles de différenciation de cellules iPS en cellules MSC nécessitent une étape de tri pour éliminer les cellules non désirées, notre protocole permet l'obtention rapide d'une population homogène de cellules iPS-MSC, sans tri cellulaire. En effet, un seul passage suffit pour que l'expression ou l'absence d'expression des différents marqueurs soit homogène au sein de la culture, suggérant que toutes les cellules iPS se sont différenciées, ou que celles qui ne sont pas différenciées sont éliminées dès le premier passage.

*In vivo*, les cellules MSC sont des cellules multipotentes, capables de se différencier en de nombreux types cellulaires différents. *In vitro*, les capacités de différenciation de ces cellules sont plus limitées. En effet, les cellules MSC tissulaires sont caractérisées, *in vitro*, par leur capacité à se différencier en adipocytes, ostéoblastes et chondrocytes. Afin de démontrer que nos cellules iPS s'étaient bien différenciées en cellules MSC, nous avons différencié les cellules iPS-MSC contrôles et Andersen en adipocytes. Les adipocytes sont des cellules constituant le tissu adipeux, et sont caractérisées par leur capacité à stocker des acides gras dans des gouttelettes lipidiques, ainsi que par l'expression de plusieurs facteurs, tels que peroxydase *proliferator-activated receptor  $\gamma$*  (*PPAR $\gamma$* ; Koppen and Kalkhoven, 2010). *PPAR $\gamma$*  est le master gene

de la différenciation adipocytaire, et permet l'expression des gènes impliqués dans la fonction de l'adipocyte. Les cellules iPS-MSC générées, qu'elles soient contrôles ou Andersen, sont capables de se différencier en adipocytes fonctionnels. En effet, après différenciation, des gouttelettes lipidiques sont observées dans les cellules iPS-MSC des deux génotypes, et les cellules iPS-MSC expriment le marqueur *PPAR $\gamma$* , ainsi que la *Péripiline b (PLNB)* qui est un marqueur des gouttelettes lipidiques fonctionnelles (Brasaemle, 2007). Les cellules iPS-MSC générées sont donc bien capables de se différencier en adipocytes fonctionnels, capables de stocker des acides gras, mais exprimant également des marqueurs adipocytaires. Aucune différence n'a été observée dans la capacité de différenciation en cellules MSC ou en adipocytes des cellules iPS contrôles et Andersen, suggérant que le canal Kir2.1 n'est pas requis pour la différenciation mésodermale des cellules iPS. De plus, les cellules iPS-MSC générées ne présentent aucun courant Kir2.1, suggérant que ce canal semble donc avoir un rôle tardif dans le développement, probablement dans des cellules spécifiques.

Après avoir produit et caractérisé les cellules iPS-MSC contrôles ou Andersen, nous avons étudié leur capacité de différenciation en ostéoblastes et en chondrocytes. Les ostéoblastes sont des cellules spécialisées, capables de produire une matrice osseuse d'hydroxyapatite. Les cellules iPS-MSC contrôles sont capables de se différencier en ostéoblastes fonctionnels, capables de produire cette matrice. Ils possèdent également une forte activité phosphatase alcaline, une enzyme essentielle à la formation de l'os, et au processus de minéralisation. En effet, la phosphatase alcaline permet de cliver les groupements phosphate de calcium, ce qui permet la formation de la matrice osseuse (Glass et al., 2005; Orimo, 2010). Les cellules iPS-MSC contrôles sont donc bien capables de se différencier en ostéoblastes matures capables de produire une matrice extracellulaire calcifiée.

Nos résultats montrent que les cellules iPS-MSC Andersen sont également capables de se différencier en ostéoblastes, mais l'efficacité de cette différenciation est réduite comparée aux cellules iPS-MSC contrôles. En effet, la quantité de matrice produite est très largement réduite lorsque le canal Kir2.1 est non fonctionnel. De plus, ces cellules présentent une activité phosphatase alcaline très fortement réduite, ce qui pourrait expliquer la faible minéralisation. Enfin, les ostéoblastes contrôles présentent un fort courant Kir2.1 tandis que les ostéoblastes Andersen n'en ont pas. Le canal Kir2.1

doit donc être fonctionnel pour la maturation des ostéoblastes, c'est à dire la production de la matrice extracellulaire.

Afin de s'assurer que les différences dans les capacités de différenciation n'étaient pas liées à un problème de culture, ou dues aux clones iPS générées, nous avons également inhibé l'activité du canal Kir2.1 dans les cellules iPS-MSC contrôles par traitement au BaCl<sub>2</sub>. Cette inhibition produit le même phénotype que celui retrouvé avec les cellules de patient. En effet, en absence d'un canal Kir2.1 fonctionnel, les cellules iPS-MSC contrôles présentent une capacité de différenciation réduite, avec une faible activité phosphatase alcaline et une faible production de matrice osseuse, confirmant le rôle clé du canal Kir2.1 dans le processus de minéralisation.

Le BaCl<sub>2</sub> va bloquer physiquement le pore du canal, ce qui va entraîner l'arrêt de passage des ions, rendant ainsi silencieux tous les canaux Kir2.1 présents à la membrane. Cependant, même si sa spécificité a été démontrée, à la concentration que nous avons utilisée, cela reste un inhibiteur qui peut avoir des effets non spécifiques sur la différenciation des cellules. En effet, les cellules traitées avec du BaCl<sub>2</sub> présentent un phénotype plus sévère, avec une absence quasi complète de matrice extracellulaire, ce qui peut être dû à l'inhibition totale des canaux Kir2.1 endogènes, mais également à des effets non spécifiques de ce composé sur d'autres protéines. Il serait intéressant de surexprimer une forme dominante négative du canal Kir2.1 dans les cellules contrôles. En effet, les sous unités sauvages vont s'associer aux sous unités mutantes et provoquer la perte de fonction de la majorité des canaux Kir2.1 à la membrane.

Pour contourner tout problème qui pourrait provenir de l'utilisation du BaCl<sub>2</sub>, nous avons surexprimé un canal Kir2.1 sauvage dans les cellules iPS-MSC Andersen. La restauration de la fonction du canal permet de restaurer la capacité des cellules à se différencier en ostéoblastes, avec une forte activité phosphatase alcaline et une forte production de matrice extracellulaire. Bien que la surexpression d'une protéine puisse avoir des effets délétères sur les cellules, la combinaison d'expérience d'inhibition dans les cellules contrôles et de sauvetage dans les cellules de patients démontre que la différenciation en ostéoblastes des cellules iPS-MSC nécessite un canal Kir2.1 fonctionnel.

Afin de déterminer le rôle précis du canal Kir2.1 au cours de la différenciation, nous avons déterminé les conséquences fonctionnelles de sa perte de fonction sur l'ensemble du processus, par une analyse du niveau d'expression de plusieurs

marqueurs ostéoblastiques. Cette étude nous a permis de montrer pour la première fois que la perte de fonction du canal Kir2.1 entraînait une très forte diminution de l'expression de *RUNX2*, ainsi que de tous les gènes sous son contrôle. En effet, *RUNX2* est le master gene de la différenciation ostéoblastique, et permet l'engagement des cellules MSC dans le lignage osseux, mais également l'expression des différents facteurs impliqués dans le processus de synthèse et production de la matrice extracellulaire. Son expression réduite peut donc expliquer les problèmes développementaux retrouvés chez les patients Andersen.

De plus, nous avons montré que son expression est directement dépendante de la fonction du canal Kir2.1 puisqu'une inhibition du canal après engagement des cellules MSC dans le lignage ostéoblastique, donc après l'expression précoce de *RUNX2* et d'*OSX*, bloque l'expression de *RUNX2*, de ses gènes cibles et empêchent également la production de la matrice extracellulaire. Même si *RUNX2* est capable de s'autoréguler, et d'activer sa transcription, la fonctionnalité du canal Kir2.1 est nécessaire pour avoir une expression normale de *RUNX2*, et un processus de différenciation correcte. Enfin, nous avons démontré que l'expression d'un canal Kir2.1 sauvage dans les cellules de patients permet de récupérer une expression de *RUNX2* normale. Il est intéressant de noter que la perte de fonction du canal provoque une diminution de la formation des ostéocytes. En effet, l'expression des marqueurs des ostéocytes *SOST* et *PDPN* est fortement réduite dans les cellules avec un canal Kir2.1 non fonctionnel. Les ostéocytes sont les cellules les plus abondantes de l'os, et ont un rôle extrêmement important. En effet, les ostéocytes sécrètent des molécules, qui vont induire la formation de matrice par les ostéoblastes, ou à l'inverse induire la résorption de l'os par les ostéoclastes (Caetano-Lopes et al., 2007). Ces ostéocytes sont des ostéoblastes emprisonnés dans leur propre matrice. La perte de fonction du canal Kir2.1 provoque une altération de tout le processus de différenciation osseuse, depuis l'engagement des cellules MSC jusqu'aux étapes finales de maturation et de formation des ostéocytes. Chez l'homme, l'haplo-insuffisance de *RUNX2* est associée avec la dysplasie cleidocraniale (CCD). Cette maladie est caractérisée par de sévères malformations développementales, notamment une hypoplasie des clavicules, des anomalies dentaires, une petite taille et une fontanelle persistante (Otto et al., 1997). La baisse d'expression de *RUNX2* dans les cellules avec un canal Kir2.1 non fonctionnel peut expliquer les malformations osseuses retrouvées chez les patients Andersen, car certains phénotypes sont communs avec ceux de la CCD.

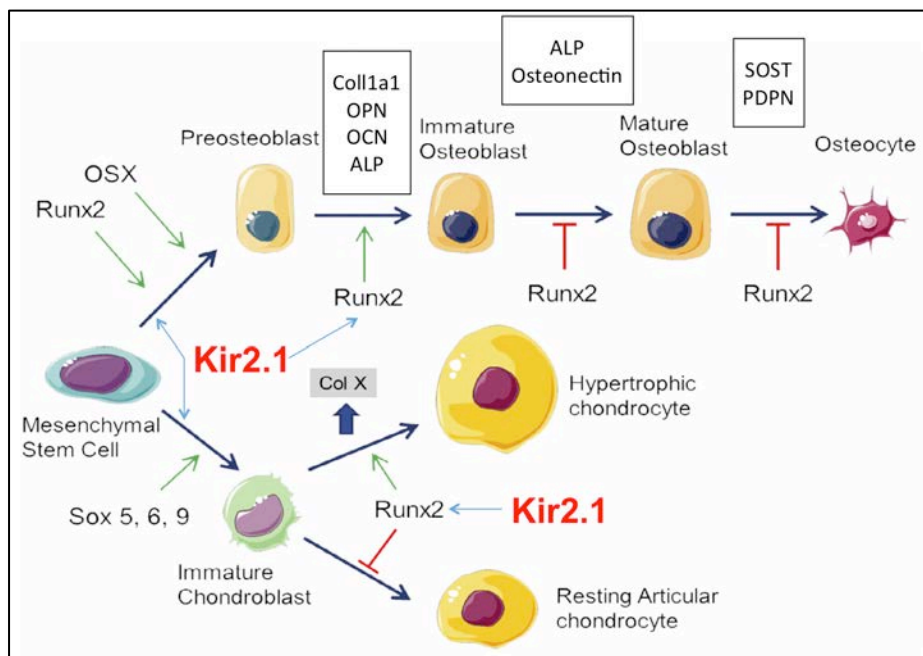
Nos résultats montrent également que le canal Kir2.1 est essentiel à la différenciation chondrocytaire. En effet, les cellules iPS-MS-C contrôles sont capables de se différencier en chondrocytes tandis que les cellules invalidées pour le canal Kir2.1 présentent une efficacité de différenciation réduite avec une faible production de matrice cartilagineuse. Cette faible production de matrice est due à la faible expression de *Sox9* dans les cellules invalidées pour le canal Kir2.1. De plus, l'ensemble du processus de différenciation est affecté car l'expression des marqueurs des chondrocytes hypertrophiques, comme *RUNX2*, est également réduite dans les cellules où le Kir2.1 ne fonctionne pas. L'expression d'un canal Kir2.1 sauvage dans les cellules de patients permet de restaurer l'expression des marqueurs de différenciation, ainsi que la capacité à produire une matrice cartilagineuse, démontrant ainsi le rôle central du canal Kir2.1 dans le processus de différenciation chondrocytaire.

La production de matrice extracellulaire par les chondrocytes est dépendante du potentiel de repos membranaire (Wu and Chen, 2000). En effet, une étude a montré que des chondrocytes articulaires humains présentent de nombreux canaux ioniques à leur surface et que ceux-ci seraient importants pour la production de matrice extracellulaire (Park et al., 2011). Dans cette étude, le canal Kir2.2 a été identifié et semble avoir un rôle important dans le fonctionnement des chondrocytes, tandis que le canal Kir2.1 n'est que très peu exprimé. A ce jour, aucune étude n'a identifié le canal Kir2.1 comme essentiel à la différenciation chondrocytaire. En effet, dans l'étude citée précédemment, les chondrocytes étudiés étaient des chondrocytes articulaires, prélevés chez un adulte sain. Nos résultats démontrent que dans notre système d'étude le canal Kir2.1 est très fortement exprimé, et que son activité est essentielle à la différenciation en chondrocytes. De plus tout le processus de différenciation semble être altéré car l'expression de *Sox9* est très fortement réduite, ce qui diminue l'expression de tous les gènes sous son contrôle. Il est tout à fait envisageable que dans le tissu cartilagineux adulte, le canal Kir2.1 ne soit pas exprimé. En effet, les patients atteints du syndrome d'Andersen ne présentent pas d'anomalies cartilagineuses, suggérant un rôle central du canal Kir2.1 uniquement pendant le développement du tissu cartilagineux. Il serait intéressant d'étudier dans le détail le cartilage des patients Andersen, pour déterminer s'ils présentent des anomalies de ce tissu. Nous pouvons également envisager un changement d'expression des deux isoformes Kir, le Kir2.1 pendant l'embryogénèse et le Kir2.2 chez l'individu adulte.



Nos résultats montrent un défaut de différenciation chondrocytaire des cellules iPS-MSC dont le canal Kir2.1 n'est pas fonctionnel. Dans cette étude, nous avons analysé les cellules à la fin de la différenciation. Il serait intéressant d'analyser tout le processus de différenciation, de la même manière que ce que nous avons fait pour les ostéoblastes, pour déterminer précisément le rôle du canal Kir2.1 au cours de la chondrogenèse, et déterminer les conséquences fonctionnelles de sa perte de fonction au cours de ce processus. La forte diminution de l'expression de *Sox9* lorsque le canal Kir2.1 est inactif pourrait expliquer, avec la diminution de l'expression de *RUNX2* les malformations développementales et la petite taille des patients.

L'ensemble de mes résultats de thèse démontre que le canal Kir2.1 est nécessaire à tout le processus de morphogénèse osseuse, *via* le contrôle de l'expression de *RUNX2* et *Sox9*. En effet, la présence d'un canal fonctionnel est nécessaire pour assurer une différenciation correcte des cellules. Mes résultats montrent également que ce canal est requis pendant tout le processus de différenciation. La perte de fonction de celui-ci provoque un arrêt de la différenciation ostéoblastique. Le canal potassique Kir2.1 est donc un acteur central de la morphogénèse osseuse (Figure 70).

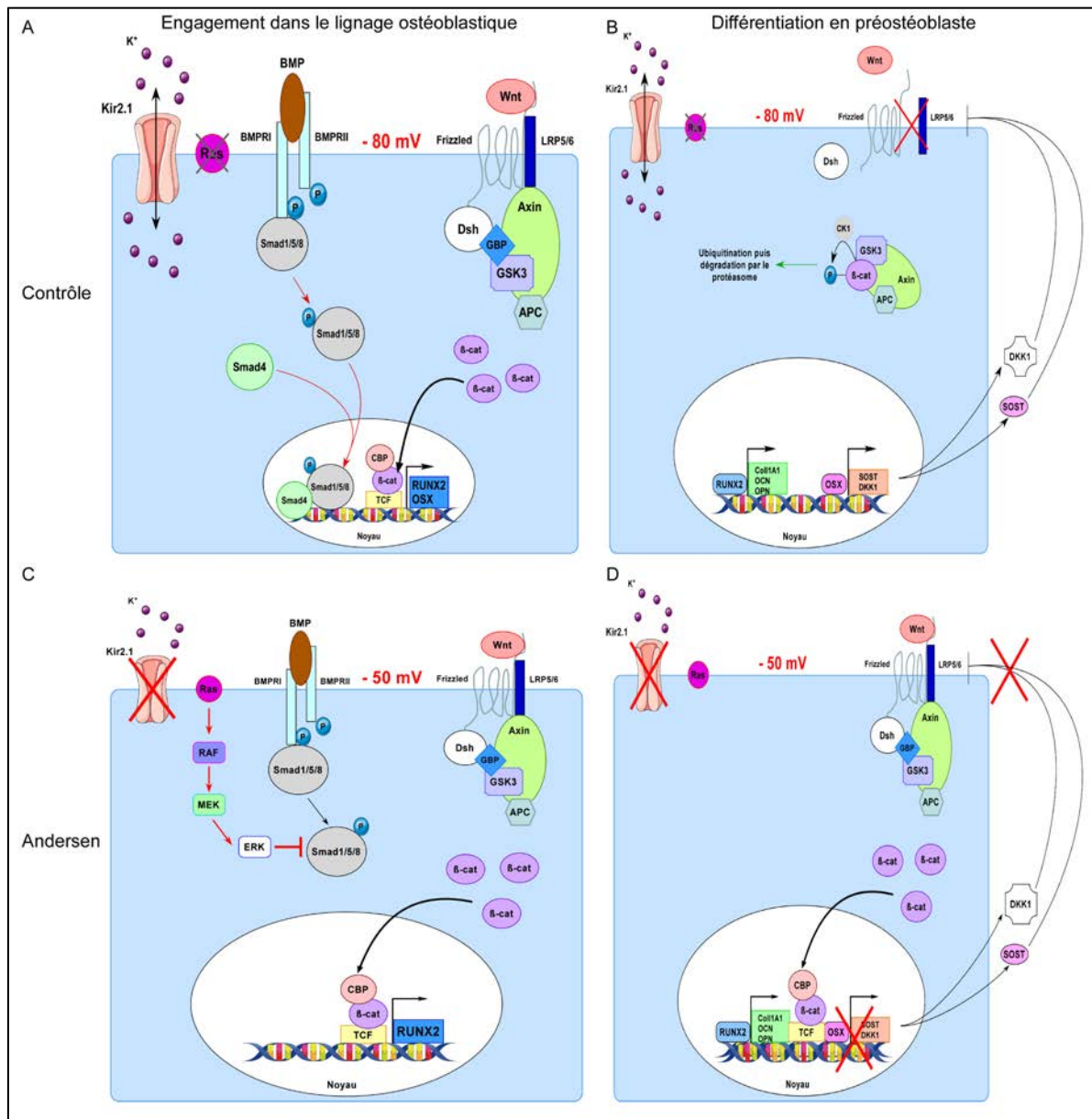


**Figure 70 : Le canal Kir2.1 est essentiel à l'expression de *RUNX2* et de *Sox9* au cours de la morphogénèse osseuse.**

Mais comment un canal ionique membranaire peut avoir un effet sur l'expression des facteurs de transcription nucléaires ? Notre hypothèse est que le canal Kir2.1 contrôle les voies de signalisation ostéochondrogéniques, qui conduisent à l'expression de *RUNX2* et de *Sox9*, *via* le contrôle du potentiel membranaire. En effet, le canal Kir2.1 est responsable du maintien du potentiel de repos des cellules et sa perte de fonction induit une altération de ce potentiel. En effet, une étude sur des myoblastes Andersen a montré que ces cellules possédaient un potentiel de repos plus positif (donc dépolarisé) que des cellules avec un canal Kir2.1 fonctionnel (Sacconi et al., 2009). Dans les cellules musculaires, cette dépolarisation des cellules au repos provoque une activation des canaux sodiques, les rendant non disponibles lorsqu'un influx nerveux arrive, ce qui provoque des épisodes de paralysie. Outre son rôle dans l'excitabilité cellulaire, le potentiel de repos permet de maintenir une certaine composition lipidique de la membrane plasmique (Zhou et al., 2015). Une étude a montré que la dépolarisation de la membrane plasmique change sa composition lipidique, ce qui permet le recrutement de petites protéines G, et active des voies de signalisation comme la voie Ras/MAPK (Zhou et al., 2015). Il est également démontré que la voie Ras/MAPK a un effet inhibiteur sur la voie BMP, *via* la protéine kinase Erk (Sapkota et al., 2007). En effet, cette kinase peut phosphoryler Smad1/5, ce qui crée un site d'ubiquitination et entraîne sa dégradation, ce qui atténue *in fine* la signalisation BMP (Sapkota et al., 2007).

Il est tout à fait envisageable que la dépolarisation induite par la perte de fonction du canal Kir2.1 ait un impact sur la voie BMP. En effet, il a été démontré que les souris et les drosophiles invalidées pour le canal Kir2.1 présentaient un phénotype similaire aux souris et drosophiles invalidées pour les acteurs de la voie TGF $\beta$ /BMP (Dahal et al., 2012). La voie BMP permet également d'induire directement la transcription de *RUNX2* et de *Sox9*, mais aussi celle de la phosphatase alcaline *via* la voie canonique de Wnt (Rawadi et al., 2003). Notre hypothèse est que la perte de fonction du canal Kir2.1 provoque une dépolarisation des cellules, ce qui pourrait activer une voie de signalisation qui ne devrait pas l'être, ou bloquer la formation d'un récepteur fonctionnel, ce qui aboutit à une diminution de la transduction du signal, donc une baisse d'expression de *Sox9* dans les chondrocytes ou de *RUNX2* dans les ostéoblastes. De plus, cette baisse d'expression de *RUNX2* entraîne une diminution de l'expression d'*OSX*, dans les ostéoblastes. Ce dernier est extrêmement important pour inhiber la voie canonique de Wnt au cours des étapes précoces de différenciation ostéoblastique, *via*

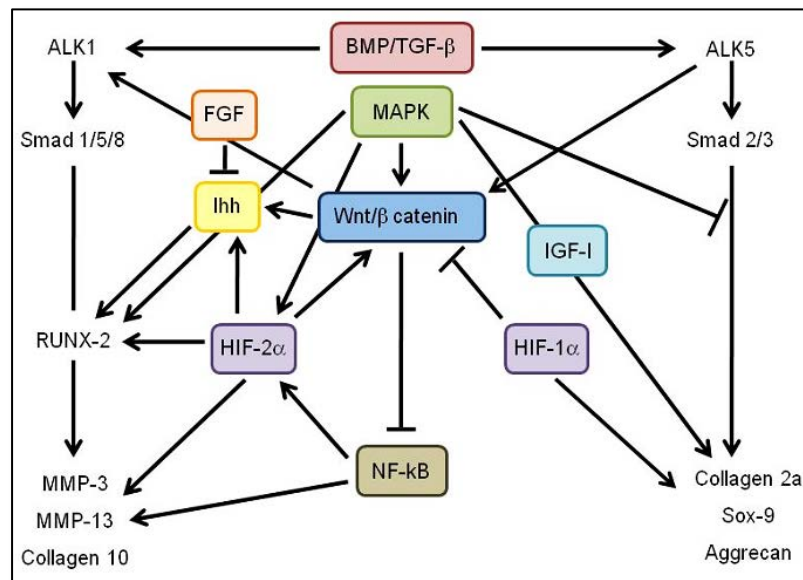
l'induction de l'expression des antagonistes de Wnt, SOST et DKK1 (Zhang, 2012). En effet, la voie canonique de Wnt permet aux cellules MSC de proliférer, tout en commençant à exprimer *RUNX2* et *OSX*, ce qui réduit leur prolifération et les différencie en préostéoblastes (Zhang, 2012). La perte de fonction du canal Kir2.1 pourrait donc avoir un effet sur l'engagement des cellules dans le lignage ostéoblastique, en réduisant la signalisation BMP *via* l'activation de la voie Ras/MAPK, ce qui aboutit à la baisse d'expression de *RUNX2*, d'*OSX* et donc une non inhibition de la voie Wnt, ce qui bloquerait les cellules dans un état prolifératif, en les empêchant de se différencier (Figure 71).



**Figure 71 : Mécanisme moléculaire hypothétique des conséquences de la perte de fonction du canal Kir2.1, pendant l'ostéogénèse.**

- (A) Au cours de la différenciation osseuse, les cellules s'engagent dans le lignage ostéoblastique, par l'activité de la signalisation BMP et Wnt, ce qui aboutit à l'expression de RUNX2 et OSX.
- (B) Une fois RUNX2 et OSX exprimé, ils vont activer la transcription de leur gène cible. OSX va permettre l'expression de SOST et DKK1, qui vont inhiber la voie WNT. Les cellules vont alors arrêter de proliférer et se différencier en préostéoblastes.
- (C) Lorsque le canal Kir2.1 est non fonctionnel, le potentiel de membrane est altéré. Ce changement perturbe la composition lipidique de la membrane et active la voie Ras/MAPK, qui va phosphoryler Smad1/5/8, ce qui entraîne sa dégradation.
- (D) Cette inhibition de la signalisation BMP entraîne une diminution de l'expression de RUNX2 et OSX, qui ne vont plus activer la transcription de leur gène cible. La voie Wnt n'est donc plus inhibée, et les cellules deviennent incapables de se différencier en ostéoblastes.

Nos résultats montrent que la perte de fonction du canal Kir2.1 bloque la différenciation chondrocytaire, *via* une forte diminution de l'expression de *Sox9*. Notre hypothèse de l'impact de la perte de fonction du canal Kir2.1 sur la signalisation BMP est également valide dans le contexte de la différenciation chondrocytaire. En effet, c'est la seule voie commune d'activation de l'expression de *RUNX2* et de *Sox9* (Figure 72).



**Figure 72 : Principales voies régulant *Sox9* et *RUNX2* lors de la chondrogenèse**

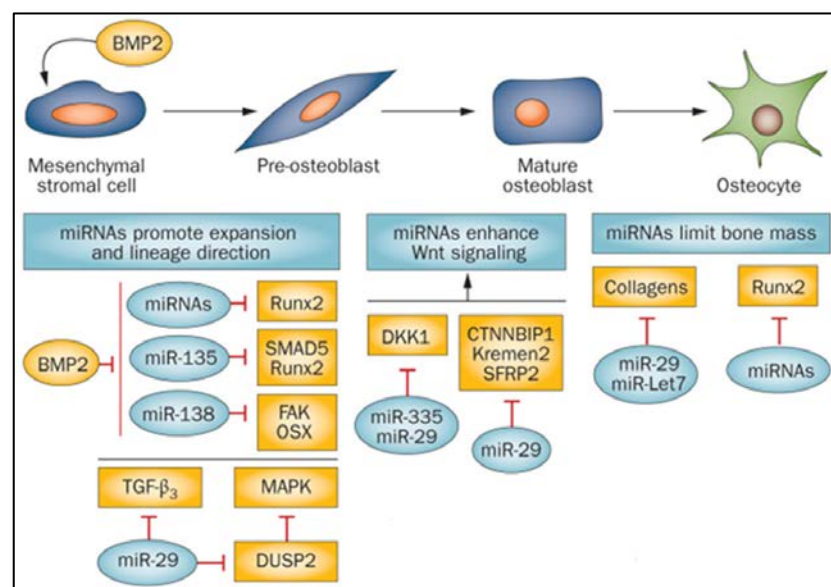
Adapté de Mariani et al., 2014

Alors que *Sox9* et *RUNX2* sont régulés de manière opposée par la plupart de ces voies (ex. inhibition de *Sox9* par la voie p38/MAPK et activation de *RUNX2* par la même voie), nos résultats montrent que *Sox9* et *RUNX2* sont tous les deux sous-exprimés lorsque le canal Kir 2.1 est non fonctionnel. La voie de régulation commune à *Sox9* et *RUNX2* est la voie BMP/TFG-β, qui permet d'une part l'expression de *Sox9* après phosphorylation des Smad2/3, et d'autre part l'expression de *RUNX2* après phosphorylation des Smad1/5/8. Les Smad 2/3 sont régulées par le récepteur Activin-Like Kinase (ALK) 5 alors que les Smad 2 et 3 sont régulés par ALK1, qui dépendent tous les deux du signal BMP/TGF-β (Mariani et al., 2014). Ainsi, une dérégulation de la signalisation BMP/TGFβ a un impact aussi bien sur la différenciation ostéoblastique que sur la différenciation chondrocytaire.

Il serait intéressant de confirmer cette hypothèse, notamment en montrant que les ostéoblastes Andersen ont un potentiel de repos différent des cellules contrôles.

Ensuite, il serait intéressant d'étudier l'état d'activation de la voie BMP dans les cellules de patients Andersen, comme la phosphorylation des Smad, pour déterminer si elles sont plus phosphorylées et dégradées que dans les cellules contrôles, ou étudier la phosphorylation de Erk, qui permet la dégradation des Smad. Il serait également intéressant de regarder la voie canonique de Wnt, pour déterminer si son inhibition a lieu dans les cellules de patients. Enfin, il serait intéressant de rajouter du BMP soluble au cours de la différenciation des cellules iPS-MSC Andersen, pour déterminer si cet ajout permet de restaurer les capacités de différenciation des cellules, aussi bien en ostéoblastes qu'en chondrocytes. Il serait également intéressant d'étudier d'autres voies de signalisation impliquées dans la régulation de *Sox9* et de *RUNX2*, afin de déterminer si les perturbations membranaires altèrent d'autres voies de signalisations importantes à la chondrogenèse, et donc au développement osseux.

Les miRNA sont de petits ARN non codants (environ 20 nucléotides) qui ont un rôle extrêmement important dans de nombreux processus biologiques. Ils peuvent se fixer dans la région 3' non traduites des ARNm cibles, et entraîner leur dégradation, permettant ainsi une régulation post transcriptionnelle de nombreux gènes. Depuis quelques années, les miRNA ont été décrits pour être impliqués dans la différenciation des cellules MSC en ostéoblastes, en ayant un rôle soit pro-ostéogénique, soit anti-ostéogénique (Figure 73; Lian et al., 2012).



**Figure 73 : Régulation de la différenciation ostéoblastique par les miRNA.**

Adapté de Lian, 2012.

Il serait intéressant d'étudier les conséquences de la perte de fonction du canal Kir2.1 sur le profil d'expression des miRNA, pour déterminer les éventuelles différences entre les cellules iPS-MSC contrôles et patients.

Environ 30% des patients atteints du syndrome d'Andersen ne présentent pas de mutations sur le canal Kir2.1. A ce jour, la ou les protéines responsables du syndrome d'Andersen de type II ne sont pas identifiées. Il serait intéressant de générer des cellules iPS issues de patients Andersen de type II, d'une part, pour déterminer si l'activité Kir2.1 est absente, et si l'absence de mutation sur le canal Kir2.1 provoque également une réduction de l'expression de *RUNX2* et de *Sox9*, et d'autre part, pour identifier les protéines impliquées dans ce syndrome, et d'identifier les partenaires moléculaires du canal Kir2.1.

L'ensemble de mes travaux de thèse a permis de mettre en évidence le rôle central du canal Kir2.1 dans la morphogenèse osseuse. En effet, même si des observations avaient permis de faire le lien entre ce canal et le développement du tissu osseux, aucune étude n'avait démontré le rôle clé du canal dans les processus de différenciation osseuse et chondrocytaire. Mes résultats démontrent pour la première fois qu'un canal Kir2.1 fonctionnel est nécessaire pour avoir une expression normale de *RUNX2* et *Sox9*. L'ensemble de ces résultats reste à confirmer *in vivo*, lorsqu'une souris KO inductible pour le canal Kir2.1 sera disponible. Bien que le mécanisme moléculaire précis reste encore à déterminer, ces résultats permettent d'expliquer les malformations osseuses retrouvées chez les patients Andersen.

Ces travaux de thèse ont également permis de mettre en place le premier modèle de cellules iPS issues de patients Andersen, qui vont permettre de modéliser ce syndrome *in vitro*, et de comprendre les conséquences fonctionnelles de la perte de fonction du canal Kir2.1 dans les différents tissus affectés par la maladie, et à terme tester de nouvelles cibles thérapeutiques pour améliorer les conditions de vie des patients.

# Bibliographie

---



Aasen, T., Raya, A., Barrero, M.J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilić, J., Pekarik, V., Tiscornia, G., et al. (2008). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat. Biotechnol.* *26*, 1276–1284.

Adams, D.J., and Hill, M.A. (2004). Potassium channels and membrane potential in the modulation of intracellular calcium in vascular endothelial cells. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* *15*, 598–610.

Airey, K.J., Etheridge, S.P., Tawil, R., and Tristani-Firouzi, M. (2009). Resuscitated sudden cardiac death in Andersen-Tawil syndrome. *Heart Rhythm* *6*, 1814–1817.

Akagi, K., Suzuki, T., Stephens, R.M., Jenkins, N.A., and Copeland, N.G. (2004). RTCGD: retroviral tagged cancer gene database. *Nucleic Acids Res.* *32*, D523–D527.

Akiyama, H., Chaboissier, M.-C., Martin, J.F., Schedl, A., and Crombrughe, B. de (2002). The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev.* *16*, 2813–2828.

Akiyama, H., Lyons, J.P., Mori-Akiyama, Y., Yang, X., Zhang, R., Zhang, Z., Deng, J.M., Taketo, M.M., Nakamura, T., Behringer, R.R., et al. (2004). Interactions between Sox9 and beta-catenin control chondrocyte differentiation. *Genes Dev.* *18*, 1072–1087.

Alagem, N., Dvir, M., and Reuveny, E. (2001). Mechanism of Ba(2+) block of a mouse inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel: differential contribution by two discrete residues. *J. Physiol.* *534*, 381–393.

Aldahmash, A., Atteya, M., Elsafadi, M., Al-Nbaheen, M., Al-Mubarak, H.A., Vishnubalaji, R., Al-Roalle, A., Al-Harbi, S., Manikandan, M., Matthaei, K.I., et al. (2013). Teratoma Formation in Immunocompetent Mice After Syngeneic and Allogeneic Implantation of Germline Capable Mouse Embryonic Stem Cells. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* *14*, 5705–5711.

Allendorph, G.P., Vale, W.W., and Choe, S. (2006). Structure of the ternary signaling complex of a TGF-beta superfamily member. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 7643–7648.

Amarilio, R., Viukov, S.V., Sharir, A., Eshkar-Oren, I., Johnson, R.S., and Zelzer, E. (2007). HIF1alpha regulation of Sox9 is necessary to maintain differentiation of hypoxic prechondrogenic cells during early skeletogenesis. *Dev. Camb. Engl.* *134*, 3917–3928.

Andelfinger, G., Tapper, A.R., Welch, R.C., Vanoye, C.G., George, A.L., and Benson, D.W. (2002). KCNJ2 Mutation Results in Andersen Syndrome with Sex-Specific Cardiac and Skeletal Muscle Phenotypes. *Am. J. Hum. Genet.* 71, 663–668.

Andersen, E.D., Krasilnikoff, P.A., and Overvad, H. (1971). Intermittent muscular weakness, extrasystoles, and multiple developmental anomalies. A new syndrome? *Acta Paediatr. Scand.* 60, 559–564.

Anokye-Danso, F., Trivedi, C.M., Jühr, D., Gupta, M., Cui, Z., Tian, Y., Zhang, Y., Yang, W., Gruber, P.J., Epstein, J.A., et al. (2011). Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 8, 376–388.

Aoi, T., Yae, K., Nakagawa, M., Ichisaka, T., Okita, K., Takahashi, K., Chiba, T., and Yamanaka, S. (2008). Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* 321, 699–702.

Aoki, T., Ohnishi, H., Oda, Y., Tadokoro, M., Sasao, M., Kato, H., Hattori, K., and Ohgushi, H. (2010). Generation of induced pluripotent stem cells from human adipose-derived stem cells without c-MYC. *Tissue Eng. Part A* 16, 2197–2206.

Arrabal, P.M., Visser, R., Santos-Ruiz, L., Becerra, J., and Cifuentes, M. (2013). Osteogenic molecules for clinical applications: improving the BMP-collagen system. *Biol. Res.* 46, 421–429.

Attisano, L. (2002). Signal Transduction by the TGF-beta Superfamily. *Science* 296, 1646–1647.

Bader, A., Gruss, A., Höllrigl, A., Al-Dubai, H., Capetanaki, Y., and Weitzer, G. (2001). Paracrine promotion of cardiomyogenesis in embryoid bodies by LIF modulated endoderm. *Differ. Res. Biol. Divers.* 68, 31–43.

Baek, W.-Y., de Crombrughe, B., and Kim, J.-E. (2010). Postnatally induced inactivation of Osterix in osteoblasts results in the reduction of bone formation and maintenance. *Bone* 46, 920–928.

Bafico, A., Liu, G., Yaniv, A., Gazit, A., and Aaronson, S.A. (2001). Novel mechanism of Wnt signalling inhibition mediated by Dickkopf-1 interaction with LRP6/Arrow. *Nat. Cell Biol.* 3, 683–686.

Ballester, L.Y., Vanoye, C.G., and Alfred L. George, J. (2007). Exaggerated Mg<sup>2+</sup> Inhibition of KCNJ2 as a Consequence of Reduced PIP2 Sensitivity in Andersen Syndrome. *Channels* 1, 209–217.

Banerjee, C., Javed, A., Choi, J.Y., Green, J., Rosen, V., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Lian, J.B., and Stein, G.S. (2001). Differential regulation of the two principal Runx2/Cbfa1 n-terminal isoforms in response to bone morphogenetic protein-2 during development of the osteoblast phenotype. *Endocrinology* 142, 4026–4039.

Baron, R., and Kneissel, M. (2013). WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments. *Nat. Med.* 19, 179–192.

Baronas, V.A., and Kurata, H.T. (2014). Inward rectifiers and their regulation by endogenous polyamines. *Front. Physiol.* 5.

Barrionuevo, F. (2005). Homozygous Inactivation of Sox9 Causes Complete XY Sex Reversal in Mice. *Biol. Reprod.* 74, 195–201.

Baur, S.T., Mai, J.J., and Dymecki, S.M. (2000). Combinatorial signaling through BMP receptor IB and GDF5: shaping of the distal mouse limb and the genetics of distal limb diversity. *Dev. Camb. Engl.* 127, 605–619.

Beederman, M., Lamplot, J.D., Nan, G., Wang, J., Liu, X., Yin, L., Li, R., Shui, W., Zhang, H., Kim, S.H., et al. (2013). BMP signaling in mesenchymal stem cell differentiation and bone formation. *J. Biomed. Sci. Eng.* 06, 32–52.

Beeler, G.W., and Reuter, H. (1970). Voltage clamp experiments on ventricular myocardial fibres. *J. Physiol.* 207, 165–190.

Bell, D.M., Leung, K.K.H., Wheatley, S.C., Ng, L.J., Zhou, S., Wing Ling, K., Har Sham, M., Koopman, P., Tam, P.P.L., and Cheah, K.S.E. (1997). SOX9 directly regulates the type-II collagen gene. *Nat. Genet.* 16, 174–178.

Bendahhou, S. (2009). Clinical and molecular insights into Andersen’s syndrome (Trivandrum: Transworld Research Network).

Bendahhou, S., Donaldson, M.R., Plaster, N.M., Tristani-Firouzi, M., Fu, Y.-H., and Ptacek, L.J. (2003). Defective Potassium Channel Kir2.1 Trafficking Underlies Andersen-Tawil Syndrome. *J. Biol. Chem.* 278, 51779–51785.

Bendahhou, S., Fournier, E., Sternberg, D., Bassez, G., Furby, A., Sereni, C., Donaldson, M.R., Larroque, M.-M., Fontaine, B., and Barhanin, J. (2005). *In vivo* and *in vitro* functional characterization of Andersen’s syndrome mutations: Andersen’s syndrome *in vivo* and *in vitro*. *J. Physiol.* 565, 731–741.

Bendahhou, S., Fournier, E., Gallet, S., Ménard, D., Larroque, M.-M., and Barhanin, J. (2007). Corticosteroid-exacerbated symptoms in an Andersen’s syndrome kindred. *Hum. Mol. Genet.* 16, 900–906.

Bernstein, B.E., Meissner, A., and Lander, E.S. (2007). The mammalian epigenome. *Cell* *128*, 669–681.

Bessa, P.C., Casal, M., and Reis, R.L. (2008). Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from the laboratory to the clinic, part I (basic concepts). *J. Tissue Eng. Regen. Med.* *2*, 1–13.

Bi, W., Deng, J.M., Zhang, Z., Behringer, R.R., and de Crombrughe, B. (1999). Sox9 is required for cartilage formation. *Nat. Genet.* *22*, 85–89.

Bianco, P., Robey, P.G., and Simmons, P.J. (2008). Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell* *2*, 313–319.

Bibikova, M., Carroll, D., Segal, D.J., Trautman, J.K., Smith, J., Kim, Y.G., and Chandrasegaran, S. (2001). Stimulation of homologous recombination through targeted cleavage by chimeric nucleases. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 289–297.

Bibikova, M., Golic, M., Golic, K.G., and Carroll, D. (2002). Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics* *161*, 1169–1175.

Bibikova, M., Beumer, K., Trautman, J.K., and Carroll, D. (2003). Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science* *300*, 764.

Bichet, D., Haass, F.A., and Jan, L.Y. (2003). Merging functional studies with structures of inward-rectifier K(+) channels. *Nat. Rev. Neurosci.* *4*, 957–967.

de Boer, J., Siddappa, R., Gaspar, C., van Apeldoorn, A., Fodde, R., and van Blitterswijk, C. (2004). Wnt signaling inhibits osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Bone* *34*, 818–826.

Boland, G.M., Perkins, G., Hall, D.J., and Tuan, R.S. (2004). Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *J. Cell. Biochem.* *93*, 1210–1230.

Botquin, V., Hess, H., Fuhrmann, G., Anastassiadis, C., Gross, M.K., Vriend, G., and Schöler, H.R. (1998). New POU dimer configuration mediates antagonistic control of an osteopontin preimplantation enhancer by Oct-4 and Sox-2. *Genes Dev.* *12*, 2073–2090.

Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G., et al. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* *122*, 947–956.

Braam, S.R., Tertoolen, L., van de Stolpe, A., Meyer, T., Passier, R., and Mummery, C.L. (2010). Prediction of drug-induced cardiotoxicity using human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cell Res.* *4*, 107–116.

Bradley, K.K., Jaggar, J.H., Bonev, A.D., Heppner, T.J., Flynn, E.R., Nelson, M.T., and Horowitz, B. (1999). Kir2.1 encodes the inward rectifier potassium channel in rat arterial smooth muscle cells. *J. Physiol.* *515 ( Pt 3)*, 639–651.

Brambrink, T., Foreman, R., Welstead, G.G., Lengner, C.J., Wernig, M., Suh, H., and Jaenisch, R. (2008). Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell* *2*, 151–159.

Brannon, M., Gomperts, M., Sumoy, L., Moon, R.T., and Kimelman, D. (1997). A beta-catenin/XTcf-3 complex binds to the siamois promoter to regulate dorsal axis specification in *Xenopus*. *Genes Dev.* *11*, 2359–2370.

Brasaemle, D.L. (2007). Thematic review series: Adipocyte Biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J. Lipid Res.* *48*, 2547–2559.

Brown, D.A., Gähwiler, B.H., Griffith, W.H., and Halliwell, J.V. (1990). Membrane currents in hippocampal neurons. *Prog. Brain Res.* *83*, 141–160.

Bruckner, P., and van der Rest, M. (1994). Structure and function of cartilage collagens. *Microsc. Res. Tech.* *28*, 378–384.

Bruderer, M., Richards, R.G., Alini, M., and Stoddart, M.J. (2014). Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis. *Eur. Cell. Mater.* *28*, 269–286.

Buta, C., David, R., Dressel, R., Emgård, M., Fuchs, C., Gross, U., Healy, L., Hescheler, J., Kolar, R., Martin, U., et al. (2013). Reconsidering pluripotency tests: do we still need teratoma assays? *Stem Cell Res.* *11*, 552–562.

Caetano-Lopes, J., Canhão, H., and Fonseca, J.E. (2007). Osteoblasts and bone formation. *Acta Reumatol. Port.* *32*, 103–110.

Canún, S., Pérez, N., and Beirana, L.G. (1999). Andersen syndrome autosomal dominant in three generations. *Am. J. Med. Genet.* *85*, 147–156.

Cao, J., Li, X., Lu, X., Zhang, C., Yu, H., and Zhao, T. (2014). Cells derived from iPSC can be immunogenic — Yes or No? *Protein Cell* *5*, 1–3.

Carreira, A.C., Lojudice, F.H., Halcsik, E., Navarro, R.D., Sogayar, M.C., and Granjeiro, J.M. (2014). Bone Morphogenetic Proteins Facts, Challenges, and Future Perspectives. *J. Dent. Res.* *93*, 335–345.

Casey, L. (1996). Localization and Turnover of Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate in Caveolin-enriched Membrane Domains. *J. Biol. Chem.* 271, 26453–26456.

Cavallo, R.A., Cox, R.T., Moline, M.M., Roose, J., Polevoy, G.A., Clevers, H., Peifer, M., and Bejsovec, A. (1998). *Drosophila* Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature* 395, 604–608.

Chau, J.F.L., Leong, W.F., and Li, B. (2009). Signaling pathways governing osteoblast proliferation, differentiation and function. *Histol. Histopathol.* 24, 1593–1606.

Chen, F.H., Rousche, K.T., and Tuan, R.S. (2006). Technology Insight: adult stem cells in cartilage regeneration and tissue engineering. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 2, 373–382.

Chen, G., Deng, C., and Li, Y.-P. (2012). TGF- $\beta$  and BMP Signaling in Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Int. J. Biol. Sci.* 8, 272–288.

Chen, S., Tao, J., Bae, Y., Jiang, M.-M., Bertin, T., Chen, Y., Yang, T., and Lee, B. (2013). Notch gain of function inhibits chondrocyte differentiation via Rbpj-dependent suppression of Sox9. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 28, 649–659.

Cheng, H., Jiang, W., Phillips, F.M., Haydon, R.C., Peng, Y., Zhou, L., Luu, H.H., An, N., Breyer, B., Vanichakarn, P., et al. (2003). Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J. Bone Joint Surg. Am.* 85-A, 1544–1552.

Child, N.D., Cleland, J.C., and Roxburgh, R. (2013). Andersen-Tawil syndrome presenting as a fixed myopathy. *Muscle Nerve* 48, 623.

Cho, H.H., Kim, Y.J., Kim, S.J., Kim, J.H., Bae, Y.C., Ba, B., and Jung, J.S. (2006). Endogenous Wnt signaling promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation in human adipose derived stromal cells. *Tissue Eng.* 12, 111–121.

Cho, H.-J., Lee, C.-S., Kwon, Y.-W., Paek, J.S., Lee, S.-H., Hur, J., Lee, E.J., Roh, T.-Y., Chu, I.-S., Leem, S.-H., et al. (2010). Induction of pluripotent stem cells from adult somatic cells by protein-based reprogramming without genetic manipulation. *Blood* 116, 386–395.

Choi, S.M., Kim, Y., Shim, J.S., Park, J.T., Wang, R.-H., Leach, S.D., Liu, J.O., Deng, C., Ye, Z., and Jang, Y.-Y. (2013). Efficient drug screening and gene correction for treating liver disease using patient-specific stem cells. *Hepatology* 57, 2458–2468.

Choi, Y.H., Jeong, H.M., Jin, Y.-H., Li, H., Yeo, C.-Y., and Lee, K.-Y. (2011). Akt phosphorylates and regulates the osteogenic activity of Osterix. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 411, 637–641.

Choy, M.-K., Movassagh, M., Goh, H.-G., Bennett, M.R., Down, T.A., and Foo, R.S.Y. (2010). Genome-wide conserved consensus transcription factor binding motifs are hypermethylated. *BMC Genomics* *11*, 519.

Chun, Y.S. (2010). Applications of Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells; Focused on Disease Modeling, Drug Screening and Therapeutic Potentials for Liver Disease. *Int. J. Biol. Sci.* 796–805.

Clément-Lacroix, P., Ai, M., Morvan, F., Roman-Roman, S., Vayssière, B., Belleville, C., Estrera, K., Warman, M.L., Baron, R., and Rawadi, G. (2005). Lrp5-independent activation of Wnt signaling by lithium chloride increases bone formation and bone mass in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 17406–17411.

Cohen, P. (1988). Review Lecture: Protein Phosphorylation and Hormone Action. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* *234*, 115–144.

Cohen, D.E., and Melton, D. (2011). Turning straw into gold: directing cell fate for regenerative medicine. *Nat. Rev. Genet.* *12*, 243–252.

Cohen, N.A., Brenman, J.E., Snyder, S.H., and Bretz, D.S. (1996). Binding of the inward rectifier K<sup>+</sup> channel Kir 2.3 to PSD-95 is regulated by protein kinase A phosphorylation. *Neuron* *17*, 759–767.

Dahal, G.R., Rawson, J., Gassaway, B., Kwok, B., Tong, Y., Ptacek, L.J., and Bates, E. (2012). An inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel is required for patterning. *Development* *139*, 3653–3664.

Dai, J., Hall, C.L., Escara-Wilke, J., Mizokami, A., Keller, J.M., and Keller, E.T. (2008). Prostate cancer induces bone metastasis through Wnt-induced bone morphogenetic protein-dependent and independent mechanisms. *Cancer Res.* *68*, 5785–5794.

Dang, S.M., Kyba, M., Perlingeiro, R., Daley, G.Q., and Zandstra, P.W. (2002). Efficiency of embryoid body formation and hematopoietic development from embryonic stem cells in different culture systems. *Biotechnol. Bioeng.* *78*, 442–453.

Daniels, D.L., and Weis, W.I. (2005). Beta-catenin directly displaces Groucho/TLE repressors from Tcf/Lef in Wnt-mediated transcription activation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *12*, 364–371.

D’Avanzo, N., Hyrc, K., Enkvetchakul, D., Covey, D.F., and Nichols, C.G. (2011). Enantioselective protein-sterol interactions mediate regulation of both prokaryotic and eukaryotic inward rectifier K<sup>+</sup> channels by cholesterol. *PloS One* *6*, e19393.

Davies, N.P., Imbrici, P., Fialho, D., Herd, C., Bilsland, L.G., Weber, A., Mueller, R., Hilton-Jones, D., Ealing, J., Boothman, B.R., et al. (2005). Andersen-Tawil syndrome: new potassium channel mutations and possible phenotypic variation. *Neurology* 65, 1083–1089.

Davis, E.K., Zou, Y., and Ghosh, A. (2008). Wnts acting through canonical and noncanonical signaling pathways exert opposite effects on hippocampal synapse formation. *Neural Develop.* 3, 32.

Day, M., Carr, D.B., Ulrich, S., Ilijic, E., Tkatch, T., and Surmeier, D.J. (2005a). Dendritic excitability of mouse frontal cortex pyramidal neurons is shaped by the interaction among HCN, Kir2, and K<sub>leak</sub> channels. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25, 8776–8787.

Day, T.F., Guo, X., Garrett-Beal, L., and Yang, Y. (2005b). Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Mesenchymal Progenitors Controls Osteoblast and Chondrocyte Differentiation during Vertebrate Skeletogenesis. *Dev. Cell* 8, 739–750.

De, A. (2011). Wnt/Ca<sup>2+</sup> signaling pathway: a brief overview. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 43, 745–756.

Deo, M., Ruan, Y., Pandit, S.V., Shah, K., Berenfeld, O., Blaufox, A., Cerrone, M., Noujaim, S.F., Denegri, M., Jalife, J., et al. (2013). KCNJ2 mutation in short QT syndrome 3 results in atrial fibrillation and ventricular proarrhythmia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 4291–4296.

Derynck, R., Zhang, Y., and Feng, X.-H. (1998). Transcriptional Activators of TGF- $\beta$  Responses: Smads. *Cell* 95, 737–740.

De Vernejoul, M.-C., and Marie, P. (1993). Cellules osseuses et remodelage osseux.

Dey, D., and Evans, G.R.D. (2011). Generation of Induced Pluripotent Stem (iPS) Cells by Nuclear Reprogramming. *Stem Cells Int.* 2011, 1–11.

Dhamoon, A.S., and Jalife, J. (2005). The inward rectifier current (IK1) controls cardiac excitability and is involved in arrhythmogenesis. *Heart Rhythm* 2, 316–324.

Di Paolo, G., and De Camilli, P. (2006). Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 443, 651–657.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D.S., Deans, R.J., Keating, A., Prockop, D.J., and Horwitz, E.M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315–317.

Donaldson, M.R., Jensen, J.L., Tristani-Firouzi, M., Tawil, R., Bendahhou, S., Suarez, W.A., Cobo, A.M., Poza, J.J., Behr, E., Wagstaff, J., et al. (2003). PIP2 binding residues of Kir2.1



are common targets of mutations causing Andersen syndrome. *Neurology* 60, 1811–1816.

Donaldson, M.R., Yoon, G., Fu, Y.-H., and Ptacek, L.J. (2004). Andersen-Tawil syndrome: a model of clinical variability, pleiotropy, and genetic heterogeneity. *Ann. Med.* 36 *Suppl* 1, 92–97.

Dooley, K., and Zon, L.I. (2000). Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 252–256.

Döring, F., Wischmeyer, E., Kühnlein, R.P., Jäckle, H., and Karschin, A. (2002). Inwardly rectifying K<sup>+</sup> (Kir) channels in *Drosophila*. A crucial role of cellular milieu factors Kir channel function. *J. Biol. Chem.* 277, 25554–25561.

Dressel, R. (2011). Effects of histocompatibility and host immune responses on the tumorigenicity of pluripotent stem cells. *Semin. Immunopathol.* 33, 573–591.

Drissi, H., Luc, Q., Shakoori, R., Chuva De Sousa Lopes, S., Choi, J.Y., Terry, A., Hu, M., Jones, S., Neil, J.C., Lian, J.B., et al. (2000). Transcriptional autoregulation of the bone related CBFA1/RUNX2 gene. *J. Cell. Physiol.* 184, 341–350.

Ducy, P. (2000). Cbfa1: a molecular switch in osteoblast biology. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 219, 461–471.

Ducy, P. (2001). Contrôle génétique de la squelettogénèse.

Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A.L., and Karsenty, G. (1997). Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89, 747–754.

Dudas, M., Sridurongrit, S., Nagy, A., Okazaki, K., and Kaartinen, V. (2004). Craniofacial defects in mice lacking BMP type I receptor Alk2 in neural crest cells. *Mech. Dev.* 121, 173–182.

Dvir-Ginzberg, M., and Steinmeyer, J. (2013). Towards elucidating the role of SirT1 in osteoarthritis. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 18, 343–355.

Dvir-Ginzberg, M., Gagarina, V., Lee, E.-J., and Hall, D.J. (2008). Regulation of cartilage-specific gene expression in human chondrocytes by SirT1 and nicotinamide phosphoribosyltransferase. *J. Biol. Chem.* 283, 36300–36310.

Eckhardt, L.L., Farley, A.L., Rodriguez, E., Ruwaldt, K., Hammill, D., Tester, D.J., Ackerman, M.J., and Makielski, J.C. (2007). KCNJ2 mutations in arrhythmia patients referred for LQT testing: A mutation T305A with novel effect on rectification properties. *Heart Rhythm* 4, 323–329.

Edwards, F.R., Hirst, G.D., and Silverberg, G.D. (1988). Inward rectification in rat cerebral arterioles; involvement of potassium ions in autoregulation. *J. Physiol.* *404*, 455–466.

Eiges, R., Urbach, A., Malcov, M., Frumkin, T., Schwartz, T., Amit, A., Yaron, Y., Eden, A., Yanuka, O., Benvenisty, N., et al. (2007). Developmental study of fragile X syndrome using human embryonic stem cells derived from preimplantation genetically diagnosed embryos. *Cell Stem Cell* *1*, 568–577.

Eminli, S., Utikal, J., Arnold, K., Jaenisch, R., and Hochedlinger, K. (2008). Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression. *Stem Cells Dayt. Ohio* *26*, 2467–2474.

Enomoto, H., Enomoto-Iwamoto, M., Iwamoto, M., Nomura, S., Himeno, M., Kitamura, Y., Kishimoto, T., and Komori, T. (2000). Cbfa1 is a positive regulatory factor in chondrocyte maturation. *J. Biol. Chem.* *275*, 8695–8702.

Enomoto-Iwamoto, M., Iwamoto, M., Mukudai, Y., Kawakami, Y., Nohno, T., Higuchi, Y., Takemoto, S., Ohuchi, H., Noji, S., and Kurisu, K. (1998). Bone morphogenetic protein signaling is required for maintenance of differentiated phenotype, control of proliferation, and hypertrophy in chondrocytes. *J. Cell Biol.* *140*, 409–418.

Epsztejn-Litman, S., Feldman, N., Abu-Remaileh, M., Shufaro, Y., Gerson, A., Ueda, J., Deplus, R., Fuks, F., Shinkai, Y., Cedar, H., et al. (2008). De novo DNA methylation promoted by G9a prevents reprogramming of embryonically silenced genes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *15*, 1176–1183.

Eriksen, E.F. (2010). Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* *11*, 219–227.

Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* *292*, 154–156.

Fairchild, P.J. (2010). The challenge of immunogenicity in the quest for induced pluripotency. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 868–875.

Fakler, B., Brändle, U., Glowatzki, E., Weidemann, S., Zenner, H.P., and Ruppertsberg, J.P. (1995). Strong voltage-dependent inward rectification of inward rectifier K<sup>+</sup> channels is caused by intracellular spermine. *Cell* *80*, 149–154.

Fang, Y., Schram, G., Romanenko, V.G., Shi, C., Conti, L., Vandenberg, C.A., Davies, P.F., Nattel, S., and Levitan, I. (2005). Functional expression of Kir2.x in human aortic endothelial cells: the dominant role of Kir2.2. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *289*, C1134–C1144.

Feldman, N., Gerson, A., Fang, J., Li, E., Zhang, Y., Shinkai, Y., Cedar, H., and Bergman, Y. (2006). G9a-mediated irreversible epigenetic inactivation of Oct-3/4 during early embryogenesis. *Nat. Cell Biol.* *8*, 188–194.

Ficker, E., Tagliatela, M., Wible, B.A., Henley, C.M., and Brown, A.M. (1994). Spermine and spermidine as gating molecules for inward rectifier K<sup>+</sup> channels. *Science* *266*, 1068–1072.

Fischer-Lougheed, J., Liu, J.H., Espinos, E., Mordasini, D., Bader, C.R., Belin, D., and Bernheim, L. (2001). Human myoblast fusion requires expression of functional inward rectifier Kir2.1 channels. *J. Cell Biol.* *153*, 677–686.

Fong, C.-Y., Gauthaman, K., and Bongso, A. (2010). Teratomas from pluripotent stem cells: A clinical hurdle. *J. Cell. Biochem.* *111*, 769–781.

Fournier, E., Arzel, M., Sternberg, D., Vicart, S., Laforet, P., Eymard, B., Willer, J.-C., Tabti, N., and Fontaine, B. (2004). Electromyography guides toward subgroups of mutations in muscle channelopathies. *Ann. Neurol.* *56*, 650–661.

Fox, D.J., Klein, G.J., Hahn, A., Skanes, A.C., Gula, L.J., Yee, R.K., Subbiah, R.N., and Krahn, A.D. (2008). Reduction of complex ventricular ectopy and improvement in exercise capacity with flecainide therapy in Andersen-Tawil syndrome. *Europace* *10*, 1006–1008.

Franchini, L., Levi, G., and Visentin, S. (2004). Inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels influence Ca<sup>2+</sup> entry due to nucleotide receptor activation in microglia. *Cell Calcium* *35*, 449–459.

Franz-Odendaal, T.A. (2008). Toward understanding the development of scleral ossicles in the chicken, *Gallus gallus*. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *237*, 3240–3251.

Franz-Odendaal, T.A. (2011). Induction and patterning of intramembranous bone. *Front. Biosci. Landmark Ed.* *16*, 2734–2746.

French, R.J., and Shoukimas, J.J. (1985). An ion's view of the potassium channel. The structure of the permeation pathway as sensed by a variety of blocking ions. *J. Gen. Physiol.* *85*, 669–698.

Friedenstein, A.J., Piatetzky-Shapiro, I.I., and Petrakova, K.V. (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J. Embryol. Exp. Morphol.* *16*, 381–390.

Fujiwara, Y., and Kubo, Y. (2006). Functional roles of charged amino acid residues on the wall of the cytoplasmic pore of Kir2.1. *J. Gen. Physiol.* *127*, 401–419.

Fürst, O., Mondou, B., and D'Avanzo, N. (2014). Phosphoinositide regulation of inward rectifier potassium (Kir) channels. *Front. Physiol.* *4*.

Furumatsu, T., Tsuda, M., Yoshida, K., Taniguchi, N., Ito, T., Hashimoto, M., Ito, T., and Asahara, H. (2005). Sox9 and p300 cooperatively regulate chromatin-mediated transcription. *J. Biol. Chem.* *280*, 35203–35208.

Furumatsu, T., Ozaki, T., and Asahara, H. (2009). Smad3 activates the Sox9-dependent transcription on chromatin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *41*, 1198–1204.

Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., and Hasegawa, M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* *85*, 348–362.

Gasca, S., Canizares, J., De Santa Barbara, P., Mejean, C., Poulat, F., Berta, P., and Boizet-Bonhoure, B. (2002). A nuclear export signal within the high mobility group domain regulates the nucleocytoplasmic translocation of SOX9 during sexual determination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 11199–11204.

Gaur, T., Lengner, C.J., Hovhannisyan, H., Bhat, R.A., Bodine, P.V.N., Komm, B.S., Javed, A., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Stein, G.S., et al. (2005). Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J. Biol. Chem.* *280*, 33132–33140.

Ge, C., Xiao, G., Jiang, D., Yang, Q., Hatch, N.E., Roca, H., and Franceschi, R.T. (2009). Identification and Functional Characterization of ERK/MAPK Phosphorylation Sites in the Runx2 Transcription Factor. *J. Biol. Chem.* *284*, 32533–32543.

Geoffroy, V., Kneissel, M., Fournier, B., Boyde, A., and Matthias, P. (2002). High bone resorption in adult aging transgenic mice overexpressing cbfa1/runx2 in cells of the osteoblastic lineage. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 6222–6233.

Glass, D.A., 2nd, Bialek, P., Ahn, J.D., Starbuck, M., Patel, M.S., Clevers, H., Taketo, M.M., Long, F., McMahon, A.P., Lang, R.A., et al. (2005). Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev. Cell* *8*, 751–764.

Glowatzki, E., Fakler, G., Brändle, U., Rexhausen, U., Zenner, H.P., Ruppertsberg, J.P., and Fakler, B. (1995). Subunit-dependent assembly of inward-rectifier K<sup>+</sup> channels. *Proc. Biol. Sci.* *261*, 251–261.

Golling, G., Li, L., Pepling, M., Stebbins, M., and Gergen, J.P. (1996). Drosophila homologs of the proto-oncogene product PEBP2/CBF beta regulate the DNA-binding properties of Runt. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 932–942.

Gore, A., Li, Z., Fung, H.-L., Young, J.E., Agarwal, S., Antosiewicz-Bourget, J., Canto, I., Giorgetti, A., Israel, M.A., Kiskinis, E., et al. (2011). Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 471, 63–67.

Govoni, K.E., Linares, G.R., Chen, S.-T., Pourteymoor, S., and Mohan, S. (2009). T-box 3 negatively regulates osteoblast differentiation by inhibiting expression of osterix and runx2. *J. Cell. Biochem.* 106, 482–490.

Grigoriadis, A.E., Heersche, J.N., and Aubin, J.E. (1988). Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. *J. Cell Biol.* 106, 2139–2151.

Gullberg, D. (2003). Cell biology: the molecules that make muscle. *Nature* 424, 138–140.

Guo, D., and Lu, Z. (2003). Interaction mechanisms between polyamines and IRK1 inward rectifier K<sup>+</sup> channels. *J. Gen. Physiol.* 122, 485–500.

Guo, X., and Wang, X.-F. (2009). Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways. *Cell Res.* 19, 71–88.

Hagiwara, S., and Jaffe, L.A. (1979). Electrical properties of egg cell membranes. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 8, 385–416.

Hagiwara, S., Miyazaki, S., and Rosenthal, N.P. (1976a). Potassium current and the effect of cesium on this current during anomalous rectification of the egg cell membrane of a starfish. *J. Gen. Physiol.* 67, 621–638.

Hagiwara, S., Miyazaki, S., and Rosenthal, N.P. (1976b). Potassium current and the effect of cesium on this current during anomalous rectification of the egg cell membrane of a starfish. *J. Gen. Physiol.* 67, 621–638.

Hagiwara, S., Miyazaki, S., Moody, W., and Patlak, J. (1978). Blocking effects of barium and hydrogen ions on the potassium current during anomalous rectification in the starfish egg. *J. Physiol.* 279, 167–185.

Hall, B.K. (2014). *Bones and Cartilage: Developmental and Evolutionary Skeletal Biology* (Academic Press).

Hall, B.K., and Miyake, T. (1992). The membranous skeleton: the role of cell condensations in vertebrate skeletogenesis. *Anat. Embryol. (Berl.)* 186, 107–124.

Han, H., Rosenhouse-Dantsker, A., Gnanasambandam, R., Epshtein, Y., Chen, Z., Sachs, F., Minshall, R.D., and Levitan, I. (2014). Silencing of Kir2 channels by caveolin-1: cross-talk with cholesterol: Caveolin-1 is a negative regulator of Kir2 channels. *J. Physiol.* 592, 4025–4038.

Hanai, J., Chen, L.F., Kanno, T., Ohtani-Fujita, N., Kim, W.Y., Guo, W.H., Imamura, T., Ishidou, Y., Fukuchi, M., Shi, M.J., et al. (1999). Interaction and functional cooperation of PEBP2/CBF with Smads. Synergistic induction of the immunoglobulin germline Calpha promoter. *J. Biol. Chem.* *274*, 31577–31582.

Hanna, J., Markoulaki, S., Schorderet, P., Carey, B.W., Beard, C., Wernig, M., Creighton, M.P., Steine, E.J., Cassady, J.P., Foreman, R., et al. (2008). Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell* *133*, 250–264.

Hanna, J.H., Saha, K., and Jaenisch, R. (2010). Pluripotency and Cellular Reprogramming: Facts, Hypotheses, Unresolved Issues. *Cell* *143*, 508–525.

Hansen, S.B. (2015). Lipid agonism: The PIP2 paradigm of ligand-gated ion channels. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* *1851*, 620–628.

Hansen, S.B., Tao, X., and MacKinnon, R. (2011). Structural basis of PIP2 activation of the classical inward rectifier K<sup>+</sup> channel Kir2.2. *Nature* *477*, 495–498.

Harada, H., Tagashira, S., Fujiwara, M., Ogawa, S., Katsumata, T., Yamaguchi, A., Komori, T., and Nakatsuka, M. (1999). Cbfa1 isoforms exert functional differences in osteoblast differentiation. *J. Biol. Chem.* *274*, 6972–6978.

Harley, V.R., Lovell-Badge, R., and Goodfellow, P.N. (1994). Definition of a consensus DNA binding site for SRY. *Nucleic Acids Res.* *22*, 1500–1501.

Haruna, Y., Kobori, A., Makiyama, T., Yoshida, H., Akao, M., Doi, T., Tsuji, K., Ono, S., Nishio, Y., Shimizu, W., et al. (2007). Genotype-phenotype correlations of KCNJ2 mutations in Japanese patients with Andersen-Tawil syndrome. *Hum. Mutat.* *28*, 208–208.

Hatano, S.-Y., Tada, M., Kimura, H., Yamaguchi, S., Kono, T., Nakano, T., Suemori, H., Nakatsuji, N., and Tada, T. (2005). Pluripotential competence of cells associated with Nanog activity. *Mech. Dev.* *122*, 67–79.

Hattori, T., Coustry, F., Stephens, S., Eberspaecher, H., Takigawa, M., Yasuda, H., and de Crombrughe, B. (2008). Transcriptional regulation of chondrogenesis by coactivator Tip60 via chromatin association with Sox9 and Sox5. *Nucleic Acids Res.* *36*, 3011–3024.

Hattori, T., Makiyama, T., Akao, M., Ehara, E., Ohno, S., Iguchi, M., Nishio, Y., Sasaki, K., Itoh, H., Yokode, M., et al. (2012). A novel gain-of-function KCNJ2 mutation associated with short-QT syndrome impairs inward rectification of Kir2.1 currents. *Cardiovasc. Res.* *93*, 666–673.

Hattori, T., Kishino, T., Stephen, S., Eberspaecher, H., Maki, S., Takigawa, M., de Crombrughe, B., and Yasuda, H. (2013). E6-AP/UBE3A protein acts as a ubiquitin ligase toward SOX9 protein. *J. Biol. Chem.* *288*, 35138–35148.

Hawley, R.G. (2008). Does retroviral insertional mutagenesis play a role in the generation of induced pluripotent stem cells? *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* *16*, 1354–1355.

Haynesworth, S.E., Baber, M.A., and Caplan, A.I. (1996). Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *J. Cell. Physiol.* *166*, 585–592.

Heaney, J.D., Rettew, A.N., and Bronson, S.K. (2004). Tissue-specific expression of a BAC transgene targeted to the Hprt locus in mouse embryonic stem cells. *Genomics* *83*, 1072–1082.

Heginbotham, L., Lu, Z., Abramson, T., and MacKinnon, R. (1994). Mutations in the K<sup>+</sup> channel signature sequence. *Biophys. J.* *66*, 1061–1067.

Heldin, C.H., Miyazono, K., and ten Dijke, P. (1997). TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* *390*, 465–471.

Helms, J.A., Cordero, D., and Tapadia, M.D. (2005). New insights into craniofacial morphogenesis. *Dev. Camb. Engl.* *132*, 851–861.

Henderson, J.K., Draper, J.S., Baillie, H.S., Fishel, S., Thomson, J.A., Moore, H., and Andrews, P.W. (2002). Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. *Stem Cells Dayt. Ohio* *20*, 329–337.

Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* *67*, 425–479.

Hibino, H., Inanobe, A., Furutani, K., Murakami, S., Findlay, I., and Kurachi, Y. (2010). Inwardly Rectifying Potassium Channels: Their Structure, Function, and Physiological Roles. *Physiol. Rev.* *90*, 291–366.

Hill, T.P., Später, D., Taketo, M.M., Birchmeier, W., and Hartmann, C. (2005). Canonical Wnt/beta-catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev. Cell* *8*, 727–738.

Hirohashi, S., and Kanai, Y. (2003). Cell adhesion system and human cancer morphogenesis. *Cancer Sci.* *94*, 575–581.

Ho, K., Nichols, C.G., Lederer, W.J., Lytton, J., Vassilev, P.M., Kanazirska, M.V., and Hebert, S.C. (1993). Cloning and expression of an inwardly rectifying ATP-regulated potassium channel. *Nature* 362, 31–38.

Hoffman, E.P. (1995). Voltage-gated ion channelopathies: inherited disorders caused by abnormal sodium, chloride, and calcium regulation in skeletal muscle. *Annu. Rev. Med.* 46, 431–441.

Höing, S., Rudhard, Y., Reinhardt, P., Glatza, M., Stehling, M., Wu, G., Peiker, C., Böcker, A., Parga, J.A., Bunk, E., et al. (2012). Discovery of inhibitors of microglial neurotoxicity acting through multiple mechanisms using a stem-cell-based phenotypic assay. *Cell Stem Cell* 11, 620–632.

Horio, Y., Morishige, K., Takahashi, N., and Kurachi, Y. (1996). Differential distribution of classical inwardly rectifying potassium channel mRNAs in the brain: comparison of IRK2 with IRK1 and IRK3. *FEBS Lett.* 379, 239–243.

Hsu, H.-T., Chen, H.-M., Yang, Z., Wang, J., Lee, N.K., Burger, A., Zaret, K., Liu, T., Levine, E., and Mango, S.E. (2015). Recruitment of RNA polymerase II by the pioneer transcription factor PHA-4. *Science* 348, 1372–1376.

Hu, H., Hilton, M.J., Tu, X., Yu, K., Ornitz, D.M., and Long, F. (2005). Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. *Dev. Camb. Engl.* 132, 49–60.

Huang, W., Zhou, X., Lefebvre, V., and de Crombrughe, B. (2000). Phosphorylation of SOX9 by cyclic AMP-dependent protein kinase A enhances SOX9's ability to transactivate a Col2a1 chondrocyte-specific enhancer. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4149–4158.

Huang, W., Chung, U.I., Kronenberg, H.M., and de Crombrughe, B. (2001). The chondrogenic transcription factor Sox9 is a target of signaling by the parathyroid hormone-related peptide in the growth plate of endochondral bones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 160–165.

Huang, Y.-F., Lin, J.-J., Lin, C.-H., Su, Y., and Hung, S.-C. (2012). c-Jun N-terminal kinase 1 negatively regulates osteoblastic differentiation induced by BMP2 via phosphorylation of Runx2 at Ser104. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 27, 1093–1105.

Hynes, K., Menicanin, D., Mrozik, K., Gronthos, S., and Bartold, P.M. (2014). Generation of Functional Mesenchymal Stem Cells from Different Induced Pluripotent Stem Cell Lines. *Stem Cells Dev.* 23, 1084–1096.

Ikeda, T., Kamekura, S., Mabuchi, A., Kou, I., Seki, S., Takato, T., Nakamura, K., Kawaguchi, H., Ikegawa, S., and Chung, U. (2004). The combination of SOX5, SOX6, and SOX9 (the



SOX trio) provides signals sufficient for induction of permanent cartilage. *Arthritis Rheum.* *50*, 3561–3573.

Inanobe, A., Matsuura, T., Nakagawa, A., and Kurachi, Y. (2007). Structural diversity in the cytoplasmic region of G protein-gated inward rectifier K<sup>+</sup> channels. *Channels Austin Tex* *1*, 39–45.

Inanobe, A., Nakagawa, A., and Kurachi, Y. (2011). Interactions of cations with the cytoplasmic pores of inward rectifier K(+) channels in the closed state. *J. Biol. Chem.* *286*, 41801–41811.

Ito, H., Tsuchimochi, H., Tada, Y., and Kurachi, Y. (1997). Phosphorylation-independent inhibition by intracellular cyclic nucleotides of brain inwardly rectifying K<sup>+</sup> current expressed in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett.* *402*, 12–16.

Ito, T., Yadav, N., Lee, J., Furumatsu, T., Yamashita, S., Yoshida, K., Taniguchi, N., Hashimoto, M., Tsuchiya, M., Ozaki, T., et al. (2009). Arginine methyltransferase CARM1/PRMT4 regulates endochondral ossification. *BMC Dev. Biol.* *9*, 47.

Itoh, S., Itoh, F., Goumans, M.-J., and ten Dijke, P. (2000). Signaling of transforming growth factor- $\beta$  family members through Smad proteins: TGF- $\beta$  signaling via Smads. *Eur. J. Biochem.* *267*, 6954–6967.

Itskovitz-Eldor, J., Schuldiner, M., Karsenti, D., Eden, A., Yanuka, O., Amit, M., Soreq, H., and Benvenisty, N. (2000). Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol. Med. Camb. Mass* *6*, 88–95.

Itzhaki, I., Maizels, L., Huber, I., Zwi-Dantsis, L., Caspi, O., Winterstern, A., Feldman, O., Gepstein, A., Arbel, G., Hammerman, H., et al. (2011). Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. *Nature* *471*, 225–229.

Itzhaki, I., Maizels, L., Huber, I., Gepstein, A., Arbel, G., Caspi, O., Miller, L., Belhassen, B., Nof, E., Glikson, M., et al. (2012). Modeling of Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia With Patient-Specific Human-Induced Pluripotent Stem Cells. *J. Am. Coll. Cardiol.* *60*, 990–1000.

Jaenisch, R., and Young, R. (2008). Stem Cells, the Molecular Circuitry of Pluripotency and Nuclear Reprogramming. *Cell* *132*, 567–582.

Jang, J., Yoo, J.-E., Lee, J.-A., Lee, D.R., Kim, J.Y., Huh, Y.J., Kim, D.-S., Park, C.-Y., Hwang, D.-Y., Kim, H.-S., et al. (2012). Disease-specific induced pluripotent stem cells: a platform for human disease modeling and drug discovery. *Exp. Mol. Med.* *44*, 202.

Jeon, E.-J., Lee, K.-Y., Choi, N.-S., Lee, M.-H., Kim, H.-N., Jin, Y.-H., Ryoo, H.-M., Choi, J.-Y., Yoshida, M., Nishino, N., et al. (2006). Bone morphogenetic protein-2 stimulates Runx2 acetylation. *J. Biol. Chem.* *281*, 16502–16511.

Ji, C., Casinghino, S., Chang, D.J., Chen, Y., Javed, A., Ito, Y., Hiebert, S.W., Lian, J.B., Stein, G.S., McCarthy, T.L., et al. (1998). CBFa(AML/PEBP2)-related elements in the TGF-beta type I receptor promoter and expression with osteoblast differentiation. *J. Cell. Biochem.* *69*, 353–363.

Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X.R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., et al. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* *418*, 41–49.

Jongsma, H.J., and Wilders, R. (2001). Channelopathies: Kir2.1 mutations jeopardize many cell functions. *Curr. Biol. CB* *11*, R747–R750.

Junker, J., Haverkamp, W., Schulze-Bahr, E., Eckardt, L., Paulus, W., and Kiefer, R. (2002). Amiodarone and acetazolamide for the treatment of genetically confirmed severe Andersen syndrome. *Neurology* *59*, 466.

Kahler, R.A., and Westendorf, J.J. (2003). Lymphoid enhancer factor-1 and beta-catenin inhibit Runx2-dependent transcriptional activation of the osteocalcin promoter. *J. Biol. Chem.* *278*, 11937–11944.

Kahler, R.A., Galindo, M., Lian, J., Stein, G.S., van Wijnen, A.J., and Westendorf, J.J. (2006). Lymphocyte enhancer-binding factor 1 (Lef1) inhibits terminal differentiation of osteoblasts. *J. Cell. Biochem.* *97*, 969–983.

Kanatani, N., Fujita, T., Fukuyama, R., Liu, W., Yoshida, C.A., Moriishi, T., Yamana, K., Miyazaki, T., Toyosawa, S., and Komori, T. (2006). Cbf beta regulates Runx2 function isoform-dependently in postnatal bone development. *Dev. Biol.* *296*, 48–61.

Kang, L., Wang, J., Zhang, Y., Kou, Z., and Gao, S. (2009). iPS cells can support full-term development of tetraploid blastocyst-complemented embryos. *Cell Stem Cell* *5*, 135–138.

Kannagi, R., Cochran, N.A., Ishigami, F., Hakomori, S., Andrews, P.W., Knowles, B.B., and Solter, D. (1983). Stage-specific embryonic antigens (SSEA-3 and -4) are epitopes of a unique globo-series ganglioside isolated from human teratocarcinoma cells. *EMBO J.* *2*, 2355–2361.

Kannankeril, P.J., Roden, D.M., and Fish, F.A. (2004). Suppression of Bidirectional Ventricular Tachycardia and Unmasking of Prolonged QT interval with Verapamil in Andersen's Syndrome. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* *15*, 119–119.

Kanzler, B., Kuschert, S.J., Liu, Y.H., and Mallo, M. (1998). *Hoxa-2* restricts the chondrogenic domain and inhibits bone formation during development of the branchial area. *Dev. Camb. Engl.* *125*, 2587–2597.

Karaplis, A. (2002). Embryonic Development of Bone and the Molecular Regulation of Intramembranous and Endochondral Bone Formation.

Karschin, C., Dismann, E., Stühmer, W., and Karschin, A. (1996). IRK(1-3) and GIRK(1-4) inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel mRNAs are differentially expressed in the adult rat brain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *16*, 3559–3570.

Karsenty, G. (1998). Genetics of skeletogenesis. *Dev. Genet.* *22*, 301–313.

Katagiri, T., and Tsukamoto, S. (2013). The unique activity of bone morphogenetic proteins in bone: a critical role of the Smad signaling pathway. *Biol. Chem.* *394*, 703–714.

Katagiri, T., Yamaguchi, A., Komaki, M., Abe, E., Takahashi, N., Ikeda, T., Rosen, V., Wozney, J.M., Fujisawa-Sehara, A., and Suda, T. (1994). Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J. Cell Biol.* *127*, 1755–1766.

Kato, M., Patel, M.S., Levasseur, R., Lobov, I., Chang, B.H.-J., Glass, D.A., Hartmann, C., Li, L., Hwang, T.-H., Brayton, C.F., et al. (2002). *Cbfa1*-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in *Lrp5*, a Wnt coreceptor. *J. Cell Biol.* *157*, 303–314.

Katz, B. (1949). Les constantes électriques de la membrane du muscle. *Arch Sci Physiol* *285*–299.

Kawakami, Y., Tsuda, M., Takahashi, S., Taniguchi, N., Esteban, C.R., Zemmyo, M., Furumatsu, T., Lotz, M., Izpisua Belmonte, J.C., and Asahara, H. (2005). Transcriptional coactivator PGC-1 $\alpha$  regulates chondrogenesis via association with Sox9. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 2414–2419.

Keller, G.M. (1995). In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* *7*, 862–869.

Kim, D., Kim, C.-H., Moon, J.-I., Chung, Y.-G., Chang, M.-Y., Han, B.-S., Ko, S., Yang, E., Cha, K.Y., Lanza, R., et al. (2009). Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* *4*, 472–476.

Kim, J.B., Zaehres, H., Wu, G., Gentile, L., Ko, K., Sebastiano, V., Araúzo-Bravo, M.J., Ruau, D., Han, D.W., Zenke, M., et al. (2008). Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature* *454*, 646–650.

Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., Kim, J., Aryee, M.J., Ji, H., Ehrlich, L.I.R., et al. (2010). Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 467, 285–290.

Kitazawa, R., Kitazawa, S., and Maeda, S. (1999). Promoter structure of mouse RANKL/TRANCE/OPGL/ODF gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1445, 134–141.

Klein, R., Ganelin, R., Marks, J.F., Usher, P., and Richards, C. (1963). J Periodic paralysis with cardiac arrhythmia. *J. Pediatr.* 62, 371–385.

Knot, H.J., Zimmermann, P.A., and Nelson, M.T. (1996). Extracellular K(+)-induced hyperpolarizations and dilatations of rat coronary and cerebral arteries involve inward rectifier K(+) channels. *J. Physiol.* 492 ( Pt 2), 419–430.

Koga, T., Matsui, Y., Asagiri, M., Kodama, T., de Crombrughe, B., Nakashima, K., and Takayanagi, H. (2005). NFAT and Osterix cooperatively regulate bone formation. *Nat. Med.* 11, 880–885.

Kokunai, Y., Nakata, T., Furuta, M., Sakata, S., Kimura, H., Aiba, T., Yoshinaga, M., Osaki, Y., Nakamori, M., Itoh, H., et al. (2014). A Kir3.4 mutation causes Andersen-Tawil syndrome by an inhibitory effect on Kir2.1. *Neurology* 82, 1058–1064.

Komori, T. (2010). Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell Tissue Res.* 339, 189–195.

Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R.T., Gao, Y.H., Inada, M., et al. (1997). Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89, 755–764.

Konig, S., Hinard, V., Arnaudeau, S., Holzer, N., Potter, G., Bader, C.R., and Bernheim, L. (2004). Membrane hyperpolarization triggers myogenin and myocyte enhancer factor-2 expression during human myoblast differentiation. *J. Biol. Chem.* 279, 28187–28196.

Koppen, A., and Kalkhoven, E. (2010). Brown vs white adipocytes: the PPARgamma coregulator story. *FEBS Lett.* 584, 3250–3259.

Krause, M.N., Sancho-Martinez, I., and Izpisua Belmonte, J.C. (2016). Understanding the molecular mechanisms of reprogramming. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 473, 693–697.

Kubo, Y., Baldwin, T.J., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (1993). Primary structure and functional expression of a mouse inward rectifier potassium channel. *Nature* 362, 127–133.

Kuffler, S.W., and Nicholls, J.G. (1966). The physiology of neuroglial cells. *Ergeb. Physiol.* 57, 1–90.

Kugimiya, F., Kawaguchi, H., Ohba, S., Kawamura, N., Hirata, M., Chikuda, H., Azuma, Y., Woodgett, J.R., Nakamura, K., and Chung, U. (2007). GSK-3 $\beta$  Controls Osteogenesis through Regulating Runx2 Activity. *PLoS ONE* 2, e837.

Kühl, M. (2004). The WNT/calcium pathway: biochemical mediators, tools and future requirements. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 9, 967–974.

Kumar, D., and Lassar, A.B. (2014). Fibroblast growth factor maintains chondrogenic potential of limb bud mesenchymal cells by modulating DNMT3A recruitment. *Cell Rep.* 8, 1419–1431.

Kuo, A., Gulbis, J.M., Antcliff, J.F., Rahman, T., Lowe, E.D., Zimmer, J., Cuthbertson, J., Ashcroft, F.M., Ezaki, T., and Doyle, D.A. (2003). Crystal structure of the potassium channel KirBac1.1 in the closed state. *Science* 300, 1922–1926.

Kurosawa, H. (2007). Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells. *J. Biosci. Bioeng.* 103, 389–398.

Kwan, H.-Y., Leung, P.-C., Huang, Y., and Yao, X. (2003). Depletion of intracellular Ca<sup>2+</sup> stores sensitizes the flow-induced Ca<sup>2+</sup> influx in rat endothelial cells. *Circ. Res.* 92, 286–292.

Lange, P.S., Er, F., Gassanov, N., and Hoppe, U.C. (2003). Andersen mutations of KCNJ2 suppress the native inward rectifier current IK1 in a dominant-negative fashion. *Cardiovasc. Res.* 59, 321–327.

Leboy, P., Grasso-Knight, G., D'Angelo, M., Volk, S.W., Lian, J.V., Drissi, H., Stein, G.S., and Adams, S.L. (2001). Smad-Runx interactions during chondrocyte maturation. *J. Bone Joint Surg. Am.* 83-A Suppl 1, S15–S22.

Lee, C.H., Kim, J.-H., Lee, H.J., Jeon, K., Lim, H., Choi, H. yeon, Lee, E.-R., Park, S.H., Park, J.-Y., Hong, S., et al. (2011). The generation of iPS cells using non-viral magnetic nanoparticle based transfection. *Biomaterials* 32, 6683–6691.

Lee, K.S., Kim, H.J., Li, Q.L., Chi, X.Z., Ueta, C., Komori, T., Wozney, J.M., Kim, E.G., Choi, J.Y., Ryoo, H.M., et al. (2000). Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *Mol. Cell. Biol.* 20, 8783–8792.

Lee, K.-S., Hong, S.-H., and Bae, S.-C. (2002). Both the Smad and p38 MAPK pathways play a crucial role in Runx2 expression following induction by transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein. *Oncogene* 21, 7156–7163.

Lee, M.-H., Kwon, T.-G., Park, H.-S., Wozney, J.M., and Ryoo, H.-M. (2003). BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 309, 689–694.

Lee, M.-H., Kim, Y.-J., Yoon, W.-J., Kim, J.-I., Kim, B.-G., Hwang, Y.-S., Wozney, J.M., Chi, X.-Z., Bae, S.-C., Choi, K.-Y., et al. (2005). Dlx5 specifically regulates Runx2 type II expression by binding to homeodomain-response elements in the Runx2 distal promoter. *J. Biol. Chem.* 280, 35579–35587.

Lefebvre, V., and Dvir-Ginzberg, M. (2016). SOX9 and the many facets of its regulation in the chondrocyte lineage. *Connect. Tissue Res.*

Lefebvre, V., Huang, W., Harley, V.R., Goodfellow, P.N., and de Crombrughe, B. (1997). SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene. *Mol. Cell. Biol.* 17, 2336–2346.

Leong, I.U.S., Skinner, J.R., Shelling, A.N., and Love, D.R. (2014). Expression of a Mutant *kcnj2* Gene Transcript in Zebrafish. *ISRN Mol. Biol.* 2014, 1–14.

Leung, V.Y.L., Gao, B., Leung, K.K.H., Melhado, I.G., Wynn, S.L., Au, T.Y.K., Dung, N.W.F., Lau, J.Y.B., Mak, A.C.Y., Chan, D., et al. (2011). SOX9 governs differentiation stage-specific gene expression in growth plate chondrocytes via direct concomitant transactivation and repression. *PLoS Genet.* 7, e1002356.

Lewis, D.L., Ikeda, S.R., Aryee, D., and Joho, R.H. (1991). Expression of an inwardly rectifying K<sup>+</sup> channel from rat basophilic leukemia cell mRNA in *Xenopus* oocytes. *FEBS Lett.* 290, 17–21.

Leyland, M.L., and Dart, C. (2004). An alternatively spliced isoform of PSD-93/chapsyn 110 binds to the inwardly rectifying potassium channel, Kir2.1. *J. Biol. Chem.* 279, 43427–43436.

Li, F., Lu, Y., Ding, M., Napierala, D., Abbassi, S., Chen, Y., Duan, X., Wang, S., Lee, B., and Zheng, Q. (2011). Runx2 contributes to murine Col10a1 gene regulation through direct interaction with its cis-enhancer. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* 26, 2899–2910.

Lian, J.B., Stein, G.S., van Wijnen, A.J., Stein, J.L., Hassan, M.Q., Gaur, T., and Zhang, Y. (2012). MicroRNA control of bone formation and homeostasis. *Nat. Rev. Endocrinol.* *8*, 212–227.

Lim, B.C., Kim, G.B., Bae, E.J., Noh, C.I., Hwang, H., Kim, K.J., Hwang, Y.S., Ko, T.S., and Chae, J.-H. (2010). Andersen Cardiodyrhythmic Periodic Paralysis With KCNJ2 Mutations: A Novel Mutation in the Pore Selectivity Filter Residue. *J. Child Neurol.* *25*, 490–493.

Lissenberg-Thunnissen, S.N., de Gorter, D.J.J., Sier, C.F.M., and Schipper, I.B. (2011). Use and efficacy of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Int. Orthop.* *35*, 1271–1280.

Liu, C.-F., and Lefebvre, V. (2015). The transcription factors SOX9 and SOX5/SOX6 cooperate genome-wide through super-enhancers to drive chondrogenesis. *Nucleic Acids Res.* *43*, 8183–8203.

Liu, F., Kohlmeier, S., and Wang, C.-Y. (2008). Wnt signaling and skeletal development. *Cell. Signal.* *20*, 999–1009.

Liu, J.H., Bijlenga, P., Fischer-Lougheed, J., Occhiodoro, T., Kaelin, A., Bader, C.R., and Bernheim, L. (1998). Role of an inward rectifier K<sup>+</sup> current and of hyperpolarization in human myoblast fusion. *J. Physiol.* *510 ( Pt 2)*, 467–476.

Liu, W., Toyosawa, S., Furuichi, T., Kanatani, N., Yoshida, C., Liu, Y., Himeno, M., Narai, S., Yamaguchi, A., and Komori, T. (2001). Overexpression of Cbfa1 in osteoblasts inhibits osteoblast maturation and causes osteopenia with multiple fractures. *J. Cell Biol.* *155*, 157–166.

Liu, Z., Tang, Y., Qiu, T., Cao, X., and Clemens, T.L. (2006). A dishevelled-1/Smad1 interaction couples WNT and bone morphogenetic protein signaling pathways in uncommitted bone marrow stromal cells. *J. Biol. Chem.* *281*, 17156–17163.

Liu, Z.-J., Zhuge, Y., and Velazquez, O.C. (2009). Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J. Cell. Biochem.* *106*, 984–991.

Logan, C.Y., and Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *20*, 781–810.

Loh, Y.-H., Hartung, O., Li, H., Guo, C., Sahalie, J.M., Manos, P.D., Urbach, A., Heffner, G.C., Grskovic, M., Vigneault, F., et al. (2010). Reprogramming of T cells from human peripheral blood. *Cell Stem Cell* *7*, 15–19.

Lopatin, A.N., and Nichols, C.G. (1996). [K<sup>+</sup>] dependence of open-channel conductance in cloned inward rectifier potassium channels (IRK1, Kir2.1). *Biophys. J.* *71*, 682–694.

Lopatin, A.N., and Nichols, C.G. (2001). Inward rectifiers in the heart: an update on I(K1). *J. Mol. Cell. Cardiol.* *33*, 625–638.

Lopatin, A.N., Makhina, E.N., and Nichols, C.G. (1994). Potassium channel block by cytoplasmic polyamines as the mechanism of intrinsic rectification. *Nature* *372*, 366–369.

Lopes, C.M.B., Zhang, H., Rohacs, T., Jin, T., Yang, J., and Logothetis, D.E. (2002). Alterations in Conserved Kir Channel-PIP2 Interactions Underlie Channelopathies. *Neuron* *34*, 933–944.

Lu, X., Beck, G.R., Gilbert, L.C., Camalier, C.E., Bateman, N.W., Hood, B.L., Conrads, T.P., Kern, M.J., You, S., Chen, H., et al. (2011). Identification of the homeobox protein Prx1 (MHox, Prrx-1) as a regulator of osterix expression and mediator of tumor necrosis factor  $\alpha$  action in osteoblast differentiation. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* *26*, 209–219.

Lyssiotis, C.A., Foreman, R.K., Staerk, J., Garcia, M., Mathur, D., Markoulaki, S., Hanna, J., Lairson, L.L., Charette, B.D., Bouchez, L.C., et al. (2009). Reprogramming of murine fibroblasts to induced pluripotent stem cells with chemical complementation of Klf4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 8912–8917.

Ma, D., Taneja, T.K., Hagen, B.M., Kim, B.-Y., Ortega, B., Lederer, W.J., and Welling, P.A. (2011). Golgi Export of the Kir2.1 Channel Is Driven by a Trafficking Signal Located within Its Tertiary Structure. *Cell* *145*, 1102–1115.

Mackie, E.J. (2003). Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *35*, 1301–1305.

Maherali, N., Sridharan, R., Xie, W., Utikal, J., Eminli, S., Arnold, K., Stadtfeld, M., Yachechko, R., Tchieu, J., Jaenisch, R., et al. (2007). Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* *1*, 55–70.

Makkar, P., Metpally, R.P.R., Sangadala, S., and Reddy, B.V.B. (2009). Modeling and analysis of MH1 domain of Smads and their interaction with promoter DNA sequence motif. *J. Mol. Graph. Model.* *27*, 803–812.

Malan, D., Friedrichs, S., Fleischmann, B.K., and Sasse, P. (2011). Cardiomyocytes obtained from induced pluripotent stem cells with long-QT syndrome 3 recapitulate typical disease-specific features in vitro. *Circ. Res.* *109*, 841–847.



Malki, S., Nef, S., Notarnicola, C., Thevenet, L., Gasca, S., Méjean, C., Berta, P., Poulat, F., and Boizet-Bonhoure, B. (2005). Prostaglandin D2 induces nuclear import of the sex-determining factor SOX9 via its cAMP-PKA phosphorylation. *EMBO J.* *24*, 1798–1809.

Mallein-Gerin, F., and Van der Rest, M. (1996). La culture de chondrocytes : outil d'analyse de la différenciation et de l'organisation moléculaire du cartilage.

Mao, B., Wu, W., Davidson, G., Marhold, J., Li, M., Mechler, B.M., Delius, H., Hoppe, D., Stannek, P., Walter, C., et al. (2002). Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature* *417*, 664–667.

Mariani, E., Pulsatelli, L., and Facchini, A. (2014). Signaling pathways in cartilage repair. *Int. J. Mol. Sci.* *15*, 8667–8698.

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*, 7634–7638.

Massagué, J. (2000). How cells read TGF- $\beta$  signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *1*, 169–178.

Matsubara, T., Kida, K., Yamaguchi, A., Hata, K., Ichida, F., Meguro, H., Aburatani, H., Nishimura, R., and Yoneda, T. (2008). BMP2 regulates Osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation. *J. Biol. Chem.* *283*, 29119–29125.

Matsunobu, T., Torigoe, K., Ishikawa, M., de Vega, S., Kulkarni, A.B., Iwamoto, Y., and Yamada, Y. (2009). Critical roles of the TGF-beta type I receptor ALK5 in perichondrial formation and function, cartilage integrity, and osteoblast differentiation during growth plate development. *Dev. Biol.* *332*, 325–338.

Mayshar, Y., Ben-David, U., Lavon, N., Biancotti, J.-C., Yakir, B., Clark, A.T., Plath, K., Lowry, W.E., and Benvenisty, N. (2010). Identification and Classification of Chromosomal Aberrations in Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* *7*, 521–531.

McCarron, J.G., and Halpern, W. (1990). Impaired potassium-induced dilation in hypertensive rat cerebral arteries does not reflect altered Na<sup>+</sup>,K<sup>(+)</sup>-ATPase dilation. *Circ. Res.* *67*, 1035–1039.

Meola, G., Hanna, M.G., and Fontaine, B. (2009). Diagnosis and new treatment in muscle channelopathies. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *80*, 360–365.

Meregalli, M. (2011). Stem Cell Therapy for Neuromuscular Diseases. *Stem Cells Clin. Res.*

Mikkelsen, T.S., Ku, M., Jaffe, D.B., Issac, B., Lieberman, E., Giannoukos, G., Alvarez, P., Brockman, W., Kim, T.-K., Koche, R.P., et al. (2007). Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* 448, 553–560.

Mikkelsen, T.S., Hanna, J., Zhang, X., Ku, M., Wernig, M., Schorderet, P., Bernstein, B.E., Jaenisch, R., Lander, E.S., and Meissner, A. (2008). Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature* 454, 49–55.

Mimeault, M., and Batra, S.K. (2008). Recent progress on normal and malignant pancreatic stem/progenitor cell research: therapeutic implications for the treatment of type 1 or 2 diabetes mellitus and aggressive pancreatic cancer. *Gut* 57, 1456–1468.

Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., and Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113, 631–642.

Miyazaki, S.I., Takahashi, K., Tsuda, K., and Yoshii, M. (1974). Analysis of non-linearity observed in the current-voltage relation of the tunicate embryo. *J. Physiol.* 238, 55–77.

Moad, M., Pal, D., Hepburn, A.C., Williamson, S.C., Wilson, L., Lako, M., Armstrong, L., Hayward, S.W., Franco, O.E., Cates, J.M., et al. (2013). A novel model of urinary tract differentiation, tissue regeneration, and disease: reprogramming human prostate and bladder cells into induced pluripotent stem cells. *Eur. Urol.* 64, 753–761.

Mohr, J.C., Zhang, J., Azarin, S.M., Soerens, A.G., de Pablo, J.J., Thomson, J.A., Lyons, G.E., Palecek, S.P., and Kamp, T.J. (2010). The microwell control of embryoid body size in order to regulate cardiac differentiation of human embryonic stem cells. *Biomaterials* 31, 1885–1893.

Mohsen-Kanson, T., Hafner, A.-L., Wdziekonski, B., Takashima, Y., Villageois, P., Carrière, A., Svensson, M., Bagnis, C., Chignon-Sicard, B., Svensson, P.-A., et al. (2014). Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells into Brown and White Adipocytes: Role of Pax3: Human Brown and White Adipocyte Progenitors. *STEM CELLS* 32, 1459–1467.

Moon, R.T., Kohn, A.D., De Ferrari, G.V., and Kaykas, A. (2004). WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat. Rev. Genet.* 5, 691–701.

Moretti, A., Bellin, M., Welling, A., Jung, C.B., Lam, J.T., Bott-Flügel, L., Dorn, T., Goedel, A., Höhnke, C., Hofmann, F., et al. (2010). Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome. *N. Engl. J. Med.* 363, 1397–1409.

Moustakas, A., and Heldin, C.-H. (2009). The regulation of TGFbeta signal transduction. *Dev. Camb. Engl.* *136*, 3699–3714.

Müller, F.-J., Goldmann, J., Löser, P., and Loring, J.F. (2010). A call to standardize teratoma assays used to define human pluripotent cell lines. *Cell Stem Cell* *6*, 412–414.

Müller, M., Seufferlein, T., Illing, A., and Homann, J. (2013). Modelling Human Channelopathies Using Induced Pluripotent Stem Cells: A Comprehensive Review. *Stem Cells Int.* *2013*, 1–7.

Murata, Y., and Okamura, Y. (2007). Depolarization activates the phosphoinositide phosphatase Ci-VSP, as detected in *Xenopus* oocytes coexpressing sensors of PIP<sub>2</sub>: Phosphatase activity of Ci-VSP is activated by depolarization. *J. Physiol.* *583*, 875–889.

Nakajima, T., Hazama, H., Hamada, E., Omata, M., and Kurachi, Y. (1995). Ionic basis of neurokinin-A-induced depolarization in single smooth muscle cells isolated from guinea-pig trachea. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* *430*, 552–562.

Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R., and de Crombrughe, B. (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell* *108*, 17–29.

Nehring, R.B., Wischmeyer, E., Döring, F., Veh, R.W., Sheng, M., and Karschin, A. (2000). Neuronal inwardly rectifying K(+) channels differentially couple to PDZ proteins of the PSD-95/SAP90 family. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *20*, 156–162.

Nelson, M.T., Cheng, H., Rubart, M., Santana, L.F., Bonev, A.D., Knot, H.J., and Lederer, W.J. (1995). Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks. *Science* *270*, 633–637.

Neri, T., Muggeo, S., Paulis, M., Caldana, M.E., Crisafulli, L., Strina, D., Focarelli, M.L., Faggioli, F., Recordati, C., Scaramuzza, S., et al. (2015). Targeted Gene Correction in Osteopetrotic-Induced Pluripotent Stem Cells for the Generation of Functional Osteoclasts. *Stem Cell Rep.* *5*, 558–568.

Ng, E.S., Davis, R.P., Azzola, L., Stanley, E.G., and Elefanty, A.G. (2005). Forced aggregation of defined numbers of human embryonic stem cells into embryoid bodies fosters robust, reproducible hematopoietic differentiation. *Blood* *106*, 1601–1603.

Nguyen, H.-L., Pieper, G.H., and Wilders, R. (2013). Andersen–Tawil syndrome: Clinical and molecular aspects. *Int. J. Cardiol.* *170*, 1–16.

Nguyen, H.N., Byers, B., Cord, B., Shcheglovitov, A., Byrne, J., Gujar, P., Kee, K., Schüle, B., Dolmetsch, R.E., Langston, W., et al. (2011). LRRK2 mutant iPSC-derived DA neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress. *Cell Stem Cell* *8*, 267–280.

Nichols, C.G., and Lopatin, A.N. (1997). Inward rectifier potassium channels. *Annu. Rev. Physiol.* *59*, 171–191.

Niclis, J.C., Pinar, A., Haynes, J.M., Alsanie, W., Jenny, R., Dottori, M., and Cram, D.S. (2013). Characterization of forebrain neurons derived from late-onset Huntington's disease human embryonic stem cell lines. *Front. Cell. Neurosci.* *7*, 37.

Nilius, B., and Droogmans, G. (2001). Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol. Rev.* *81*, 1415–1459.

Nishida, M., and MacKinnon, R. (2002). Structural basis of inward rectification: cytoplasmic pore of the G protein-gated inward rectifier GIRK1 at 1.8 Å resolution. *Cell* *111*, 957–965.

Nishimura, R., Hata, K., Harris, S.E., Ikeda, F., and Yoneda, T. (2002). Core-binding factor alpha 1 (Cbfa1) induces osteoblastic differentiation of C2C12 cells without interactions with Smad1 and Smad5. *Bone* *31*, 303–312.

Nishio, Y., Dong, Y., Paris, M., O'Keefe, R.J., Schwarz, E.M., and Drissi, H. (2006). Runx2-mediated regulation of the zinc finger Osterix/Sp7 gene. *Gene* *372*, 62–70.

Noble, D. (1965). Electrical properties of cardiac muscle attributable to inward going (anomalous) rectification. *J. Cell. Comp. Physiol.* *66*, 127–135.

Ogawa, E., Inuzuka, M., Maruyama, M., Satake, M., Naito-Fujimoto, M., Ito, Y., and Shigesada, K. (1993a). Molecular cloning and characterization of PEBP2 beta, the heterodimeric partner of a novel *Drosophila* runt-related DNA binding protein PEBP2 alpha. *Virology* *194*, 314–331.

Ogawa, E., Maruyama, M., Kagoshima, H., Inuzuka, M., Lu, J., Satake, M., Shigesada, K., and Ito, Y. (1993b). PEBP2/PEA2 represents a family of transcription factors homologous to the products of the *Drosophila* runt gene and the human AML1 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 6859–6863.

Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2008). Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* *322*, 949–953.

Orimo, H. (2010). The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *J. Nippon Med. Sch. Nippon Ika Daigaku Zasshi* *77*, 4–12.

Ortuño, M.J., Ruiz-Gaspà, S., Rodríguez-Carballo, E., Susperregui, A.R.G., Bartrons, R., Rosa, J.L., and Ventura, F. (2010). p38 regulates expression of osteoblast-specific genes by phosphorylation of osterix. *J. Biol. Chem.* *285*, 31985–31994.

Osafune, K., Caron, L., Borowiak, M., Martinez, R.J., Fitz-Gerald, C.S., Sato, Y., Cowan, C.A., Chien, K.R., and Melton, D.A. (2008). Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. *Nat. Biotechnol.* *26*, 313–315.

Otto, F., Thornell, A.P., Crompton, T., Denzel, A., Gilmour, K.C., Rosewell, I.R., Stamp, G.W.H., Beddington, R.S.P., Mundlos, S., Olsen, B.R., et al. (1997). *Cbfa1*, a Candidate Gene for Cleidocranial Dysplasia Syndrome, Is Essential for Osteoblast Differentiation and Bone Development. *Cell* *89*, 765–771.

Pan, G.J., Chang, Z.Y., Schöler, H.R., and Pei, D. (2002). Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell Res.* *12*, 321–329.

Pan, Q., Yu, Y., Chen, Q., Li, C., Wu, H., Wan, Y., Ma, J., and Sun, F. (2008). *Sox9*, a key transcription factor of bone morphogenetic protein-2-induced chondrogenesis, is activated through BMP pathway and a CCAAT box in the proximal promoter. *J. Cell. Physiol.* *217*, 228–241.

Papp, B., and Plath, K. (2011). Reprogramming to pluripotency: stepwise resetting of the epigenetic landscape. *Cell Res.* *21*, 486–501.

Park, J., Sutradhar, B.C., Hong, G., Choi, S.H., and Kim, G. (2011). Comparison of the cytotoxic effects of bupivacaine, lidocaine, and mepivacaine in equine articular chondrocytes. *Vet. Anaesth. Analg.* *38*, 127–133.

Park, O.-J., Kim, H.-J., Woo, K.-M., Baek, J.-H., and Ryoo, H.-M. (2010). FGF2-activated ERK mitogen-activated protein kinase enhances Runx2 acetylation and stabilization. *J. Biol. Chem.* *285*, 3568–3574.

Pearlman, S.M., Serber, Z., and Ferrell, J.E. (2011). A Mechanism for the Evolution of Phosphorylation Sites. *Cell* *147*, 934–946.

Pegan, S., Arrabit, C., Zhou, W., Kwiatkowski, W., Collins, A., Slesinger, P.A., and Choe, S. (2005). Cytoplasmic domain structures of Kir2.1 and Kir3.1 show sites for modulating gating and rectification. *Nat. Neurosci.* *8*, 279–287.

Pegg, A.E. (1986). Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem. J.* *234*, 249–262.

Pellizzón, O.A., Kalaizich, L., Ptáček, L.J., Tristani-Firouzi, M., and Gonzalez, M.D. (2007). Flecainide Suppresses Bidirectional Ventricular Tachycardia and Reverses Tachycardia-Induced Cardiomyopathy in Andersen-Tawil Syndrome. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* *0*, 070727020814005 – ???

Pennarossa, G., Zenobi, A., Gandolfi, C.E., Manzoni, E.F.M., Gandolfi, F., and Brevini, T.A.L. (2016). Erase and Rewind: Epigenetic Conversion of Cell Fate. *Stem Cell Rev. Rep.* 12, 163–170.

Perez, E.E., Wang, J., Miller, J.C., Jouvenot, Y., Kim, K.A., Liu, O., Wang, N., Lee, G., Bartsevich, V.V., Lee, Y.-L., et al. (2008). Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* 26, 808–816.

Périer, F., Radeke, C.M., and Vandenberg, C.A. (1994). Primary structure and characterization of a small-conductance inwardly rectifying potassium channel from human hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 6240–6244.

Pesce, M., and Schöler, H.R. (2001). Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development. *Stem Cells Dayt. Ohio* 19, 271–278.

Peters, H., Neubüser, A., Kratochwil, K., and Balling, R. (1998). Pax9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities. *Genes Dev.* 12, 2735–2747.

Piera-Velazquez, S., Hawkins, D.F., Whitecavage, M.K., Colter, D.C., Stokes, D.G., and Jimenez, S.A. (2007). Regulation of the human SOX9 promoter by Sp1 and CREB. *Exp. Cell Res.* 313, 1069–1079.

Pini, J., Rouleau, M., Desnuelle, C., Sacconi, S., and Bendahhou, S. (2016). Modeling Andersen’s Syndrome in Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Dev.* 25, 151–159.

Plaster, N.M., Tawil, R., Tristani-Firouzi, M., Canún, S., Bendahhou, S., Tsunoda, A., Donaldson, M.R., Iannaccone, S.T., Brunt, E., Barohn, R., et al. (2001). Mutations in Kir2.1 cause the developmental and episodic electrical phenotypes of Andersen’s syndrome. *Cell* 105, 511–519.

Plath, K., and Lowry, W.E. (2011). Progress in understanding reprogramming to the induced pluripotent state. *Nat. Rev. Genet.* 12, 253–265.

Preisig-Müller, R., Schlichthörl, G., Goerge, T., Heinen, S., Brüggemann, A., Rajan, S., Derst, C., Veh, R.W., and Daut, J. (2002). Heteromerization of Kir2.x potassium channels contributes to the phenotype of Andersen’s syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 7774–7779.

Priori, S.G., Pandit, S.V., Rivolta, I., Berenfeld, O., Ronchetti, E., Dhamoon, A., Napolitano, C., Anumonwo, J., di Barletta, M.R., Gudapakkam, S., et al. (2005). A novel form of short QT syndrome (SQT3) is caused by a mutation in the KCNJ2 gene. *Circ. Res.* 96, 800–807.

- Prüss, H., Derst, C., Lommel, R., and Veh, R.W. (2005). Differential distribution of individual subunits of strongly inwardly rectifying potassium channels (Kir2 family) in rat brain. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *139*, 63–79.
- Quayle, J.M., McCarron, J.G., Brayden, J.E., and Nelson, M.T. (1993). Inward rectifier K<sup>+</sup> currents in smooth muscle cells from rat resistance-sized cerebral arteries. *Am. J. Physiol.* *265*, C1363–C1370.
- Raab-Graham, K.F., Radeke, C.M., and Vandenberg, C.A. (1994). Molecular cloning and expression of a human heart inward rectifier potassium channel. *Neuroreport* *5*, 2501–2505.
- Rahl, P.B., Lin, C.Y., Seila, A.C., Flynn, R.A., McCuine, S., Burge, C.B., Sharp, P.A., and Young, R.A. (2010). c-Myc regulates transcriptional pause release. *Cell* *141*, 432–445.
- Rahman, M.S., Akhtar, N., Jamil, H.M., Banik, R.S., and Asaduzzaman, S.M. (2015). TGF- $\beta$ /BMP signaling and other molecular events: regulation of osteoblastogenesis and bone formation. *Bone Res.* *3*, 15005.
- Rajakulendran, S., Tan, S.V., and Hanna, M.G. (2010). Muscle weakness, palpitations and a small chin: the Andersen-Tawil syndrome. *Pract. Neurol.* *10*, 227–231.
- Rao, T.P., and Köhl, M. (2010). An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more. *Circ. Res.* *106*, 1798–1806.
- Rashid, S.T., Corbineau, S., Hannan, N., Marciniak, S.J., Miranda, E., Alexander, G., Huang-Doran, I., Griffin, J., Ahrlund-Richter, L., Skepper, J., et al. (2010). Modeling inherited metabolic disorders of the liver using human induced pluripotent stem cells. *J. Clin. Invest.* *120*, 3127–3136.
- Rawadi, G., Vayssière, B., Dunn, F., Baron, R., and Roman-Roman, S. (2003). BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *J. Bone Miner. Res. Off. J. Am. Soc. Bone Miner. Res.* *18*, 1842–1853.
- Redfern, W.S., Carlsson, L., Davis, A.S., Lynch, W.G., MacKenzie, I., Palethorpe, S., Siegl, P.K.S., Strang, I., Sullivan, A.T., Wallis, R., et al. (2003). Relationships between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT interval prolongation and torsade de pointes for a broad range of drugs: evidence for a provisional safety margin in drug development. *Cardiovasc. Res.* *58*, 32–45.
- Regard, J.B., Cherman, N., Palmer, D., Kuznetsov, S.A., Celi, F.S., Guettier, J.-M., Chen, M., Bhattacharyya, N., Wess, J., Coughlin, S.R., et al. (2011). Wnt/ $\beta$ -catenin signaling is

differentially regulated by  $G\alpha$  proteins and contributes to fibrous dysplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 20101–20106.

Regard, J.B., Zhong, Z., Williams, B.O., and Yang, Y. (2012). Wnt Signaling in Bone Development and Disease: Making Stronger Bone with Wnts. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *4*, a007997–a007997.

Reinhold, M.I., Kapadia, R.M., Liao, Z., and Naski, M.C. (2006). The Wnt-inducible transcription factor Twist1 inhibits chondrogenesis. *J. Biol. Chem.* *281*, 1381–1388.

Ritsemanavaneck, H., Kors, J., and Vanherpen, G. (2005). The U wave in the electrocardiogram: A solution for a 100-year-old riddle. *Cardiovasc. Res.* *67*, 256–262.

Robertson, J.L., Palmer, L.G., and Roux, B. (2008). Long-pore electrostatics in inward-rectifier potassium channels. *J. Gen. Physiol.* *132*, 613–632.

Rodda, S.J., and McMahon, A.P. (2006). Distinct roles for Hedgehog and canonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors. *Dev. Camb. Engl.* *133*, 3231–3244.

Romanenko, V.G., Fang, Y., Byfield, F., Travis, A.J., Vandenberg, C.A., Rothblat, G.H., and Levitan, I. (2004). Cholesterol sensitivity and lipid raft targeting of Kir2.1 channels. *Biophys. J.* *87*, 3850–3861.

Rong, Z., Zhu, S., Xu, Y., and Fu, X. (2014). Homologous recombination in human embryonic stem cells using CRISPR/Cas9 nickase and a long DNA donor template. *Protein Cell* *5*, 258–260.

Rosenhouse-Dantsker, A., Epshtein, Y., and Levitan, I. (2014). Interplay Between Lipid Modulators of Kir2 Channels: Cholesterol and PIP2. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* *11*, 131–137.

Rossignol, T.M., and Jones, S.V.P. (2006). Regulation of a family of inwardly rectifying potassium channels (Kir2) by the m1 muscarinic receptor and the small GTPase Rho. *Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol.* *452*, 164–174.

Rougier, N., Bourc'his, D., Gomes, D.M., Niveleau, A., Plachot, M., Pàldi, A., and Viegas-Péquignot, E. (1998). Chromosome methylation patterns during mammalian preimplantation development. *Genes Dev.* *12*, 2108–2113.

Rüdel, R., Ruppertsberg, J.P., and Spittelmeister, W. (1989). Abnormalities of the fast sodium current in myotonic dystrophy, recessive generalized myotonia, and adynamia episodica. *Muscle Nerve* *12*, 281–287.



Ruvkun, G. (2001). Molecular biology. Glimpses of a tiny RNA world. *Science* 294, 797–799.

Sacco, S., Giuliano, S., Sacconi, S., Desnuelle, C., Barhanin, J., Amri, E. -z., and Bendahhou, S. (2015). The inward rectifier potassium channel Kir2.1 is required for osteoblastogenesis. *Hum. Mol. Genet.* 24, 471–479.

Sacconi, S., Simkin, D., Arrighi, N., Chapon, F., Larroque, M.M., Vicart, S., Sternberg, D., Fontaine, B., Barhanin, J., Desnuelle, C., et al. (2009). Mechanisms underlying Andersen's syndrome pathology in skeletal muscle are revealed in human myotubes. *AJP Cell Physiol.* 297, C876–C885.

Sacher, F., Denjoy, I., Dambrine, P., Albenque, J.-P., Le Scouarnec, S., Leclercq, J.-F., Hocini, M., O'Neill, M.D., Jaïs, P., Clémenty, J., et al. (2006). Characterization of ventricular arrhythmias in andersen-tawil (long QT7) syndrome. *Heart Rhythm* 3, S322.

Sakmann, B., and Trube, G. (1984). Conductance properties of single inwardly rectifying potassium channels in ventricular cells from guinea-pig heart. *J. Physiol.* 347, 641–657.

Sanford, L.P., Ormsby, I., Groot, A.C.G., Sariola, H., Friedman, R., Boivin, G.P., Cardell, E.L., and Doetschman, T. (1997). TGFbeta2 knockout mice have multiple developmental defects that are non-overlapping with other TGFbeta knockout phenotypes. *Development* 124, 2659–2670.

Sansone, V., and Tawil, R. (2007). Management and treatment of Andersen-Tawil syndrome (ATS). *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* 4, 233–237.

Sansone, V., Griggs, R.C., Meola, G., Ptáček, L.J., Barohn, R., Iannaccone, S., Bryan, W., Baker, N., Janas, S.J., Scott, W., et al. (1997). Andersen's syndrome: a distinct periodic paralysis. *Ann. Neurol.* 42, 305–312.

Sapkota, G., Alarcón, C., Spagnoli, F.M., Brivanlou, A.H., and Massagué, J. (2007). Balancing BMP Signaling through Integrated Inputs into the Smad1 Linker. *Mol. Cell* 25, 441–454.

Sargent, C.Y., Berguig, G.Y., and McDevitt, T.C. (2009). Cardiomyogenic differentiation of embryoid bodies is promoted by rotary orbital suspension culture. *Tissue Eng. Part A* 15, 331–342.

Satake, M., Nomura, S., Yamaguchi-Iwai, Y., Takahama, Y., Hashimoto, Y., Niki, M., Kitamura, Y., and Ito, Y. (1995). Expression of the Runt domain-encoding PEBP2 alpha genes in T cells during thymic development. *Mol. Cell. Biol.* 15, 1662–1670.

Sathananthan, A.H. (2011). Neural stem cells in neurospheres, embryoid bodies, and central nervous system of human embryos. *Microsc. Microanal. Off. J. Microsc. Soc. Am. Microbeam Anal. Soc. Microsc. Soc. Can.* *17*, 520–527.

Satokata, I., Ma, L., Ohshima, H., Bei, M., Woo, I., Nishizawa, K., Maeda, T., Takano, Y., Uchiyama, M., Heaney, S., et al. (2000). *Msx2* deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat. Genet.* *24*, 391–395.

Schaller, S.A., and Muneoka, K. (2001). Inhibition of polarizing activity in the anterior limb bud is regulated by extracellular factors. *Dev. Biol.* *240*, 443–456.

Schmidt, R., and Plath, K. (2012). The roles of the reprogramming factors Oct4, Sox2 and Klf4 in resetting the somatic cell epigenome during induced pluripotent stem cell generation. *Genome Biol.* *13*, 251.

Schopperle, W.M., and DeWolf, W.C. (2006). The TRA-1-60 and TRA-1-81 Human Pluripotent Stem Cell Markers Are Expressed on Podocalyxin in Embryonal Carcinoma. *STEM CELLS* *25*, 723–730.

Schram, G., Melnyk, P., Pourrier, M., Wang, Z., and Nattel, S. (2002). Kir2.4 and Kir2.1 K(+) channel subunits co-assemble: a potential new contributor to inward rectifier current heterogeneity. *J. Physiol.* *544*, 337–349.

Schubert, W., Sotgia, F., Cohen, A.W., Capozza, F., Bonuccelli, G., Bruno, C., Minetti, C., Bonilla, E., DiMauro, S., and Lisanti, M.P. (2007). Caveolin-1(-/-)- and Caveolin-2(-/-)-Deficient Mice Both Display Numerous Skeletal Muscle Abnormalities, with Tubular Aggregate Formation. *Am. J. Pathol.* *170*, 316–333.

Schulze-Bahr, E. (2012). Long QT Syndromes: Genetic Basis. *Card. Electrophysiol. Clin.* *4*, 1–16.

Seah, Y., EL Farran, C., Warriar, T., Xu, J., and Loh, Y.-H. (2015). Induced Pluripotency and Gene Editing in Disease Modelling: Perspectives and Challenges. *Int. J. Mol. Sci.* *16*, 28614–28634.

Sebald, W., Nickel, J., Zhang, J.-L., and Mueller, T.D. (2004). Molecular recognition in bone morphogenetic protein (BMP)/receptor interaction. *Biol. Chem.* *385*, 697–710.

Seki, T., Yuasa, S., Oda, M., Egashira, T., Yae, K., Kusumoto, D., Nakata, H., Tohyama, S., Hashimoto, H., Kodaira, M., et al. (2010). Generation of induced pluripotent stem cells from human terminally differentiated circulating T cells. *Cell Stem Cell* *7*, 11–14.

Selvamurugan, N. (2000). Parathyroid Hormone Regulation of the Rat Collagenase-3 Promoter by Protein Kinase A-dependent Transactivation of Core Binding Factor alpha 1. *J. Biol. Chem.* *275*, 5037–5042.

Semënov, M., Tamai, K., and He, X. (2005). SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *J. Biol. Chem.* *280*, 26770–26775.

Seymour, P.A. (2014). Sox9: A Master Regulator of the Pancreatic Program. *Rev. Diabet. Stud.* *11*, 51–83.

Shamblott, M.J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E.M., Littlefield, J.W., Donovan, P.J., Blumenthal, P.D., Huggins, G.R., and Gearhart, J.D. (1998). Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 13726–13731.

Sheridan, S.D., Surampudi, V., and Rao, R.R. (2012). Analysis of Embryoid Bodies Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells as a Means to Assess Pluripotency. *Stem Cells Int.* *2012*, 1–9.

Shi, Y., Desponts, C., Do, J.T., Hahm, H.S., Schöler, H.R., and Ding, S. (2008). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. *Cell Stem Cell* *3*, 568–574.

Sieber, C., Kopf, J., Hiepen, C., and Knaus, P. (2009). Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* *20*, 343–355.

Silver, M.R., and DeCoursey, T.E. (1990). Intrinsic gating of inward rectifier in bovine pulmonary artery endothelial cells in the presence or absence of internal Mg<sup>2+</sup>. *J. Gen. Physiol.* *96*, 109–133.

Simara, P., Motl, J.A., and Kaufman, D.S. (2013). Pluripotent stem cells and gene therapy. *Transl. Res.* *161*, 284–292.

Sims, S.M., and Dixon, S.J. (1989). Inwardly rectifying K<sup>+</sup> current in osteoclasts. *Am. J. Physiol.* *256*, C1277–C1282.

Singh, B., and Gupta, R.S. (1985). Species-specific differences in the toxicity and mutagenicity of the anticancer drugs mithramycin, chromomycin A3, and olivomycin. *Cancer Res.* *45*, 2813–2820.

Sinha, K.M., and Zhou, X. (2013). Genetic and molecular control of osterix in skeletal formation. *J. Cell. Biochem.* *114*, 975–984.

Smits, P., Li, P., Mandel, J., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R., de Crombrughe, B., and Lefebvre, V. (2001). The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev. Cell* 1, 277–290.

Sohn, Y.-D., Han, J.W., and Yoon, Y. (2012). Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Somatic Cells. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, (Elsevier), pp. 1–26.

Soldner, F., Hockemeyer, D., Beard, C., Gao, Q., Bell, G.W., Cook, E.G., Hargus, G., Blak, A., Cooper, O., Mitalipova, M., et al. (2009). Parkinson's Disease Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells Free of Viral Reprogramming Factors. *Cell* 136, 964–977.

Später, D., Hill, T.P., O'sullivan, R.J., Gruber, M., Conner, D.A., and Hartmann, C. (2006). Wnt9a signaling is required for joint integrity and regulation of Ihh during chondrogenesis. *Dev. Camb. Engl.* 133, 3039–3049.

Spivakov, M., and Fisher, A.G. (2007). Epigenetic signatures of stem-cell identity. *Nat. Rev. Genet.* 8, 263–271.

Sridharan, R., Tchieu, J., Mason, M.J., Yachechko, R., Kuoy, E., Horvath, S., Zhou, Q., and Plath, K. (2009). Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency. *Cell* 136, 364–377.

Stanfield, P.R., Davies, N.W., Shelton, P.A., Sutcliffe, M.J., Khan, I.A., Brammar, W.J., and Conley, E.C. (1994). A single aspartate residue is involved in both intrinsic gating and blockage by Mg<sup>2+</sup> of the inward rectifier, IRK1. *J. Physiol.* 478 (Pt 1), 1–6.

Štefková, K., Procházková, J., and Pacherník, J. (2015). Alkaline Phosphatase in Stem Cells. *Stem Cells Int.* 2015, 1–11.

Sternecker, J.L., Reinhardt, P., and Schöler, H.R. (2014). Investigating human disease using stem cell models. *Nat. Rev. Genet.* 15, 625–639.

Stockklausner, C., and Klocker, N. (2003). Surface expression of inward rectifier potassium channels is controlled by selective Golgi export. *J. Biol. Chem.* 278, 17000–17005.

Stockklausner, C., Ludwig, J., Ruppertsberg, J.P., and Klöcker, N. (2001). A sequence motif responsible for ER export and surface expression of Kir2.0 inward rectifier K(+) channels. *FEBS Lett.* 493, 129–133.

Südbeck, P., and Scherer, G. (1997). Two independent nuclear localization signals are present in the DNA-binding high-mobility group domains of SRY and SOX9. *J. Biol. Chem.* 272, 27848–27852.

Sugimura, R., and Li, L. (2010). Noncanonical Wnt signaling in vertebrate development, stem cells, and diseases. *Birth Defects Res. Part C Embryo Today Rev.* 90, 243–256.

Sumitomo, N., Shimizu, W., Taniguchi, K., and Hiraoka, M. (2008). Calcium channel blocker and adenosine triphosphate terminate bidirectional ventricular tachycardia in a patient with Andersen-Tawil syndrome. *Heart Rhythm Off. J. Heart Rhythm Soc.* 5, 498–499.

Tabor, C.W., and Tabor, H. (1984). Polyamines. *Annu. Rev. Biochem.* 53, 749–790.

Tagliatela, M., Wible, B.A., Caporaso, R., and Brown, A.M. (1994). Specification of pore properties by the carboxyl terminus of inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels. *Science* 264, 844–847.

Tagliatela, M., Ficker, E., Wible, B.A., and Brown, A.M. (1995). C-terminus determinants for Mg<sup>2+</sup> and polyamine block of the inward rectifier K<sup>+</sup> channel IRK1. *EMBO J.* 14, 5532–5541.

Takahashi, T. (1990). Inward rectification in neonatal rat spinal motoneurons. *J. Physiol.* 423, 47–62.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 131, 861–872.

Takahashi, N., Morishige, K., Jahangir, A., Yamada, M., Findlay, I., Koyama, H., and Kurachi, Y. (1994). Molecular cloning and functional expression of cDNA encoding a second class of inward rectifier potassium channels in the mouse brain. *J. Biol. Chem.* 269, 23274–23279.

Takebe, T., Sekine, K., Enomura, M., Koike, H., Kimura, M., Ogaeri, T., Zhang, R.-R., Ueno, Y., Zheng, Y.-W., Koike, N., et al. (2013). Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature* 499, 481–484.

Takeda, S., Bonnamy, J.P., Owen, M.J., Ducy, P., and Karsenty, G. (2001). Continuous expression of Cbfa1 in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues Cbfa1-deficient mice. *Genes Dev.* 15, 467–481.

Tan, S.V., Z'graggen, W.J., Boërio, D., Rayan, D.L.R., Howard, R., Hanna, M.G., and Bostock, H. (2012). Membrane dysfunction in Andersen-Tawil syndrome assessed by velocity recovery cycles. *Muscle Nerve* 46, 193–203.

Tawil, R., Ptacek, L.J., Pavlakis, S.G., DeVivo, D.C., Penn, A.S., Ozdemir, C., and Griggs, R.C. (1994). Andersen's syndrome: potassium-sensitive periodic paralysis, ventricular ectopy, and dysmorphic features. *Ann. Neurol.* 35, 326–330.

Taya, Y., O'Kane, S., and Ferguson, M.W. (1999). Pathogenesis of cleft palate in TGF-beta3 knockout mice. *Dev. Camb. Engl.* 126, 3869–3879.

Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145–1147.

Tohmonda, T., Miyauchi, Y., Ghosh, R., Yoda, M., Uchikawa, S., Takito, J., Morioka, H., Nakamura, M., Iwawaki, T., Chiba, K., et al. (2011). The IRE1 $\alpha$ -XBP1 pathway is essential for osteoblast differentiation through promoting transcription of Osterix. *EMBO Rep.* 12, 451–457.

Töpert, C., Döring, F., Wischmeyer, E., Karschin, C., Brockhaus, J., Ballanyi, K., Derst, C., and Karschin, A. (1998). Kir2.4: a novel K<sup>+</sup> inward rectifier channel associated with motoneurons of cranial nerve nuclei. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 18, 4096–4105.

Topol, L., Chen, W., Song, H., Day, T.F., and Yang, Y. (2009). Sox9 inhibits Wnt signaling by promoting beta-catenin phosphorylation in the nucleus. *J. Biol. Chem.* 284, 3323–3333.

Toppets, V. (2004). Morphologie, croissance et remaniement du tissu osseux.

Tou, L., Quibria, N., and Alexander, J.M. (2003). Transcriptional regulation of the human Runx2/Cbfa1 gene promoter by bone morphogenetic protein-7. *Mol. Cell. Endocrinol.* 205, 121–129.

Tribioli, C., and Lufkin, T. (1999). The murine Bapx1 homeobox gene plays a critical role in embryonic development of the axial skeleton and spleen. *Dev. Camb. Engl.* 126, 5699–5711.

Tristani-Firouzi, M., and Etheridge, S.P. (2010). Kir 2.1 channelopathies: the Andersen-Tawil syndrome. *Pflüg. Arch. - Eur. J. Physiol.* 460, 289–294.

Tristani-Firouzi, M., Jensen, J.L., Donaldson, M.R., Sansone, V., Meola, G., Hahn, A., Bendahhou, S., Kwiecinski, H., Fidzianska, A., Plaster, N., et al. (2002). Functional and clinical characterization of KCNJ2 mutations associated with LQT7 (Andersen syndrome). *J. Clin. Invest.* 110, 381–388.

Trokovic, R., Weltner, J., Manninen, T., Mikkola, M., Lundin, K., Hämäläinen, R., Suomalainen, A., and Otonkoski, T. (2013). Small Molecule Inhibitors Promote Efficient Generation of Induced Pluripotent Stem Cells From Human Skeletal Myoblasts. *Stem Cells Dev.* 22, 114–123.

Tsuda, M., Takahashi, S., Takahashi, Y., and Asahara, H. (2003). Transcriptional co-activators CREB-binding protein and p300 regulate chondrocyte-specific gene expression via association with Sox9. *J. Biol. Chem.* 278, 27224–27229.

Ulsamer, A., Ortuno, M.J., Ruiz, S., Susperregui, A.R.G., Osses, N., Rosa, J.L., and Ventura, F. (2008). BMP-2 Induces Osterix Expression through Up-regulation of Dlx5 and Its Phosphorylation by p38. *J. Biol. Chem.* 283, 3816–3826.

Ushita, M., Saito, T., Ikeda, T., Yano, F., Higashikawa, A., Ogata, N., Chung, U., Nakamura, K., and Kawaguchi, H. (2009). Transcriptional induction of SOX9 by NF-kappaB family member RelA in chondrogenic cells. *Osteoarthr. Cartil. OARS Osteoarthr. Res. Soc.* 17, 1065–1075.

Vaidyanathan, R., Taffet, S.M., Vikstrom, K.L., and Anumonwo, J.M.B. (2010). Regulation of Cardiac Inward Rectifier Potassium Current (IK1) by Synapse-associated Protein-97. *J. Biol. Chem.* 285, 28000–28009.

Vaidyanathan, R., Vega, A.L., Song, C., Zhou, Q., Tan, B., Berger, S., Makielski, J.C., and Eckhardt, L.L. (2013). The Interaction of Caveolin 3 Protein with the Potassium Inward Rectifier Channel Kir2.1: PHYSIOLOGY AND PATHOLOGY RELATED TO LONG QT SYNDROME 9 (LQT9). *J. Biol. Chem.* 288, 17472–17480.

Van der Rest, M. (1987). *Biologie du collagène et maladies héréditaires de la matrice extracellulaire.*

Vimalraj, S., Arumugam, B., Miranda, P.J., and Selvamurugan, N. (2015). Runx2: Structure, function, and phosphorylation in osteoblast differentiation. *Int. J. Biol. Macromol.* 78, 202–208.

Vladar, E.K., Antic, D., and Axelrod, J.D. (2009). Planar cell polarity signaling: the developing cell's compass. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a002964.

Wang, H.-R., Wu, M., Yu, H., Long, S., Stevens, A., Engers, D.W., Sackin, H., Daniels, J.S., Dawson, E.S., Hopkins, C.R., et al. (2011). Selective Inhibition of the Kir 2 Family of Inward Rectifier Potassium Channels by a Small Molecule Probe: The Discovery, SAR, and Pharmacological Characterization of ML133. *ACS Chem. Biol.* 6, 845–856.

Wang, Q., Stacy, T., Binder, M., Marin-Padilla, M., Sharpe, A.H., and Speck, N.A. (1996). Disruption of the *Cbfa2* gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 3444–3449.

Warren, L., Manos, P.D., Ahfeldt, T., Loh, Y.-H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P.K., Smith, Z.D., Meissner, A., et al. (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* *7*, 618–630.

Watanabe, S., Hirai, H., Asakura, Y., Tastad, C., Verma, M., Keller, C., Dutton, J.R., and Asakura, A. (2011). MyoD Gene Suppression by Oct4 Is Required for Reprogramming in Myoblasts to Produce Induced Pluripotent Stem Cells. *STEM CELLS* *29*, 505–516.

Wegner, M. (1999). From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res.* *27*, 1409–1420.

Wei, Z., Yang, Y., Zhang, P., Andrianakos, R., Hasegawa, K., Lyu, J., Chen, X., Bai, G., Liu, C., Pera, M., et al. (2009). Klf4 interacts directly with Oct4 and Sox2 to promote reprogramming. *Stem Cells Dayt. Ohio* *27*, 2969–2978.

Weidema, A.F., Dixon, S.J., and Sims, S.M. (2000). Electrophysiological characterization of ion channels in osteoclasts isolated from human deciduous teeth. *Bone* *27*, 5–11.

Wellman, G.C., and Bevan, J.A. (1995). Barium inhibits the endothelium-dependent component of flow but not acetylcholine-induced relaxation in isolated rabbit cerebral arteries. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *274*, 47–53.

Westbury, D.R. (1971). Electrical activity of the heart. *Br. Med. J.* *4*, 799–803.

van Wijnen, A.J., Stein, G.S., Gergen, J.P., Groner, Y., Hiebert, S.W., Ito, Y., Liu, P., Neil, J.C., Ohki, M., and Speck, N. (2004). Nomenclature for Runt-related (RUNX) proteins. *Oncogene* *23*, 4209–4210.

Wodarz, A., and Nusse, R. (1998). Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *14*, 59–88.

Wrana, J.L. (2000). Regulation of Smad Activity. *Cell* *100*, 189–192.

Wu, Q.Q., and Chen, Q. (2000). Mechanoregulation of chondrocyte proliferation, maturation, and hypertrophy: ion-channel dependent transduction of matrix deformation signals. *Exp. Cell Res.* *256*, 383–391.

Wu, S.C., and Zhang, Y. (2010). Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 607–620.



Wu, J.W., Hu, M., Chai, J., Seoane, J., Huse, M., Li, C., Rigotti, D.J., Kyin, S., Muir, T.W., Fairman, R., et al. (2001). Crystal structure of a phosphorylated Smad2. Recognition of phosphoserine by the MH2 domain and insights on Smad function in TGF-beta signaling. *Mol. Cell* 8, 1277–1289.

Xia, M., Jin, Q., Bendahhou, S., He, Y., Larroque, M.-M., Chen, Y., Zhou, Q., Yang, Y., Liu, Y., Liu, B., et al. (2005). A Kir2.1 gain-of-function mutation underlies familial atrial fibrillation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 332, 1012–1019.

Xu, J., Pope, S.D., Jazirehi, A.R., Attema, J.L., Papathanasiou, P., Watts, J.A., Zaret, K.S., Weissman, I.L., and Smale, S.T. (2007). Pioneer factor interactions and unmethylated CpG dinucleotides mark silent tissue-specific enhancers in embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 12377–12382.

Xu, Y., Shin, H.-G., Szép, S., and Lu, Z. (2009). Physical determinants of strong voltage sensitivity of K(+) channel block. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 1252–1258.

Xue, H., Wu, S., Papadeas, S.T., Spusta, S., Swistowska, A.M., MacArthur, C.C., Mattson, M.P., Maragakis, N.J., Capecchi, M.R., Rao, M.S., et al. (2009). A targeted neuroglial reporter line generated by homologous recombination in human embryonic stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 27, 1836–1846.

Yamada, M., and Kurachi, Y. (1995). Spermine gates inward-rectifying muscarinic but not ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels in rabbit atrial myocytes. Intracellular substance-mediated mechanism of inward rectification. *J. Biol. Chem.* 270, 9289–9294.

Yamanaka, S. (2009). A Fresh Look at iPS Cells. *Cell* 137, 13–17.

Yang, X.-J. (2004). The diverse superfamily of lysine acetyltransferases and their roles in leukemia and other diseases. *Nucleic Acids Res.* 32, 959–976.

Yang, F., Tang, W., So, S., de Crombrughe, B., and Zhang, C. (2010). Sclerostin is a direct target of osteoblast-specific transcription factor osterix. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 400, 684–688.

Yang, J., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (1995). Determination of the subunit stoichiometry of an inwardly rectifying potassium channel. *Neuron* 15, 1441–1447.

Yang, Y.M., Gupta, S.K., Kim, K.J., Powers, B.E., Cerqueira, A., Wainger, B.J., Ngo, H.D., Rosowski, K.A., Schein, P.A., Ackeifi, C.A., et al. (2013). A small molecule screen in stem-cell-derived motor neurons identifies a kinase inhibitor as a candidate therapeutic for ALS. *Cell Stem Cell* 12, 713–726.

Yazawa, M., and Dolmetsch, R.E. (2013). Modeling Timothy syndrome with iPS cells. *J Cardiovasc. Transl. Res.* 6, 1–9.

Yi, S.E., Daluiski, A., Pederson, R., Rosen, V., and Lyons, K.M. (2000). The type I BMP receptor BMPRII is required for chondrogenesis in the mouse limb. *Dev. Camb. Engl.* 127, 621–630.

Yoon, G., Oberoi, S., Tristani-Firouzi, M., Etheridge, S.P., Quitania, L., Kramer, J.H., Miller, B.L., Fu, Y.H., and Ptáček, L.J. (2006). Andersen-Tawil syndrome: prospective cohort analysis and expansion of the phenotype. *Am. J. Med. Genet. A.* 140, 312–321.

Yoshida, C.A., Komori, H., Maruyama, Z., Miyazaki, T., Kawasaki, K., Furuichi, T., Fukuyama, R., Mori, M., Yamana, K., Nakamura, K., et al. (2012). SP7 inhibits osteoblast differentiation at a late stage in mice. *PloS One* 7, e32364.

Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., et al. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917–1920.

Yusa, K., Rashid, S.T., Strick-Marchand, H., Varela, I., Liu, P.-Q., Paschon, D.E., Miranda, E., Ordóñez, A., Hannan, N.R.F., Rouhani, F.J., et al. (2011). Targeted gene correction of  $\alpha$ 1-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. *Nature* 478, 391–394.

Zambotti, A., Makhluf, H., Shen, J., and Ducy, P. (2002). Characterization of an osteoblast-specific enhancer element in the CBFA1 gene. *J. Biol. Chem.* 277, 41497–41506.

Zaret, K.S., and Carroll, J.S. (2011). Pioneer transcription factors: establishing competence for gene expression. *Genes Dev.* 25, 2227–2241.

Zaritsky, J.J., Eckman, D.M., Wellman, G.C., Nelson, M.T., and Schwarz, T.L. (2000). Targeted Disruption of Kir2.1 and Kir2.2 Genes Reveals the Essential Role of the Inwardly Rectifying K<sup>+</sup> Current in K<sup>+</sup>-Mediated Vasodilation. *Circ. Res.* 87, 160–166.

Zaritsky, J.J., Redell, J.B., Tempel, B.L., and Schwarz, T.L. (2001). The consequences of disrupting cardiac inwardly rectifying K<sup>+</sup> current (I<sub>K1</sub>) as revealed by the targeted deletion of the murine Kir2.1 and Kir2.2 genes. *J. Physiol.* 533, 697–710.

Zelzer, E., and Olsen, B.R. (2003). The genetic basis for skeletal diseases. *Nature* 423, 343–348.

Zelzer, E., Glotzer, D.J., Hartmann, C., Thomas, D., Fukai, N., Soker, S., and Olsen, B.R. (2001). Tissue specific regulation of VEGF expression during bone development requires Cbfa1/Runx2. *Mech. Dev.* 106, 97–106.

Zerangue, N., Schwappach, B., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (1999). A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels. *Neuron* 22, 537–548.

Zhang, C. (2012). Molecular mechanisms of osteoblast-specific transcription factor Osterix effect on bone formation. *Beijing Da Xue Xue Bao* 44, 659–665.

Zhang, L. (2005). Electrocardiographic Features in Andersen-Tawil Syndrome Patients With KCNJ2 Mutations: Characteristic T-U-Wave Patterns Predict the KCNJ2 Genotype. *Circulation* 111, 2720–2726.

Zhang, C., Cho, K., Huang, Y., Lyons, J.P., Zhou, X., Sinha, K., McCrea, P.D., and de Crombrughe, B. (2008). Inhibition of Wnt signaling by the osteoblast-specific transcription factor Osterix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 6936–6941.

Zhang, C., Dai, H., and de Crombrughe, B. (2012). Characterization of Dkk1 gene regulation by the osteoblast-specific transcription factor Osx. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 420, 782–786.

Zhao, M., Qiao, M., Oyajobi, B.O., Mundy, G.R., and Chen, D. (2003). E3 Ubiquitin Ligase Smurf1 Mediates Core-binding Factor  $\alpha$ 1/Runx2 Degradation and Plays A Specific Role in Osteoblast Differentiation. *J. Biol. Chem.* 278, 27939–27944.

Zhao, M., Qiao, M., Harris, S.E., Oyajobi, B.O., Mundy, G.R., and Chen, D. (2004). Smurf1 Inhibits Osteoblast Differentiation and Bone Formation in Vitro and in Vivo. *J. Biol. Chem.* 279, 12854–12859.

Zhao, W., Ji, X., Zhang, F., Li, L., and Ma, L. (2012). Embryonic Stem Cell Markers. *Molecules* 17, 6196–6236.

Zhao, X., Li, W., Lv, Z., Liu, L., Tong, M., Hai, T., Hao, J., Guo, C., Ma, Q., Wang, L., et al. (2009). iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature* 461, 86–90.

Zhou, G., Lefebvre, V., Zhang, Z., Eberspaecher, H., and Crombrughe, B. de (1998). Three High Mobility Group-like Sequences within a 48-Base Pair Enhancer of the Col2a1 Gene Are Required for Cartilage-specific Expression in Vivo. *J. Biol. Chem.* 273, 14989–14997.

Zhou, G., Zheng, Q., Engin, F., Munivez, E., Chen, Y., Sebald, E., Krakow, D., and Lee, B. (2006). Dominance of SOX9 function over RUNX2 during skeletogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 19004–19009.

- Zhou, H., Wu, S., Joo, J.Y., Zhu, S., Han, D.W., Lin, T., Trauger, S., Bien, G., Yao, S., Zhu, Y., et al. (2009). Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 4, 381–384.
- Zhou, Y., Wong, C.-O., Cho, K., van der Hoeven, D., Liang, H., Thakur, D.P., Luo, J., Babic, M., Zinsmaier, K.E., Zhu, M.X., et al. (2015). SIGNAL TRANSDUCTION. Membrane potential modulates plasma membrane phospholipid dynamics and K-Ras signaling. *Science* 349, 873–876.
- Zhu, S., Li, W., Zhou, H., Wei, W., Ambasudhan, R., Lin, T., Kim, J., Zhang, K., and Ding, S. (2010). Reprogramming of human primary somatic cells by OCT4 and chemical compounds. *Cell Stem Cell* 7, 651–655.
- Zuzarte-Luis, V., and Hurle, J.M. (2005). Programmed cell death in the embryonic vertebrate limb. *Semin. Cell Dev. Biol.* 16, 261–269.
- Zwaka, T.P., and Thomson, J.A. (2003). Homologous recombination in human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 21, 319–321.