



**HAL**  
open science

# Modélisation des atteintes neurologiques du syndrome de Wolfram de type 1 : exploitation des cellules souches pluripotentes induites et de leurs dérivés

Axel Sciauvaud

► **To cite this version:**

Axel Sciauvaud. Modélisation des atteintes neurologiques du syndrome de Wolfram de type 1 : exploitation des cellules souches pluripotentes induites et de leurs dérivés. Physiologie [q-bio.TO]. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UPASQ034 . tel-03917165

**HAL Id: tel-03917165**

**<https://theses.hal.science/tel-03917165v1>**

Submitted on 1 Jan 2023

**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.

Modélisation des atteintes neurologiques  
du syndrome de Wolfram de type 1 :  
exploitation des cellules souches  
pluripotentes induites et de leurs dérivés

*Modeling neurological damage in Wolfram syndrome type 1 : exploitation  
of induced pluripotent stem cells and their derivatives*

**Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay**

École doctorale n°569, Innovation thérapeutique du fondamental à l'appliqué (ITFA)  
Spécialité de doctorat : Physiologie et physiopathologie  
Graduate School : Santé et médicaments  
Référent : Université d'Evry Val d'Essonne

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Institut des Cellules souches pour le  
traitement et l'étude des maladies monogéniques  
(Université Paris-Saclay, Inserm, Univ Evry)**

sous la direction de **Marc PESCHANSKI**, Directeur Scientifique,  
la co-direction de **Laetitia AUBRY**, Maître de Conférences des Universités

**Thèse soutenue à Corbeil-Essonnes, le 05 septembre 2022, par**

**Axel SCIAUVAUD**

**Composition du Jury**

<b>Bruno COLOMBO</b> PR, Université d'Evry Val d'Essonne	Président
<b>Benjamin DELPRAT</b> CR, INSERM UMR-S 1198, Université de Montpellier	Rapporteur & Examineur
<b>Claire LEGAY</b> PR, CNRS UMR 8003, Université Paris Cité	Rapporteuse & Examinatrice
<b>Malgorzata RAK</b> CR, INSERM UMR 1141, Université Paris-Diderot	Examinatrice
<b>Marc PESCHANSKI</b> Directeur Scientifique, CECS/I-STEM, AFM	Directeur de thèse



**Titre :** Modélisation des atteintes neurologiques du syndrome de Wolfram de type 1 : exploitation des cellules souches pluripotentes induites et de leurs dérivés

**Mots clés :** Cellules souches induites à la pluripotence, syndrome de Wolfram de type 1, maladie neurodégénérative, neurones corticaux, wolframine, guidage axonal

**Résumé :** Le syndrome de Wolfram de type 1 (SW1) est une maladie neurodégénérative autosomique récessive rare caractérisée par l'association de quatre symptômes principaux : un diabète insipide (DI), un diabète sucré insulino-dépendant (DM), une atrophie optique (OA) et une surdité (D). D'autres atteintes apparaissent avec le temps dont des complications neurologiques variées principalement associées à une atrophie du cervelet et du tronc cérébral. Récemment, plusieurs études réalisées par IRM sur de jeunes patients ont mis en évidence la présence d'atteintes précoces majeures dont une diminution du volume cérébral et une hypomyélinisation. Ces résultats ont soulevé la nécessité de requalifier le syndrome non seulement en maladie neurodégénérative mais également en maladie neurodéveloppementale. La maladie, d'évolution lente, progresse généralement vers un décès précoce, le plus souvent dû à une détresse respiratoire consécutive aux atteintes neurologiques. A ce jour, aucun traitement curatif n'existe et les patients décèdent généralement avant 40 ans. Le SW1 est causé par des mutations au sein du gène WFS1 qui code pour une protéine située à la membrane du réticulum endoplasmique, la wolframine. L'élaboration de modèles cellulaires et animaux de la pathologie a permis d'identifier certains rôles physiologiques de la protéine. Ainsi, une augmentation de l'activation de la réponse aux protéines mal repliées (UPR), des défauts de l'homéostasie calcique, ou encore un dysfonctionnement des mitochondries, lié aux membranes associées aux mitochondries (MAMs), ont été identifiés. Principalement observés dans les atteintes pancréatiques, ces mécanismes restent à ce jour peu étudiés dans le contexte des atteintes neurologiques. Cela peut s'expliquer par la complexité et les limites liées à la mise en place d'un modèle neurologique génétiquement et physiologiquement proche des patients. Ainsi, l'objectif de ma thèse a consisté à exploiter les propriétés uniques des cellules souches pluripotentes induites (CSPi) dans le but de développer un modèle cellulaire humain pour étudier les atteintes neurologiques observées chez les patients. Par cette approche, nous sommes parvenus à générer, à partir de CSPi contrôles et de CSPi issues de patients, les cellules d'intérêt, à savoir des cellules souches neurales (NSC) et des neurones corticaux. Puis, nous avons étudié les conséquences de la perte de wolframine au cours de la différenciation neuronale, et avons ainsi pu identifier un défaut neurodéveloppemental encore méconnu à ce jour. Ce défaut se traduit par une altération de la pousse neuritique et l'apparition de fasciculations axonales anormalement épaisses au cours du développement des neurones issus de CSPi mutées. Cette altération de la pousse neuritique a été corrélée à l'absence de la protéine grâce à l'utilisation d'une lignée rescue. Des analyses transcriptomiques ont permis de mettre en évidence dans les NSC et les neurones corticaux

une dérégulation de gènes connus pour être impliqués dans la neurogenèse, le développement du système nerveux et le guidage axonal. En étudiant les mécanismes à l'origine de ce réseau neuronal anormal, nous avons pu identifier l'implication de la voie ATF6 $\alpha$  de l'UPR. Enfin, l'effet potentiel de plusieurs molécules actuellement en essai clinique a également été évalué. Nous avons mis en évidence que, parmi toutes ces molécules, seul l'acide valproïque (VPA) permettait de prévenir l'apparition du phénotype. L'utilisation de cette molécule antiépileptique a également permis de corriger certains défauts d'expression génique dans les neurones mutés. Ces résultats ont contribué au lancement d'un nouvel essai clinique dans le cadre du SW1. Pour conclure, ces travaux ont permis l'élaboration d'un nouveau modèle à partir de cellules de patients ainsi que l'identification d'un défaut de pousse neuritique renforçant l'hypothèse d'une composante neurodéveloppementale dans le syndrome de Wolfram de type 1.

**Title :** Modeling neurological damage in Wolfram syndrome type 1: exploitation of induced pluripotent stem cells and their derivatives

**Keywords :** Induced pluripotent stem cells, Wolfram syndrome type 1, neurodegenerative disease, cortical neurons, wolframin, axon guidance

**Abstract :** Wolfram syndrome type 1 (WS1) is a rare autosomal recessive neurodegenerative disorder characterized by a combination of devastating clinical symptoms, namely : diabetes insipidus (DI), insulin-dependent diabetes mellitus (DM), optic atrophy (OA) and deafness (D), also known as DIDMOAD. Other impairments appear over time including various neurological complications, frequently causing premature death of patients around 40 years old, usually due to respiratory failure induced by brainstem atrophy. To date, and despite scientific advances, there is no cure. Recently, several MRI studies of young patients have shown important early damage including an overall reduction of brain volume and hypomyelination. These findings pointed out the need to reconsider the syndrome not only as a neurodegenerative disease but also as a neurodevelopmental disorder. Wolfram syndrome type 1 is caused by mutations in the WFS1 gene which encodes a protein located in the endoplasmic reticulum membrane, wolframin. The development of cellular and animal models of the disease has identified certain physiological roles for the protein. Thus, an increase in the activation of the unfolded protein response (UPR) and defects in calcium homeostasis have been described in its absence. Recently, the localization of the protein to mitochondria-associated membranes (MAMs) and mitochondrial defects have been described. These mechanisms were mainly observed in pancreatic  $\beta$  cells, but to date they have not been studied in the context of neurological impairments. This can be explained by the complexity regarding the development of a neurological model genetically and physiologically relevant. Thus, the objective of my thesis was to exploit the unique properties of induced pluripotent stem cells (iPSCs) in order to develop a human cellular model to study neurological damage reported in patients. Using this approach, we

were able to generate the cells of interest, neural stem cells (NSC) and cortical neurons. Then, we analyzed the consequences of wolframin loss for the neuronal differentiation process and identified, in neurons derived from patient's iPSC lines, a yet unknown major neurodevelopmental defect. This defect is characterized by an alteration of neuritic outgrowth with increased neuritic bundling. It was correlated to the absence of the protein thanks to the use of a WS iPSC rescue line. Transcriptomic analyses revealed the deregulation of genes known to be involved in neurogenesis, nervous system development and axonal guidance. By studying the mechanisms underlying this abnormal neuronal network, we were able to identify the involvement of the ATF6 $\alpha$  pathway of the UPR. Finally, the potential effect of several molecules currently in clinical trials was also evaluated. We found that, among all these molecules, only valproic acid (VPA) prevented the appearance of the phenotype. The use of this anti-epileptic molecule also allowed the correction of the expression of several genes in the mutated neurons. These results contributed to the launch of a clinical trial in WS1 patient complementary to the Treatwolfram one. In conclusion, this work has allowed the development of a new model using patient cells and the identification of a neuritic growth defect strengthening the hypothesis of a neurodevelopmental component in Wolfram syndrome.



*« À la naissance, on monte dans le train et on rencontre nos parents.  
Et on croit qu'ils voyageront toujours avec nous.  
Pourtant, à une station, nos parents descendront du train,  
nous laissant seuls continuer le voyage...*

*Au fur et à mesure que le temps passe,  
d'autres personnes montent dans le train.  
Et elles seront importantes : notre fratrie, nos amis, nos enfants,  
même l'amour de notre vie.*

*Beaucoup démissionneront (même éventuellement l'amour de notre vie),  
et laisseront un vide plus ou moins grand.  
D'autres seront si discrets  
qu'on ne réalisera pas qu'ils ont quitté leurs sièges.*

*Ce voyage en train sera plein de joies, de peines, d'attentes,  
de bonjours, d'au-revoirs et d'adieux.  
Le succès est d'avoir de bonnes relations avec tous les passagers  
pourvu qu'on donne le meilleur de nous-mêmes.*

*On ne sait pas à quelle station nous descendrons,  
donc vivons heureux, aimons et pardonnons.  
Il est important de le faire car lorsque nous descendrons du train,  
nous ne devons laisser que de beaux souvenirs à ceux qui continueront leur voyage.*

*Soyons heureux avec ce que nous avons et remercions le ciel de ce voyage fantas-  
tique.*

*Aussi, merci d'être un des passagers de mon train.  
Et si je dois descendre à la prochaine station,  
je suis content d'avoir fait un bout de chemin avec vous. »*

Jean d'Ormesson, *L'enfant qui attendait un train*

Je dédie ce mémoire à une passagère particulière du train de ma vie. Merci à toi, Jackie, d'avoir fait partie des passagers extraordinaires de mon train. Te rencontrer a été un réel honneur.



## REMERCIEMENTS

Après une rédaction plus que douloureuse et fastidieuse, j'avais l'illusion que cette partie allait être bien plus simple et que je souffrirai moins du syndrome de « la page blanche », et pourtant... Trouver les mots sincères et justes pour chaque personne n'est pas si aisé. Mais c'est le moment pour moi de prendre du recul sur tout ce travail accompli depuis le début de cette grande aventure qu'est la thèse. Pas moins de 1266 jours se sont écoulés entre mon premier jour de thèse et le jour tant attendu de la soutenance. Cette expérience incroyable aura été riche en aventures, en expériences mais aussi de rencontres. Sans oublier une pandémie. Ces quelques pages sont dédiées aux personnes qui « sont montées dans mon train », certaines depuis toujours, d'autres depuis peu. Certaines sont bien installées et ne risquent pas de descendre et d'autres sont parties. Mais elles ont toutes contribué à la personne et au scientifique que je suis aujourd'hui.

### *Aux membres de mon jury,*

Pr Bruno Colombo, Pr Claire Legay, Dr Benjamin Delprat et Dr Malgorzata Rak, vous m'avez fait le plaisir d'accepter de participer à mon jury de thèse et d'évaluer mon travail. Je tiens à vous remercier sincèrement pour le temps que vous avez consacré à la lecture de ce mémoire et l'honneur que vous m'avez fait.

### *A l'association française du syndrome de Wolfram,*

Mon doctorat a été mené dans le cadre d'un dispositif Cifre et n'aurait pu être possible sans le soutien et le financement de l'association française du syndrome de Wolfram. Je tiens à vous remercier pour la confiance et l'appui dont vous avez fait preuve à mon égard. La force et la détermination dont votre association de patients et de parents fait preuve au quotidien n'ont cessé de susciter chez moi de l'admiration. Nolwen, je tiens à te remercier particulièrement pour toute la gentillesse et la bienveillance que tu as eues envers moi. La réalisation de mon doctorat dans ce contexte a été un réel moteur dans mes recherches mais aussi ma vie personnelle. Le combat que vous menez face à la maladie a permis des avancées majeures dans la pose de diagnostic, la prise en charge des patients et le lancement d'essais cliniques. Merci de m'avoir fait l'honneur d'être l'un de vos combattants.

### *A mes directeurs de thèse,*

Au Dr Marc Peschanski,

Tu m'as fait le privilège d'être ton thésard (et peut-être même le dernier) ! Je m'estime extrêmement chanceux d'avoir été sous ta direction pendant ces quelques années. Merci pour les échanges scientifiques riches et stimulants et d'avoir pris le relais pendant le congé maternité de Laetitia. Même si je pense que j'ai eu un bon pic de

cortisol ! Merci de m'avoir poussé, challengé et d'avoir cru en moi.

Au Dr Laetitia Aubry,

Voilà, une bonne chose de faite ! Ces quelques années à tes côtés auront été très riches, je dirais même qu'elles auront été « magnifiques de beauté ». Un article publié, des collaborations, un bébé et puis finalement cette thèse. Que d'évènements ! Et pourtant, j'ai l'impression que ces quelques années sont passées en un battement de cils. Ils sont bien loin les cours de L3. Je ne pourrai jamais assez te remercier d'avoir fait partie des gens qui ont cru en moi et qui m'ont encouragé. Je sais que si j'en suis là aujourd'hui c'est parce que tu y as mis ta pierre. Je dirai même que tu as mis de sacrées fondations. Cette aventure était une grande nouveauté pour nous deux. Merci d'avoir fait de moi ton premier thésard et j'espère que cette expérience ne t'a pas refroidie ! Je pense qu'on a beaucoup appris chacun de cette expérience unique qu'est la thèse, j'ai gagné en autonomie et assurance. Merci d'être une cheffe remplie de qualités humaines nombreuses et incroyables, d'avoir été à mon écoute et de m'avoir aidé dans les moments compliqués que la vie a mis sur mon passage. Alors du fond du cœur, je te remercie, pour tout.

*A mon binôme de choc,*

Oui, tu mérites au moins un paragraphe pour toi toute seule ! Sandra Pourtoy-Brasselet, tu es une collègue incroyable. Tu remarqueras que je n'emploie pas le passé. Que d'aventures... Ces années à tes côtés ont été tout simplement géniales. Je me souviens encore de notre rencontre et du « c'est toi Axel ? », tu parles d'une première rencontre ! Même si je sais que les débuts n'ont pas été faciles, j'ai énormément progressé à tes côtés. Je pense que notre binôme m'a apporté un réel équilibre et qu'on fonctionnait très bien parce qu'on est complémentaires. Au-delà d'un papier en co-premiers auteurs, de nombreux souvenirs remontent au moment où j'écris ces lignes. Tous les téléthons, le broyage des poissons zèbres, le lancement des organoïdes et toutes ces heures en culture à tes côtés à te poser plein de questions (que tu adores) ! En plus d'être une collègue remplie de qualités, tu as été un réel pilier pendant mon doctorat, toujours prête à me suivre dans des aventures parfois très incertaines. Cette thèse n'aurait tout simplement pas été la même si tu n'avais pas été là. Je tiens donc à te remercier pour tous ces moments incroyables partagés, la confiance que tu m'as accordée et j'espère de tout cœur avoir la chance de retravailler avec toi un jour.

*A mon jeune Padawan,*

Tatiana, je tiens à te remercier d'avoir été une stagiaire aussi incroyable que nous. Tu n'imagines pas la fierté que j'ai en voyant qu'on ne t'a pas dégoûté de la science (si c'est que de la thèse ça va). Je suis surtout heureux d'avoir été témoin de ton incroyable progression et de voir la super scientifique que tu deviens. Ah et : merci d'avoir pris le relai de ma super responsabilité au sein du laboratoire (bonne chance !).

### *A notre équipe d'adoption, l'équipe Motoneurones*

Merci de nous avoir accepté parmi vous ! Le soutien et les échanges scientifiques partagés ont été riches et agréables. Cécile, je tiens à te remercier pour ton aide et ta disponibilité. T'avoir à nos côtés pour tout ce travail a été une réelle chance. Sandrine, merci pour les discussions scientifiques enrichissantes et surtout pour ta gentillesse. Je te remercie également pour ton sens de l'humour qui est assez subtil pour être mentionné ! Florine, on a accompli beaucoup de chemin depuis le début de notre M2... Ta douceur et ta bonne humeur font chaud au cœur (sûrement les ondes du sud). Bonne chance pour la suite et on se donne rendez-vous dans le sud ? Judith, ton arrivée en cours de route a été une super surprise ! Même si la période COVID n'était pas la meilleure. Merci pour toutes nos discussions et ta bienveillance. Je ne suis pas certain que tu parviennes à me convaincre de devenir MCU, mais à défaut, nos échanges autour de nos « perles d'élèves » m'auront bien fait rire ! Et enfin Azania, le petit démon de l'équipe (ce sont mes remerciements donc je peux écrire ce que je veux !). C'est simple, depuis ton arrivée, lancer des différenciations d'organoïdes n'a plus la même saveur. Plus sérieusement, je te remercie pour ta gentillesse et les petites attentions que tu as eu à mon égard. Je te souhaite bonne chance pour la suite et j'ai hâte de voir où le vent va te mener (Mme Impact Factor 30).

Mes pensées vont aussi aux anciens thésards de l'équipe avec qui j'ai partagé de nombreuses heures de culture : Julie, Antoine et Camille. Merci pour votre aide et votre soutien dans les moments de galère de la thèse.

### *A ma deuxième famille : les ISTEMiens,*

On ne va pas se mentir, je vous ai plus vu ces dernières années que ma propre famille. Vous êtes ma deuxième famille. Au cours de ces quelques années à vos côtés, j'ai eu la chance d'échanger et parfois même de travailler avec bon nombre d'entre vous !

I-STEM est un laboratoire particulièrement stimulant et riche en expertises. Je tiens à remercier chaleureusement les nombreuses plateformes (HCS, HTS, NGS, Bioproduction et Biologie Cellulaire) pour tout le support et l'aide que vous nous avez apporté. C'est une chance incroyable d'avoir accès à autant de plateformes sans avoir à sortir d'un bâtiment et surtout de manière aussi accessible. Les résultats que nous avons obtenus pendant ces quelques années l'ont été grâce à votre aide.

Jérôme tu as été un soutien de taille face aux nombreuses difficultés rencontrées avec notre phénotype ! Que ce soit sur le développement d'approche automatisée de quantification de la fasciculation ou le lancement d'une acquisition de flux calcique totalement improvisée, tu as toujours répondu présent, et avec le sourire en plus ! Merci pour toute la pédagogie dont tu as fait preuve.

Johana, tu sais à quel point je regrette de ne pas avoir travaillé avec toi autant que je

l'aurais souhaité. Les quelques manipulations avec toi ont été géniales et il ne me manque que le temps pour prolonger ce plaisir. Je te souhaite bon courage pour cette aventure qu'est la thèse (il paraît que parfois c'est sympa !).

Margot, je tiens à te remercier pour toute ton expertise et surtout pour le temps que tu m'as consacré afin de m'expliquer le séquençage. J'ai eu la chance d'assister à ta progression constante et impressionnante et je te souhaite bonne chance pour ta thèse. J'ai hâte de partager un kebab avec toi pour fêter ton doctorat !

Laure, soyons honnêtes, ma thèse aurait été bien moins fun sans nos échanges de super « mêmes ». Nos discussions, mais surtout nos mots d'amour vont me manquer ! Je te remercie pour ton aide, mais aussi pour ton soutien. Alors, à quand notre bière ?

Karine, merci infiniment ! Que ce soit dans le cadre du travail, pour le téléthon ou même pour la vie perso, merci de m'avoir tant aidé. Merci également de m'avoir logé et d'avoir partagé ton rhum ! Sans oublier M. Jean-Eudes qui je pense, s'il le pouvait, mettrait 5 étoiles à sa maison de vacances.

Céline L, rien qu'en te regardant j'avais le sourire ! Je tiens à te remercier de toujours m'avoir suivi dans des manips bancales, peu organisées et pas très prometteuses (je suis honnête). Merci pour ton aide et surtout ta bonne humeur, ça donne presque envie de retravailler avec toi ! Merci pour ces bons moments de rigolade partagés autour des machines.

Lise, je voudrais te remercier pour toutes nos discussions partagées. Que ce soit autour d'un café ou pendant nos nombreux trajets covoit, merci pour ton écoute et tes conseils. J'ai hâte de voir où tu seras dans quelques années et surtout si tu recours comme une gazelle !

Léa, ta gentillesse va beaucoup me manquer. On le sait, nos vies se ressemblent sur bien des points et je pense que cela a joué sur le lien si particulier que l'on a. Je te remercie pour tout ce que tu as fait pour moi et pour toutes nos discussions partagées, que ce soit sur l'organisation d'un blocus à des sujets bien plus intimes. Je te souhaite tout le bonheur que tu mérites et qui sait, on se retrouvera peut-être dans quelques années dans un coin perdu de la France à élever des chèvres ? Chiche ?

Claire, la douceur à l'état pur. Merci pour ta gentillesse et ton enthousiasme débordant quand j'avais besoin de ton aide !

Alex P, tu le sais, la soirée teambulding de mon premier séminaire restera à jamais gravée dans ma mémoire ! Merci pour nos discussions, tout l'aide que tu m'as apportée et surtout nos bons fous rires !

Eren, le plus français des Turcs ! Ça c'est sûr, j'ai eu mal aux joues de nombreuses fois à force de rigoler avec toi ! Tu fais partie de ces personnes solaires qu'on voudrait avoir

auprès de nous tous les jours. Merci pour les glaces partagées et pour toutes tes attentions envers moi.

Marie, ma super voisine de bureau ! On aura été assez studieux, dans l'ensemble... Je te souhaite bon courage pour tes derniers mois de thèse !

Walter, je n'aurai pas beaucoup progressé en italien grâce à toi ! Ce n'est que partie remise. Merci pour ces quelques années à tes côtés.

Sabrina, copine de galère. Ces quelques années à tes côtés étaient bien sympathiques ! On aura bien rigolé et discuté. Je ne peux que te dire de croire en toi et te souhaiter bonne chance pour la fin, tu vas y arriver !

Hélène, je te remercie pour toute la bienveillance que tu as eue envers moi et surtout toute l'énergie que tu as fourni pour que je comprenne mieux la bio-informatique. Merci pour les analyses que tu as réalisées pour moi, juste dans le cadre de ma « curiosité scientifique » !

Lina, merci pour toutes les analyses que tu as réalisées pour nous ! Nos discussions ont toujours été orientées vers les voyages et les vacances, de quoi me faire rêver un peu pendant ma thèse, merci !

A l'équipe anciennement LGMD, Manon, Lucille, Émilie, Lucile, Céline Br, Noëlla, je vous remercie d'avoir partagé mon quotidien, depuis mon premier jour à I-STEM pour certaines ! Merci pour toutes ces discussions partagées autour des déjeuners.

A l'équipe Génodermatoses, Manoubia, Jennifer, Annabelle, Sophie, Christine et Nathalie, je vous remercie pour votre gentillesse et votre soutien depuis mon arrivée.

Au reste des membres de l'équipe Rétinopathies, Karim, Élise, Elie, Camille et Christelle, je vous remercie pour votre aide et votre écoute. Bon courage aux thésards de l'équipe, attention Karim, ils sont deux, tu es tout seul !

Arnaud et Stéphanie, un binôme de choc ! Merci infiniment pour tout ce que vous faites pour nous au quotidien.

Enfin, merci à toutes ces personnes qui ont fait partie de mon quotidien, Julien, Adeline, Alex B, Thifaine, Pauline, Céline Bo, Olivier, Michel, Manue, Xavier, Pascal.

Finalement, je n'oublie pas les anciens, une pensée particulière pour l'équipe HD qui a déménagé. Axelle, Morgane, Simona, Marie, merci d'avoir partagé mes premiers mois de thèse dans le secteur 7.

Donya, tu auras été une voisine de bureau incroyable. Merci d'être une personne aussi géniale, de te lancer dans des défis gâteau de la taille d'une table avec moi et de

prendre mes questions farfelues au sérieux (on aura au moins appris qu'un ongle de main pousse en moyenne de 3 mm par mois !).

Julia, je me souviendrai toute ma vie de la plaque 384 puits que tu m'as fait fixer, laver puis re-laver et enfin re-re-laver à la main avec une pipette monocanal pour mon premier jour de stage. Ce premier stage à I-STEM à tes côtés est un super souvenir ainsi que tous les moments extérieurs partagés et nos discussions. Merci d'avoir rendu cette expérience aussi géniale.

Alexandre, je te remercie pour toute la pédagogie dont tu as fait preuve à mon égard vis-à-vis des robots. Bon pour ton humour plus que douteux, je ne suis pas sûr de vouloir te remercier !

Aurélie, merci pour ta gentillesse et ta bonne humeur. Ta présence à I-STEM était une magnifique période.

La meilleure pour la fin, Juliette ma collègue BFF. Je ne te remercierai jamais assez pour l'aide et le soutien que tu m'as apporté. Que ce soit à I-STEM pour des manips ou pour la lecture de ce mémoire, tu as toujours été présente. Merci infiniment. Nos discussions et les heures de culture partagées en Secteur 7 sont de magnifiques souvenirs pour moi. Merci de continuer de faire partie de ma vie depuis ton départ après ta thèse.

### *A nos collaborateurs,*

Cette thèse au sein d'I-STEM aura aussi été synonyme d'aventures au-delà des frontières ! Dans le cadre d'une collaboration avec le Pr Barrett, j'ai eu la chance de partir plusieurs semaines à l'Université de Birmingham. Malheureusement écourtée (merci la COVID), cette collaboration aura été extrêmement enrichissante pour moi. Je tiens à remercier chaleureusement le Pr Barret, le Dr Zatyka ainsi que le Dr Sarkar de m'avoir accueilli et de m'avoir tant fait progresser.

Je tiens également à remercier le Dr Rak ainsi que son équipe pour leur temps et leur expertise. Dédicace à Pierrot avec qui j'ai eu le plaisir d'échanger lors de mes visites répétées au laboratoire. Gosia, je tiens à te remercier chaleureusement d'avoir pris de ton temps pour m'expliquer les expériences et de m'avoir guidé. Merci également pour nos discussions passionnantes que seuls des impératifs pouvaient stopper.

### *A ces femmes qui ont cru en moi,*

Qui n'a pas rêvé d'avoir un jour un professeur qui bouleverse notre vie et qui nous aide à trouver notre voie ? J'ai eu la chance d'avoir ce professeur. Je tiens à remercier Mme Wilczynski d'avoir cru en moi, de m'avoir épaulé, soutenu et surtout donné le goût de la science. Vous avoir au lycée a clairement impacté mon orientation et m'a permis de découvrir un domaine qui me passionne et au sein duquel je m'épanouis chaque jour. Merci d'avoir été ce professeur qui nous bouleverse, merci d'avoir été mon professeur.

J'ai ensuite rencontré sur ma route une ingénieure passionnée. Patricia, je te remercie infiniment de m'avoir tant enseigné lors de mon premier stage de BTS. Merci de m'avoir fait découvrir les cellules souches, leur beauté mais aussi leurs caprices. Finalement, après ce travail doctoral basé sur l'utilisation des CSPi, je pense que ton surnom de Mam's Cellules Souches était parfait.

Mes pensées s'adressent aussi au Dr Guenou et au Dr Mitjavila-Garcia qui m'ont pris sous leurs ailes en 2<sup>ème</sup> année de BTS. Je sais que si je suis arrivé à I-STEM c'est aussi grâce à vous. Merci !

### *A l'Afterteam,*

Villejuif 2015. Voilà, Anne-Charlotte, Mélanie, Vincent, Julien, Fanny, Alejandra, Ségolène, Olivier et Laura, ça fait déjà plus de 7 ans que nos chemins se sont croisés. Et croyez-moi, je ne suis pas peu fier de vous remercier dans mon mémoire de thèse, tout simplement parce que nos chemins ne se sont pas séparés. Repenser au début de l'Afterteam me ramène au jeune étudiant de BTS clairement perdu que j'étais et qui ne savait pas trop jusqu'où il voulait aller. Ça me ramène aussi aux thèses de certaines (soutenues avec brio depuis !), au congé maternité d'une autre et à des post-docs ! Que de souvenirs. Et on peut dire qu'on en a vécu des choses ensemble depuis toutes ces années. De mes collègues voire même responsables, vous êtes devenus des amis. Vous m'avez accompagné aussi bien dans mon évolution personnelle que professionnelle et je vous en remercie du fond du cœur. Les mots que je pourrais écrire dans ce paragraphe ne seront jamais assez forts pour dire à quel point vous avez bouleversé ma vie et surtout la place que vous y avez maintenant. Je vous propose donc de fêter la dernière thèse du groupe comme on le fait si bien : un After ?

### *A mes amis,*

#### *De l'université,*

Sarah, je commence par toi parce que sinon je suis sûr que tu vas râler ! Même si depuis que tu es retournée faire des potions dans ta Bretagne on se parle un peu moins, ça n'enlève rien au fait que tu es une amie qui m'a beaucoup soutenu depuis notre rencontre en L3, alors : merci !

Alexandrine, pour le coup pas la peine d'aller en Bretagne pour qu'on se parle moins, nos thèses respectives auront suffi ! Non blague à part, je te remercie de faire partie de mes amis. Te retrouver me fait toujours un bien fou, comme si on s'était quittés la veille. Je te souhaite bon courage pour la dernière ligne droite ! Tu vas y arriver et j'ai hâte de venir t'applaudir à ta soutenance ! T'es la prochaine !!

Émeline, on parle de la distance ? Non parce qu'en vrai, le fin fond de l'Allemagne... Je

tenais à te remercier pour tous les bons moments qu'on a partagés et surtout ton écoute. J'espère de tout mon cœur que tout va bien aller pour toi et pour l'objectif de carrière que tu souhaites !

*Du BTS,*

Un quatuor du tonnerre. Les années BTS ont été de loin les meilleures de mes études supérieures ! Je crois que j'ai rarement autant ri de ma vie. Et ça Noémie, Alexandra et Priscillia, c'est grâce à vous ! Je suis tellement fier de voir que malgré le temps qui passe, la distance entre nous, rien ne change. Merci d'être des amies incroyables sur qui je sais que je peux compter.

*Du Lycée,*

Alice, une des plus belles personnes que j'ai eu la chance de rencontrer. Merci d'être une amie de longue date sur qui je peux m'appuyer.

*Du collègue,*

Lucile, te retrouver après ces quelques années d'éloignement m'a fait extrêmement plaisir. Les moments partagés avec toi sont tout simplement apaisants et sincères. Merci d'être mon amie depuis maintenant plus de 10 ans.

*De l'école primaire,*

Non, je rigole !

***A ma famille et ma famille adoptive,***

Je pense que c'est le plus dur de tous les paragraphes.

Papa, merci d'avoir été et d'être un père aussi incroyable. Merci pour tout l'amour et le soutien que tu m'apportes depuis que je suis petit, aussi bien dans mes choix personnels que professionnels. J'ai une chance inouïe d'avoir une personne aussi aimante et altruiste que toi comme père. Ces années de doctorat n'ont pas toujours été simples mais même à l'autre bout de la France, tu as su être là. Merci. Merci aussi à Belle-maman Coco !

Mon Titi, à quand la TitiTower ? Merci pour toute la motivation et l'écoute dont tu as fait preuve à mon égard. Tu sais plus que qui conque à quel point cette dernière année a été compliquée pour moi et je te remercie infiniment d'avoir été présent pour moi. Je profite également de ces lignes pour t'écrire à quel point je suis fier de toi et de la personne que tu deviens ! Les années qui arrivent s'annoncent bien chargées mais quand tu seras en haut de ta tour tu pourras être fier de tout le chemin que tu as accompli. N'oublie jamais que ton grand frère sera toujours là pour toi.

Je tiens aussi à remercier ma sœur Laury, d'avoir été présente à ta manière malgré nos différences, merci pour tes mots d'encouragement et surtout tes expressions que seule toi comprend. Parce que le « t'es pas venu là pour boire l'eau des pâtes », je ne l'ai toujours pas comprise...

Merci également à ma mère pour son soutien et son écoute.

Fanfan, Gaëlle et Dany, merci de m'avoir accueilli et aidé lors de mon arrivée en région parisienne pour mes études. Merci également pour tous les événements survenus l'année dernière et qui m'ont permis de me rendre compte à quel point on peut être fort quand la vie ne nous laisse pas le choix.

Ma famille adoptive, merci de m'avoir accueilli et de m'avoir fait une place dans votre famille. Sophie, Cyril, Margaux, Elie, Zako mais aussi MamiGloo et Papi Charles, chaque instant à vos côtés sont remplis de vie et d'amour, ça fait du bien !

### *A mon binôme de vie,*

Laura, terminer par toi était un choix. Finalement au fil de ces lignes de remerciements j'ai eu beaucoup de souvenirs qui ont ressurgi et quoi de mieux que de terminer avec ceux qui font partie des plus beaux ? Ton arrivée dans ma vie a tout chamboulé et je ne dis pas ça parce qu'on était en pleine pandémie ! Je te l'ai déjà écrit mais tu es arrivée au meilleur moment, du moins le moment où j'en avais le plus besoin. Et avec tout ce qu'on a vécu et traversé en l'espace de deux ans, je ne peux qu'être fier de toi et de nous. Merci pour tout l'amour que tu me donnes au quotidien mais aussi pour tout le soutien, la patience et l'écoute dont tu fais preuve. Je sais que ces derniers mois ont été particulièrement éprouvants pour nous deux et je ne peux que te promettre de prendre le relai sur cette année si particulière qui arrive pour toi ! Je crois en toi, tu vas y arriver. Merci d'être une personne exceptionnelle et de faire partie de ma vie. Je t'aime fort comme les murs.

**Merci à chaque passager de mon train**



# TABLE DES MATIERES

INDEX DES FIGURES.....	21
ABREVIATIONS.....	23
INTRODUCTION.....	27
CHAPITRE 1 : LE SYNDROME DE WOLFRAM .....	29
I) <i>Présentation clinique du syndrome de Wolfram</i> .....	29
A) Généralités .....	29
B) Manifestations cliniques du syndrome de Wolfram de type 1.....	30
1) Diabète mellitus (diabète sucré) .....	30
2) L'atrophie optique.....	31
3) Diabète insipide.....	32
4) La surdité.....	33
5) Autres symptômes .....	34
6) Atteintes neurologiques.....	35
II) <i>�pid�miologie et génétique</i> .....	40
A) Prévalence du syndrome de Wolfram de type 1 .....	40
B) Gène associé au syndrome de Wolfram de type 1 : <i>WFS1</i> .....	40
C) Protéine cod�e par le gène <i>WFS1</i> .....	41
III) <i>Mécanismes et rôles physiologiques de la wolframine</i> .....	47
A) L' <i>Unfolded Protein Response (UPR)</i> et la wolframine.....	47
1) Généralités sur l'UPR.....	47
2) Relation entre l'UPR et la wolframine.....	51
B) L'homéostasie calcique .....	54
C) Wolframine, mitochondries et MAMs.....	58
D) Synthèse et sécrétion protéique .....	62
IV) <i>Modèles de la pathologie</i> .....	65
A) Les modèles cellulaires <i>in vitro</i> .....	65
B) Les modèles <i>in vivo</i> .....	67
V) <i>Stratégies thérapeutiques du syndrome de Wolfram de type 1</i> .....	68
CHAPITRE 2 : ÉTUDE DU SYSTEME NERVEUX .....	73
I) <i>Organisation du système nerveux humain</i> .....	73
A) Généralités .....	73
B) Mise en place du SN chez l'Homme .....	77
II) <i>Développement du cortex cérébral</i> .....	79
III) <i>Mise en place des connexions neuronales dans le SN</i> .....	83
A) Généralités .....	83
B) Molécules impliquées dans le guidage axonal .....	85
C) Le mécanisme de fasciculation axonale .....	91
IV) <i>Guidage axonal et pathologies neurologiques</i> .....	94
CHAPITRE 3 : LES CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES .....	97
I) <i>Les cellules souches : un outil précieux pour la recherche</i> .....	98
A) Cellules souches : définitions.....	98
B) Les cellules souches pluripotentes humaines : découvertes.....	99
1) Les cellules souches embryonnaires .....	99
2) Les cellules souches pluripotentes induites .....	101
II) <i>Les cellules souches pluripotentes : caractéristiques</i> .....	101
A) Induction à la pluripotence.....	101
1) Le transfert nucléaire .....	102
2) La fusion cellulaire.....	103
3) La reprogrammation induite .....	104
B) Les cellules souches pluripotentes induites .....	106
1) Le choix de la cellule pour la reprogrammation.....	106
2) Le choix des facteurs de transcription pour la reprogrammation.....	107
3) Méthodes de reprogrammation et vecteurs.....	108
4) Caractéristiques moléculaires et contrôle qualité des CSPi .....	110

C)	Potentiel de différenciation.....	112
III)	<i>Cellules souches pluripotentes et dérivés neuraux</i> .....	114
A)	Différenciation en progéniteurs neuraux.....	114
B)	Différenciation en neurones corticaux.....	118
IV)	<i>Médecine et recherche, quelle place pour les CSP ?</i> .....	119
A)	Modélisation pathologique et maladies neurologiques.....	120
B)	Élaboration de lignées isogéniques et rescues.....	123
C)	Le développement de médicaments .....	126
D)	La thérapie cellulaire .....	130
E)	Conclusion .....	132
	<b>PROBLEMATIQUE ET DEMARCHES EXPERIMENTALES .....</b>	<b>133</b>
	<b>RESULTATS.....</b>	<b>137</b>
	<b>ARTICLE DE RECHERCHE .....</b>	<b>145</b>
	<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>147</b>
A)	CSPi et dérivés neuraux : élaboration d'un nouveau modèle cellulaire du SW1.....	149
B)	Identification d'un nouveau phénotype .....	150
C)	Implication de l'UPR .....	153
D)	Mécanismes physiopathologiques : autres pistes.....	155
E)	Approches pharmacologiques des atteintes neurologiques du SW1 .....	160
F)	Limites et optimisation du modèle.....	161
G)	Atteintes neurodéveloppementales et neurodégénératives : liées ? .....	164
	<b>CONCLUSION .....</b>	<b>167</b>
	<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIES.....</b>	<b>173</b>

## INDEX DES FIGURES

FIGURE 1 : CARACTERISTIQUES CLINIQUES DES PATIENTS ATTEINTS DU SW1 .....	29
FIGURE 2 : DIFFERENTES ATTEINTES OPTIQUES DU SW1 .....	32
FIGURE 3 : PREVALENCE DES DIFFERENTES ATTEINTES ET AGE AU MOMENT DU DIAGNOSTIC .....	33
FIGURE 4 : RE-EVALUATION DE L'AGE D'APPARITION DES SYMPTOMES NEUROLOGIQUES DES PATIENTS ATTEINTS DU SW1 .....	36
FIGURE 5 : OBSERVATIONS PAR DISSECTION DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL D'UN PATIENT ATTEINT DU SW1 .....	37
FIGURE 6 : ANALYSES DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL DE PATIENTS ATTEINTS DU SW1 PAR IRM .....	38
FIGURE 7 : REPRESENTATION DES DIFFERENTES ATTEINTES NEUROLOGIQUES DU SW1 .....	39
FIGURE 8 : STRUCTURE DU GENE WFS1 .....	41
FIGURE 9 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA WOLFRAMINE ET MUTATIONS ASSOCIEES .....	42
FIGURE 10 : LOCALISATION DE LA WOLFRAMINE DANS DES CELLULES COS-7 .....	43
FIGURE 11 : EXPRESSION DE WFS1 AU COURS DU TEMPS DANS LES DIFFERENTES ZONES CEREBRALES .....	44
FIGURE 12 : EXPRESSION TYPE CELLULAIRE-SPECIFIQUE DE GENES CORRELES A WFS1 DANS LE CERVEAU HUMAIN .....	45
FIGURE 13 : IMMUNOMARQUAGE DE LA WOLFRAMINE DANS LA RETINE ET LE NERF OPTIQUE HUMAINS .....	45
FIGURE 14 : EXPRESSION DE WFS1 DANS L'ŒIL DE SOURIS .....	46
FIGURE 15 : IMPLICATION DE L'UPR DANS DES MECANISMES PHYSIOLOGIQUES ET PHYSIOPATHOLOGIQUES .....	48
FIGURE 16 : VOIES DE SIGNALISATION CONSTITUANT L'UPR .....	49
FIGURE 17 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'INTERACTION DE LA WOLFRAMINE AVEC ATF6A PAR LE BIAIS DE HRD1 .....	52
FIGURE 18 : MECANISMES MOLECULAIRES IMPLIQUES DANS LES DEFAUTS CALCIFIQUES EN ABSENCE DE WFS1 .....	57
FIGURE 19 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA CHAINE RESPIRATOIRE MITOCHONDRIALE ET DU CYCLE DE KREBS .....	58
FIGURE 20 : DYNAMIQUES MITOCHONDRIALES ET MECANISMES ASSOCIES .....	59
FIGURE 21 : CA <sup>2+</sup> MITOCHONDRIAL DANS LES CELLULES B-PANCREATIQUES ET LES NEURONES .....	60
FIGURE 22 : STRUCTURE ET FONCTIONS DES MAMS .....	60
FIGURE 23 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU REPLIEMENT DE LA NA <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPASE DANS LE RETICULUM ENDOPLASMIQUE .....	63
FIGURE 24 : IMPLICATION DE LA WOLFRAMINE DANS LA FORMATION DE VESICULES .....	64
FIGURE 25 : DIFFERENTS MODELES ANIMAUX DU SYNDROME DE WOLFRAM DE TYPE 1 .....	67
FIGURE 26 : DIFFERENTES APPROCHES THERAPEUTIQUES POUR LE SW1 .....	70
FIGURE 27 : AVANCEES DES DIFFERENTS TRAITEMENTS ELABORES POUR LE SW1 .....	72
FIGURE 28 : ANATOMIE DU CERVEAU ET COUPE CORONALE .....	74
FIGURE 29 : ILLUSTRATION DES DIFFERENTS TYPES DE NEURONES CONSTITUANT LE SNC .....	74
FIGURE 30 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES COMPOSANTS STRUCTURAUX DES NEURONES .....	75
FIGURE 31 : IMPLICATION DES PROTOCADHERINES DANS LA MISE EN PLACE DE L'ARBRE DENDRITIQUE .....	76
FIGURE 32 : DIFFERENTS CONSTITUANTS CELLULAIRES DU SNC .....	77
FIGURE 33 : PREMIERES ETAPES DE LA NEURULATION .....	78
FIGURE 34 : DIVISION SYMETRIQUE DES CELLULES NEUROEPITHELIALES .....	79
FIGURE 35 : ORGANISATION DES COUCHES CORTICALES DANS LE CORTEX CEREBRAL HUMAIN DURANT LA CORTICOGENESE .....	80
FIGURE 36 : NEUROGENESE CORTICALE DE L'HOMME .....	82
FIGURE 37 : DIFFERENTS TYPES DE CONNEXIONS ET NEURONES IMPLIQUES .....	84
FIGURE 38 : STRUCTURE ET MECANISMES DU CONE DE CROISSANCE DES NEURONES .....	85
FIGURE 39 : DIFFERENTS MECANISMES IMPLIQUES DANS LE GUIDAGE DU CONE DE CROISSANCE DE L'AXONE .....	86
FIGURE 40 : PRINCIPALES FAMILLES DES CAMS .....	87
FIGURE 41 : MOLECULES DU GUIDAGE AXONAL DIFFUSIBLES ET LEURS RECEPTEURS .....	89
FIGURE 42 : EFFET DE LA SEMAPHORINE 3A (SEMA3A) SUR LE GUIDAGE DU CONE DE CROISSANCE .....	90
FIGURE 43 : AXONE PIONNIER ET SUIVEUR, NATURE DES INTERACTIONS ET MECANISME DE FERMETURE ECLAIR .....	92
FIGURE 44 : DIFFERENTS TYPES D'INTERACTIONS AXONE-AXONE .....	93
FIGURE 45 : HIERARCHIE DES CELLULES SOUCHES .....	98

FIGURE 46 : STRATEGIE D’OBTENTION DES CSPI .....	101
FIGURE 47 : PRINCIPE DU TRANSFERT NUCLEAIRE .....	102
FIGURE 48 : PRINCIPE DE LA FUSION CELLULAIRE .....	104
FIGURE 49 : PRINCIPE DE LA TRANSDUCTION DE FACTEURS DE TRANSCRIPTION .....	105
FIGURE 50 : STRATEGIES AFIN DE GENERER DES CSPI .....	108
FIGURE 51 : DIFFERENTS PARAMETRES DE REPROGRAMMATION DES CSPI.....	110
FIGURE 52 : ASPECTS MORPHOLOGIQUES DES CSP .....	111
FIGURE 53 : DIFFERENCIATION DES CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES .....	113
FIGURE 54 : PRINCIPE DE L’INDUCTION NEURALE.....	116
FIGURE 55 : DUAL SMAD INHIBITION .....	117
TABLEAU 1 : EXEMPLES DE PROTOCOLES D’INDUCTION DE NEURONES CORTICAUX À PARTIR DE CSPI .....	119
FIGURE 56 : PROTOCOLE DE DIFFERENCIATION EN NEURONES CORTICAUX.....	119
FIGURE 57 : DIFFERENTES APPLICATIONS DES CSPH .....	120
FIGURE 58 : MODELISATION DU SYNDROME DE RETT A PARTIR DE FIBROBLASTES DE PATIENTS .....	122
FIGURE 59 : APPROCHE D’ELABORATION DE LIGNEES ISOGENIQUES DANS LE CADRE DE LA MODELISATION PATHOLOGIQUE .....	125
FIGURE 60 : APPROCHE DE CRIBLAGE A HAUT DEBIT A PARTIR DE CSP .....	127
FIGURE 61 : APPROCHE DE CRIBLAGE A HAUT DEBIT SUR ORGANOÏDES.....	130
FIGURE 62 : ESSAIS CLINIQUES DE THERAPIE CELLULAIRES BASES SUR L’UTILISATION DE CSP HUMAINES .....	131
FIGURE 63 : STRATEGIE EXPERIMENTALE DE MODELISATION PATHOLOGIQUE MENEES PAR L’EQUIPE.....	136
FIGURE 64 : RESUME GRAPHIQUE DES TRAVAUX DE RECHERCHE MENES AU COURS DE MA THESE.....	139
FIGURE 65 : EXPRESSION DES GENES ASSOCIES AUX MITOCHONDRIES AUX STADES NSC ET NEURONES CORTICAUX.....	157

## ABREVIATIONS

**AAVS1** : *Adeno-Associated Virus Integration Site 1*

**Acétyl-CoA** : Acétyl-coenzymeA

**ALCAMs** : *Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecules*

**ALS** : *Amyotrophic Lateral Sclerosis*, sclérose latérale amyotrophique

**ATF4** : *Activating Transcription Factor 4*

**ATF6 $\alpha$**  : *Activating Transcription Factor 6*

**ATP** : Adénosine TriPhosphate

**AVP** : Vasopressine ; Arginine-Vasopressine

**BE** : *Base Editing*

**BIP** : *Binding Immunoglobulin Protein*

**BMP** : *Bone Morphogenic Proteins*

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

**CAMs** : *Cell Adhesion Molecules*

**CDK2** : *Cyclin-Dependant Kinase 2*

**CDK4** : *Cyclin-Dependant Kinase 4*

**CDKN2A** : *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A*

**CHOP** : *C/EBP homologous protein*

**c-Myc** : *Myc proto-oncogene protein*

**COPII** : *Coat Protein Complex II*

**CPE** : Carboxypeptidase E

**CRASH** : hypoplasie du Corps calleux, Retard mental, pouces Adductus, paraplégie Spastique et Hydrocéphalie

**CRISPR-Cas9** : *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats - CRISPR associated protein 9*

**CSE** : Cellules Souches Embryonnaires

**CSEh** : Cellules Souches Embryonnaires humaines

**CSH** : Cellules Souches Hématopoïétiques

**CSP** : Cellules Souches Pluripotentes

**CSPi** : Cellules Souches Pluripotentes induites

**CTIP2** : *chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor-interacting protein 2*

**CUX2** : *Cut Like Homeobox 2*

**D** : *Deafness*, Surdité

**DCC** : *Deleted in Colorectal Cancer*

**DFNA6** : *Deafness Autosomal Dominant 6*

**DI** : *Diabete Insipidus*, diabète insipide

**DM** : *Diabete Mellitus*, diabète sucré

**DM1** : Dystrophie Myotonique de type 1

**DPI** : Diagnostic Pré-Implantatoire

**DPP-4** : Dipeptidyl peptidase-4

**DRD1** : Récepteur D1 Dopamine

**DSCAMs** : *Down Syndrome Cell Adhesion Molecules*

**DT1** : Diabète de type 1

**DT2** : Diabète de type 2

**DVU** : Dysfonctionnements des Voies Urinaires

**EB** : *Embryonic Bodies*

**elf2 $\alpha$**  : *eukaryotic Initiation Factor 2*

**Eph** : Ephrine

**Ex-4** : Exendin-4

**FDA** : *Food and Drug Administration*

**FGF** : *Fibroblast Growth Factor*

**FIV** : Fécondation *In Vitro*

**FOXP1** : *Forkhead-box Protein P1*

**GADD34** : *Growth Arrest and DNA Damage-inducible protein*

**GLP-1R** : Récepteur du peptide 1 de type glucagon

**HDAC** : Histone désacétylase

**HGPRT** : Hypoxanthine-guanine

phosphoribosyltransférase

**HRD1** : *E3 HydroxyMethyl Glutaryl-Coenzyme A reductase degradation protein 1*

**HSP** : *Hereditary Spastic Paraplegia*

**HTS** : *High Throughput Screening*

**HuC/D** : *Hu protein C/D*

**IA**: Intelligence Artificielle

**IP3R** : Récepteur de l'inositol 1,4,5-triphosphate

**IRE1 $\alpha$**  : *Inositol Requiring Enzyme 1*

**IRM** : Imagerie par Résonance Magnétique

**Kb** : Kilo Base

**KDa** : Kilo Dalton

**KLF4** : *Kruppel-Like Factor 4*

**L1CAM** : *L1 cell adhesion molecule protein*

**LC3** : *Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*

**LIN28** : *Protein Lin-28 Homolog*

**MA** : Maladie d'Alzheimer

**MAMs** : *Mitochondria-Associated ER - Membranes*

**MANF** : *Mesencephalic Astrocyte-derived Neurotrophic Factor*

**MAP-2** : *Microtubule-Associated Protein 2*

**MAPK** : *Mitogen Activated Protein Kinase*

**MCI** : Masse cellulaire interne

**MEC** : Matrice Extracellulaire

**MECP2** : *methyl CpG binding protein 2*

**MEF** : *Mouse Embryonic Fibroblast*

**mFISH** : *multicolor Fluorescent in situ Hybridation*

**MP** : Maladie de Parkinson

**NANOG** : *Nanog Homeobox*

**NCAM** : *Neural Cell Adhesion Molecule*

**NCS1** : *Neuronal Calcium Sensor 1*

**NCX** : Echangeur sodium-calcium

**NFPC** : NF-protocadhérine

**NPY** : Neuropeptide Y

**NSC** : *Neural Stem Cell*, cellules souches neurales

**OA** : *Optic Atrophy*, Atrophie Optique

**OCT3/4** : *Octamer-binding Transcription factor 3/4*

**OKSM** : Oct3/4, KLF4, Sox2, c-Myc

**P21<sup>cip</sup>** : *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1*

**p53** : *Tumor Protein 53*

**PAX6** : *Paired box protein 6*

**4-PBA** : acide 4-phénylbutyrique

**Pcdh17** : Protocadhérine-17

**PC** : Plaque Corticale

**PCR** : *Polymerase Chain Reaction*

**PERK** : *Protein Kinase RNA-like ER protein Kinase*

**PI** : Progéniteur neural Intermédiaire

**QI** : Quotient Intellectuel

**RA** : Acide Rétinoïque

**RE** : Réticulum Endoplasmique

**RGC** : *Retinal Ganglion Cells*, Cellules Ganglionnaires de la Rétine

**RGM** : *Repulsive Guidance Molecule*

**RIDD** : *Regulated IRE1-dependant Decay*

**ROBO** : *Roundabout*

**ROS** : *Reactive Oxygen Species*

**RPE** : *Retinal Pigment Epithelium*, Epithélium Pigmentaire Rétinien

**S1P** : Protéase de site 1

**S1R** : Récepteur Sigma 1

**S2P** : Protéase de site 2

**SALL4** : *Splat Like Transcription Factor 4*

**SCG5** : Protéine neuroendocrine 7B2

**sc-RNA seq** : *single-cell RNA-sequencing*

**Sema3A** : Sémaphorine-3A  
**Sema3D** : Sémaphorine-3D  
**SERCA** : *Sarco/Endoplasmic Reticulum calcium ATPases*  
**SeV** : Virus de Sendai  
**Shh** : *Sonic hedgehog*  
**shRNA** : *Short Hairpin RNA*  
**siRNA** : *Small interfering RNA*  
**SMA** : *Spinal Muscular Atrophy, Amyotrophie Spinale infantile*  
**SN** : Système nerveux  
**SNC** : Système Nerveux Central  
**SNP** : Système nerveux périphérique  
**SOX1** : *SRY-Box Transcription Factor 1*  
**SOX2** : *Sex determining region Y-box 2*  
**SP** : Sous Plaque  
**SSEA3/4** : *Stage Specific Embryonic Antigen 3/4*  
**SVZ** : Zone Sous Ventriculaire  
**SW** : Syndrome de Wolfram  
**SW1** : Syndrome de Wolfram de type 1  
**SW2** : Syndrome de Wolfram de type 2  
**SYN1** : Synapsine 1  
**TALEN** : *Transcription Activator-Like Effector Nucleases*  
**TFG** : *Tropomyosin receptor kinase-fused gene*  
**TGF-β** : *Transforming Growth Factor-β*  
**TRA1-60/-81** : *Tumor-related antigen -60/-81*  
**TUDCA** : Acide tauroursodésychocholique  
**Tuj-1** : *Neuron-specific class III beta-tubulin*  
**Unc6** : *Uncoordinated 6*  
**UPR** : *Unfolded Protein Response*  
**UTF1** : *Undifferentiated Embryonic Cell Transcription Factor 1*  
**VAMP** : *Vesicle Associated Membrane Protein*  
**VPA** : Acide valproïque  
**vRGC** : Cellules gliales radiales ventriculaires  
**wpc** : *week post conception*  
**XBP1** : *X-Box-binding Protein 1*  
**XBP1s** : *XBP1 spliced*  
**ZFN** : *Zinc Finger Nucleases*  
**ZI** : Zone Intermédiaire  
**ZM** : Zone Marginale  
**ZV** : Zone Ventriculaire



# INTRODUCTION

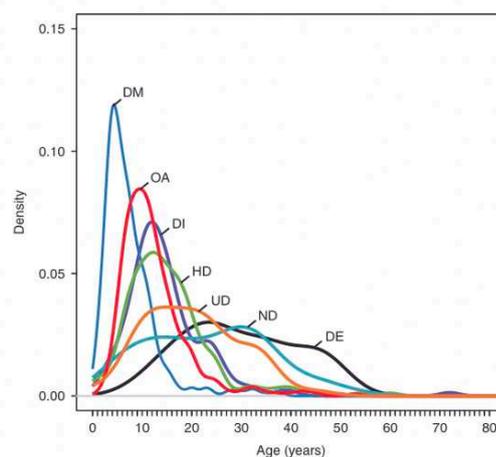


## Chapitre 1 : Le syndrome de Wolfram

### I) Présentation clinique du syndrome de Wolfram

#### A) Généralités

Le syndrome de Wolfram (SW) est une maladie neurodégénérative rare d'origine génétique. C'est en 1938 que le Dr Wolfram et le Dr Wagener décrivent pour la première fois ce syndrome comme l'association d'une atrophie optique et d'un diabète mellitus (diabète sucré) dans une fratrie de quatre enfants (Wolfram and Wagener, 1938). Le SW est aussi connu sous le nom de syndrome DIDMOAD, acronyme des différents symptômes le caractérisant, à savoir : un diabète insipide (DI, *Diabete Insipidus*) ; un diabète mellitus (DM, *Diabete Mellitus*), une atrophie optique (OA, *Optic Atrophy*) et une surdité neurosensorielle (D, *Deafness*) (Figure 1). D'autres atteintes peuvent également se développer telles que des atteintes des voies urinaires, des atteintes neurologiques et psychiatriques. A ce jour, on distingue deux formes du syndrome : le syndrome de Wolfram de type 1 (SW1, OMIM#222300) et le syndrome de Wolfram de type 2 (SW2, OMIM#604928). Ces deux types diffèrent de par leur origine génétique ainsi que par la nature des symptômes qui se manifestent chez les patients. Mon projet de thèse ayant porté sur le SW1 qui représente 90% des cas (De Heredia et al., 2013), cette introduction traitera uniquement de celui-ci.



**Figure 1 : Caractéristiques cliniques des patients atteints du SW1**

(De Heredia et al., 2013)

Graphique représentant l'apparition des différents symptômes au cours de la vie du patient (Age), la proportion de patients atteints est également indiquée (Density). Le pic de chaque courbe représente l'âge médian d'apparition du symptôme. DM : diabète mellitus ; OA : atrophie optique ; DI : diabète insipide ; HD : défauts d'audition ; UR : atteintes urinaires ou rénales ; ND : défauts neurologiques, psychiatriques et développementaux ; DE : décès.

A ce jour, il n'existe pas de traitement curatif et seules des prises en charge symptomatiques sont proposées aux patients, notamment pour le diabète et les atteintes auditives. Les patients décèdent de manière précoce vers 40 ans, en conséquence des différentes atteintes neurologiques à l'origine de troubles de la déglutition avec un risque d'asphyxie ou de pneumopathies d'inhalation et d'apnées centrales. Les complications aiguës du diabète ainsi que l'insuffisance rénale terminale sont également des causes de mortalité de ce syndrome.

## **B) Manifestations cliniques du syndrome de Wolfram de type 1**

### **1) Diabète mellitus (diabète sucré)**

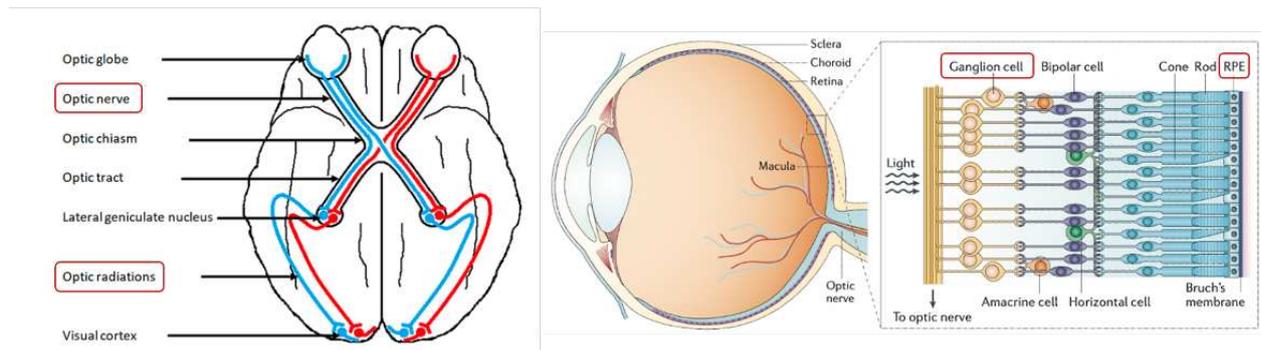
Le diabète mellitus est, de manière générale, le premier symptôme à se manifester chez les patients aux alentours de 6 ans (Barrett et al., 1995). Sa manifestation, en association avec une baisse de la vision, est nécessaire à la pose d'un diagnostic de la maladie. Comme le diabète de type 1 (DT1), ce diabète est associé à un défaut fonctionnel et à une diminution importante du nombre de cellules  $\beta$ -pancréatiques des patients (Karasik et al., 1989 ; Barrett et al., 1995 ; Hilson et al., 2009 ; Rohayem et al., 2011). Cependant, les mécanismes cellulaires à l'origine de la dégradation de ces cellules ne sont pas les mêmes (Fonseca et al., 2005 ; Cano et al., 2007). De plus, les neuropathies sont plus importantes dans le SW1 en comparaison du DT1 (Rohayem et al., 2011), suggérant qu'au-delà d'un mécanisme différent, le diabète mellitus du SW1 est plus sévère que le DT1. Bien que ce diabète soit présent chez les patients des deux sexes, ce symptôme débute plus tôt chez les hommes (Hardy et al., 1999 ; Smith et al., 2004). Cette tendance a également été décrite dans des modèles murins du syndrome (Noormets et al., 2011 ; Plaas et al., 2017). Ce phénomène pourrait s'expliquer par le fait que les femelles possèdent une hormone, la 17- $\beta$ -estradiol, qui a été décrite comme ayant un rôle protecteur sur les cellules  $\beta$ -pancréatiques murines et humaines (Liu and Mauvais-Jarvis, 2009). De plus, des défauts de conversion de la pro-insuline en insuline ainsi que sa sécrétion ont été décrits dans différents modèles murins (Hatanaka et al., 2011 ; Noormets et al., 2011). De surcroît,

différentes études ont montré que les cellules  $\beta$ -pancréatiques humaines et de rongeurs présentaient différents défauts tels qu'un stress du réticulum endoplasmique (RE) augmenté ainsi que des défauts structurels de cet organite (Riggs et al., 2005 ; Yamada et al., 2006 ; Fonseca et al., 2005 ; 2010 ; Shang et al., 2014). Ces études ont également montré que l'ensemble de ces défauts ont un impact direct sur la production et la sécrétion d'insuline et conduisent, par augmentation du stress de la cellule, à une mort prématurée de celle-ci. Plus récemment, il a été montré qu'une expression du gène responsable du SW1, le gène *WFS1*, était réduite dans les îlots pancréatiques de personnes souffrant de diabète de type 2 (DT2). Cela suggère ainsi l'importance du gène *WFS1* dans le DT2, et souligne son rôle dans la survie et la physiologie des cellules  $\beta$ -pancréatiques murines et humaines (Abreu et al., 2020).

## 2) L'atrophie optique

Une atteinte du nerf optique est le deuxième symptôme nécessaire à la pose du diagnostic du SW1. Cette atteinte d'origine neurologique se manifeste vers 11 ans (Barrett et al., 1995) et débute par une gêne visuelle correspondant à une perte de la perception de la couleur et de la vision périphérique (Hoekel et al., 2014). Ce symptôme impacte grandement la vie des patients et s'accompagne d'autres complications telles qu'une perte de l'acuité visuelle, l'apparition d'une pâleur de la papille optique (tête du nerf optique), un strabisme, un nystagmus et des cataractes. D'un point de vue anatomopathologique, ces manifestations sont associées à une diminution de l'épaisseur des couches plexiformes et des fibres nerveuses rétiniennes, et plus particulièrement à une perte importante des cellules ganglionnaires de la rétine (RGC, *Retinal Ganglion Cells*) et de leurs axones (Barrett et al., 1997 ; Hilson et al., 2009 ; Bababeygy et al., 2012 ; Hoekel et al., 2014 ; Zmyslowska et al., 2015 ; Grenier et al., 2016). Ces atteintes de la rétine sont observées chez de nombreux patients (Scaramuzzi et al., 2018), et l'amincissement de celle-ci est utilisé afin d'observer l'évolution de la maladie (Zmyslowska et al., 2015 ; 2017 ; Ustaoglu et al., 2019). Différentes études ont montré que la radiation optique, faisceau d'axones faisant le lien entre le cortex visuel

et le noyau géniculé latéral, est très atteinte (Carson et al., 1977 ; Barrett et al., 1997 ; Hershey et al., 2012). De plus, d'autres cellules sont fortement touchées comme l'épithélium pigmentaire de la rétine (RPE, *Retinal Pigment Epithelium*) (Hilson et al., 2009) (Figure 2). Par ailleurs, des atteintes microvasculaires sont également observées dans différentes zones dont les zones maculaires et péripapillaires des yeux des patients (Asanad et al., 2019 ; Battista et al., 2022).



**Figure 2 : Différentes atteintes optiques du SW1**

(Modifié d'après Davion et al., 2020 à gauche et Kimbrel and Lanza, 2015 à droite)  
 Les différentes atteintes décrites dans le cadre du syndrome de Wolfram de type 1 sont encadrées en rouge.

### 3) Diabète insipide

D'autres symptômes peuvent se manifester dans la deuxième décennie des patients. C'est le cas du diabète insipide (DI) (Cremers et al., 1977, Barrett and Bunday 1997 ; Spiess et al., 2020). Ce symptôme n'est pas observé de manière systématique, expliquant la variation de pourcentage de patients atteints dans les études de cas allant de 29% (Chausseot et al., 2011) jusqu'à 72% (Barrett et al., 1995). Ainsi, avec un âge d'apparition médian proche de 15 ans, il n'est pas rare d'observer des âges d'apparition très éloignés d'une étude à l'autre. Le DI va être à l'origine d'une polyurie (production d'urine excessive) ainsi qu'une polydipsie (soif excessive). Bien que le mécanisme précis à l'origine de ce symptôme ne soit pas clairement élucidé (Scherthaner-Reiter et al., 2017), différentes études ont montré un défaut dans la transformation de l'hormone antidiurétique, également appelée vasopressine ou arginine-vasopressine (AVP), chez

plusieurs patients (Wit et al., 1986 ; Thompson et al., 1989 ; Gabreëls et al., 1998). Ces études confirment les atteintes de l'hypothalamus chez les patients, observées par Carson et al., qui avait rapporté des altérations sévères des neurones du noyau paraventriculaire ainsi que du noyau supraoptique de l'hypothalamus (Carson et al., 1977 ; Samara et al., 2019).

#### 4) La surdité

De nombreux patients sont également atteints de surdité (D). Tout comme le DI, la surdité est décrite en pourcentages variables dans les différents rapports de cas (Kumar, 2010) (Figure 3).

Clinical characteristics	Barett et al. (45 patients)		Kinsley et al. (68 patients)		Lombardo et al. (7 patients belonging to a single pedigree)		Medlej et al. (31 patients)	
	In %	Median (range)	In %	Median (range)	In %	Median (range)	In %	Median (range)
Diabetes mellitus	100	6 (3 weeks–16 yr)	100	6.5 (1–26)	100	4.5 (3–6)	100	6 (4–12)
Optic atrophy	100	11 (6 weeks–19 yr)	100	12.6 (6–30)	100	11 (9–14)	100	9 (5–20)
Diabetes insipidus	73	14 (3 months–40 yr)	51	14.8 (4–41)	57	10.5 (10–11)	87	9 (4–26)
Deafness	62	16 (5–39)	51	19 (9–43)	83	9 (6–13)	64.5	16 (7–24)
Urological abnormalities	58	— (10–44)	54	15.2 (7–41)	14.2	10	41	—
Neurological complications	62	— (5–44)	69	—	—	—	70.9	—

Age in years unless specified.

**Figure 3 : Prévalence des différentes atteintes et âge au moment du diagnostic (Kumar, 2010)**

Ce tableau issu de l'étude de Kumar, met en évidence la grande variation des valeurs de prévalence des différents symptômes au sein de seulement quatre études préalables. Il existe un grand nombre d'études de cas du SW1.

De manière générale, les troubles auditifs se manifestent entre 10 et 16 ans, et l'apparition post-linguale permet ainsi aux patients d'avoir un développement normal du langage oral. Des manifestations très précoces sont cependant observées, parfois même avant l'âge de 2 ans (Marshall et al., 2013 ; Karzon et al., 2013). L'évolution de cette surdité peut être très lente. Dans le cadre de ce syndrome, la surdité est caractérisée par des atteintes de l'oreille interne et notamment de l'organe de Corti (Hilson et al., 2009), classant ainsi cette atteinte comme surdité neurosensorielle.

## 5) Autres symptômes

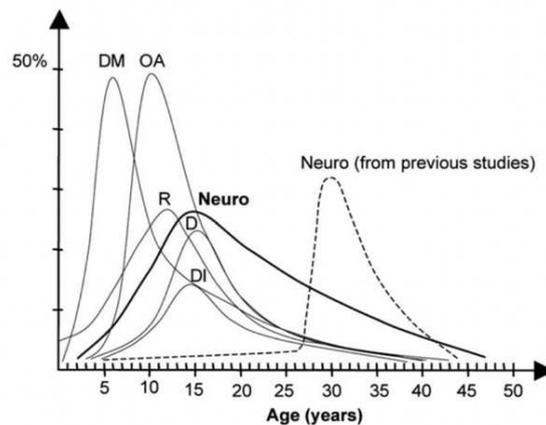
Au-delà de l'ensemble des symptômes principaux décrits précédemment, d'autres troubles peuvent se manifester chez les patients. C'est le cas notamment des dysfonctionnements des voies urinaires (DVU) qui sont observés chez de nombreux patients (Cremers et al., 1977 ; Thanos et al., 1992 ; Barrett and Bunday, 1997 ; Tekgül et al., 1999 ; Yuca et al., 2012). Le pourcentage de patients atteints varie de 58 à 93% en fonction des études (Barrett et al., 1995 ; Tekgül et al., 1999). L'âge d'apparition des DVU diffère d'un patient à l'autre avec des âges allant de 14,7 à 20 ans (Barrett et al., 1995 ; Ribière et al., 2013 ; La Valle et al., 2021). Ces atteintes peuvent conduire à une insuffisance rénale terminale, l'une des causes fréquentes du décès précoce des patients (Kinsley et al., 1995 ; Barrett and Bunday, 1997). L'origine de ces symptômes est restée inconnue pendant de nombreuses années. En effet, jusqu'à présent, les complications urologiques étaient peu étudiées dans les rapports de cas de patients, privilégiant l'analyse du DM, de l'OA, du DI et de la surdité. Cela s'explique par différentes raisons : le symptôme se manifeste plus tardivement, il est parfois mal diagnostiqué et il a initialement été décrit comme une complication du DM. Cependant, différentes études ont montré des atteintes très précoces, parfois même avant la manifestation du DM, réfutant ainsi cette hypothèse. Elles ont mis en lumière toute la nécessité de mieux diagnostiquer ces atteintes afin d'améliorer la prise en charge des patients (Tekgül et al., 1999 ; Çamtosun et al., 2015). Les DVU se caractérisent par un large spectre de symptômes, comprenant une dilatation bilatérale des voies urinaires (allant d'une hydronéphrose légère à un méga-uretère), une vessie atonique et des infections récurrentes (Chu et al., 1986 ; Simsek et al., 2003). D'autres manifestations telles qu'une incontinence urinaire à l'effort, une énurésie, une dysurie, une atteinte du haut appareil urinaire, peuvent se manifester (Cox, 1993 ; Tekgül et al., 1999 ; Ganie et al., 2011 ; La Valle et al., 2021). Récemment, les origines neurologiques de ces atteintes ont été mises en évidence, une corrélation entre la sévérité des atteintes du pont de Varole (pont entre les hémisphères cérébraux, le cervelet et le bulbe rachidien, situé dans le tronc cérébral) et la sévérité des atteintes urinaires chez

les patients a été décrite (Rove et al., 2018).

Enfin, d'autres symptômes ont été rapportés chez les patients tels qu'une fragilité osseuse (Catalano et al., 2017), des anosmies et dysgueusies (Marshall et al., 2013 ; Bischoff et al., 2015 ; Alfaro et al., 2020), ainsi que des troubles du sommeil (Bischoff et al., 2015 ; Licis et al., 2019). Bischoff et al. a suggéré d'utiliser ces symptômes précoces comme biomarqueurs afin d'améliorer la détection du syndrome de manière très précoce. Des atteintes psychiatriques variées (dépression, troubles bipolaires, schizophrénie) ont également été rapportées (Swift et al., 1991 ; Swift and Swift 2000 ; Sequeira et al., 2003 ; Koido et al., 2005 ; Gowda et al., 2018). De plus, une étude récente a révélé que la localisation de la mutation dans le gène *WFS1* avait un impact sur la nature et la sévérité des atteintes psychiatriques des patients (Munshani et al., 2021). Depuis la première description du syndrome, l'identification et la caractérisation de ces atteintes n'ont cessé d'évoluer. Cela a ainsi permis de réduire l'errance diagnostique liée à cette maladie, en améliorant la connaissance de la pathologie et la pose du diagnostic, ainsi qu'une meilleure prise en charge des symptômes des patients. L'ensemble des atteintes citées dans ce paragraphe ont un lourd impact sur la qualité de vie des patients et pointent toutes vers une autre atteinte majeure du syndrome : l'atteinte neurologique.

#### 6) Atteintes neurologiques

Bien que les origines neurologiques des symptômes précédemment abordés aient été mises en lumière plus récemment, des atteintes neurologiques chez les patients ont été décrites très tôt dans la découverte de la maladie (Barrett et al., 1995). Observées chez plus de 60% des patients, l'âge d'apparition médian de ces troubles a initialement été décrit à 28 ans (Barrett et al., 1995), mais des études plus récentes montrent qu'elles débutent en réalité plus précocement, aux alentours de 15 ans (Figure 4) (Chaussenot et al., 2011, De Heredia et al., 2013).



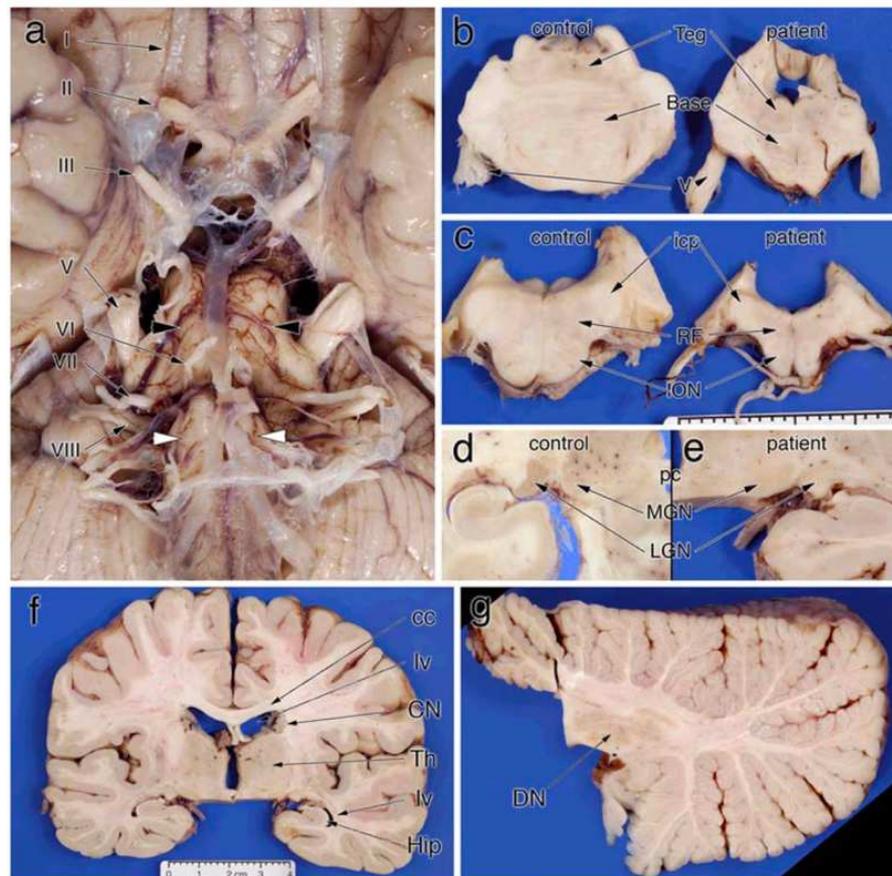
**Figure 4 : Ré-évaluation de l'âge d'apparition des symptômes neurologiques des patients atteints du SW1**

(Chausseot et al., 2011)

DM : diabète mellitus ; OA : atrophie optique ; DI : diabète insipide ; D : surdité ; R : anomalies du tract rénal ; Neuro : atteintes neurologiques. Le pic de chaque courbe représente l'âge médian d'apparition du symptôme en fonction du pourcentage de patients le manifestant. Celle en pointillés représente l'ancienne valeur décrite par Barrett et al., 1995 ; la courbe Neuro pleine correspond à la nouvelle valeur de l'âge médian.

Les troubles neurologiques se manifestent de diverses manières chez les patients et présentent une sévérité variée. Ainsi, des atteintes telles que l'ataxie cérébelleuse, retrouvée chez 45% des patients (Barrett et al., 1995 ; Chausseot et al., 2011) mais également des troubles de la marche (Pickett et al., 2012 ; Marshall et al., 2013) apparaissent tôt chez les patients et s'aggravent au cours du temps. Certains patients développent également de l'épilepsie (Barrett et al., 1995 ; Scolding et al., 1996 ; Chausseot et al., 2011). Les capacités intellectuelles ne semblent pas impactées dans les stades pr cococes du syndrome (Bischoff et al., 2015). Une tendance à un QI (Quotient Intellectuel) verbal élevé a même été décrite dans une étude menée sur 16 patients, dont 15 d'entre eux possédaient un QI dans la moyenne ou au-dessus (Marshall et al., 2013). Cependant, des capacités cognitives d ficiantes (déclin de la mémoire ou encore démence) ont été rapportées chez 32% des patients de l'étude de Chausseot et al., (Chausseot et al., 2011), ainsi que dans les stades tardifs du syndrome (Bischoff et al., 2015). Les origines anatomiques de ces atteintes ont été mises en évidence depuis de nombreuses années. Différentes études post-mortem réalisées sur des patients ont identifié des atteintes sévères de certaines zones, notamment une atrophie du tronc cérébral (plus particulièrement du pont et du

mésencéphale), du cervelet, du noyau supraoptique et paraventriculaire (hypothalamus) (Figure 5) (Carson et al., 1977 ; Scolding et al., 1996 ; Barrett et al., 1997 ; Gabreëls et al., 1998 ; Shannon et al., 1999 ; Hilson et al., 2009).



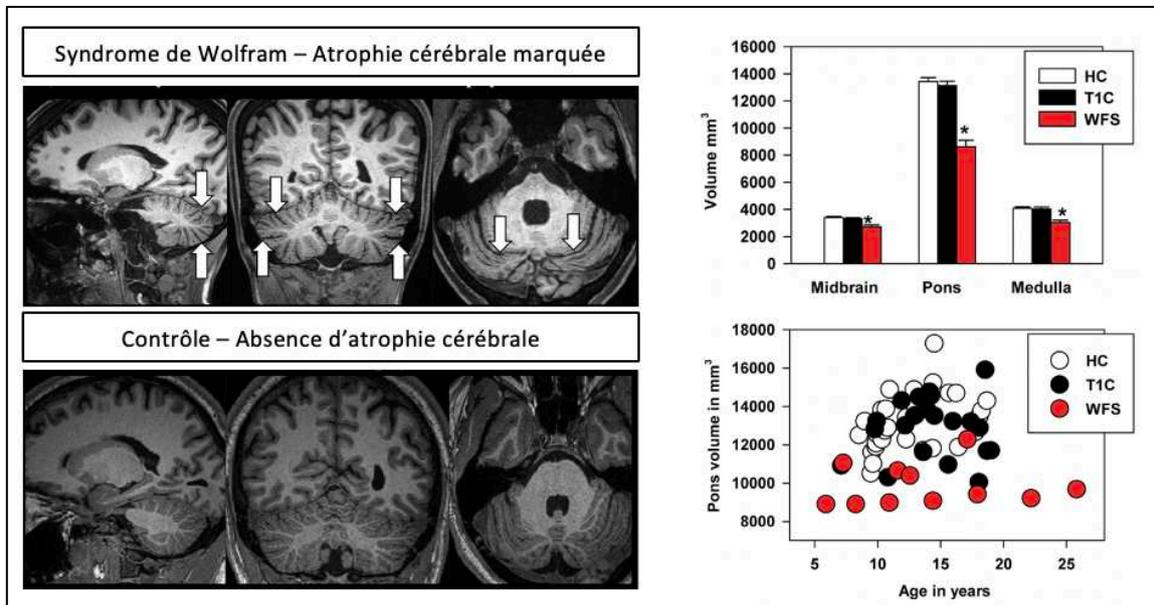
**Figure 5 : Observations par dissection du système nerveux central d'un patient atteint du SW1**

(Hilson et al., 2009)

a. Vue ventrale du tronc cérébral et des nerfs optiques mettant en évidence une couleur pâle ainsi qu'un rétrécissement du nerf optique (I) de même que la medulla (pointes blanches) et le pont (flèches noires). b. Diminution de la base du pont chez le patient par rapport au contrôle. c. Observations similaires pour la médulla rostrale et du pédoncule cérébelleux inférieur. d. Noyau géniculé latéral (LGN) et noyau géniculé médian (MGN) normaux au niveau de la commissure postérieure (pc). e. Chez le patient, le MGN a la même couleur gris clair que le témoin ; mais le LGN est complètement dépourvu de la couleur brun foncé du témoin. f. Coupe coronale de cerveau illustrant un télencéphale essentiellement normal. Les ventricules latéraux (lv) ne sont pas dilatés, le corps calleux (cc) n'est pas atrophié ou décoloré, le thalamus (Th) est de taille et de configuration normales (à l'exception de la pâleur du LGN), et aucun rétrécissement de l'hippocampe (Hip) n'est présent. De même, la section radiale du cervelet en g. ne présente aucune atrophie des folies, et le noyau denté (DN) a une taille et une couleur normales.

Ces atteintes ont été confirmées par des études de neuroimagerie réalisées par imagerie par résonance magnétique (IRM). Des atrophies généralisées dans l'entièreté des cerveaux des patients atteints du SW1, particulièrement dans le cervelet, le tronc cérébral, le thalamus et la substance blanche, ont également été rapportées (Figure 6)

(Scolding et al., 1996 ; Ito et al., 2007 ; Chaussonot et al., 2011 ; Hershey et al., 2012 ; Gocmen and Guler, 2014 ; Lugar et al., 2016 and 2019, Samara et al., 2020, La Morgia et al., 2020).

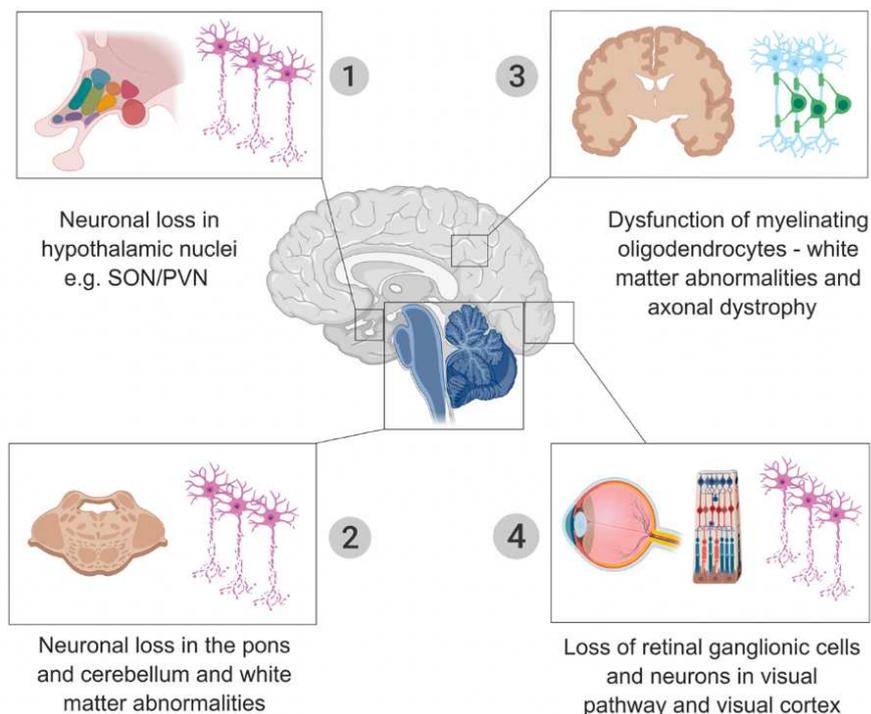


**Figure 6 : Analyses du système nerveux central de patients atteints du SW1 par IRM**  
(Modifié d'après Samara et al., 2020 ; Hershey et al., 2012)

*Gauche.* Une atrophie cérébelleuse marquée est observée chez le patient atteint du SW1 (haut) par rapport au témoin sain (bas). *Droite.* Le groupe de patients SW1 (WFS) présente des volumes réduits dans les trois segments du tronc cérébral (haut) Bien qu'observé dans les trois segments, le pons est particulièrement plus atteint (bas). HC : groupe témoins sains ; T1C : groupe témoins diabétiques ; WFS : groupe patients Wolfram.

Différentes études ont eu pour objectif d'identifier les mécanismes à l'origine de ces atrophies sévères. Des études post-mortem ont notamment montré qu'en plus d'une dégénérescence et une perte importante de neurones, les voies pontocérébelleuses, les fourneaux hippocampiques ainsi que la substance blanche profonde présentaient des dystrophies axonales ainsi que des gonflements axonaux importants (Shannon et al., 1999 ; Hilson et al., 2009). Ces études ont également mis en évidence qu'au-delà d'une dégénérescence, des défauts structuraux se manifestent chez les patients. Plus récemment, une étude menée par IRM sur 21 patients atteints du syndrome a révélé un défaut majeur de myélinisation axonale dans la substance blanche (Lugar et al., 2016). Cette étude réalisée chez des enfants et des jeunes adultes suggère que ce défaut de myélinisation correspond à une atteinte primaire de la pathologie. L'accroissement des études par IRM sur les jeunes patients atteints du SW1

a permis de rapporter des atteintes neurologiques très précoces. Ces analyses ont notamment permis de mettre en évidence que ce syndrome, longtemps décrit comme neurodégénératif, possède également une composante neurodéveloppementale avec des défauts structuraux majeurs tels qu'une réduction globale du volume cérébral (Figure 7) (Lugar et al., 2019 ; Samara et al., 2019 and 2020).



**Figure 7 : Représentation des différentes atteintes neurologiques du SW1**  
(D'après Samara et al., 2019)

Structures et tissus cérébraux touchés dans le SW1. SON : noyau supraoptique ; PVN : noyau paraventriculaire

En plus de l'aggravation des atteintes cliniques citées précédemment, impactant grandement la qualité de vie des patients ainsi que leur autonomie, les troubles neurologiques s'intensifient avec l'âge. En effet, les complications liées à l'atteinte du tronc cérébral sont à l'origine de la majeure partie des décès précoces des patients entre 30 et 40 ans. C'est le cas de l'atteinte du tronc cérébral dont le dysfonctionnement bulbaire entraîne une insuffisance ventilatoire ainsi que des apnées pouvant être associées à une hypersomnolence diurne et des troubles de déglutition, menant *in fine* à des pneumopathies d'inhalation (Kinsley et al., 1995 ; Barrett et al., 1995 ; Barrett and Bunday, 1997 ; Kumar, 2010). Malgré l'accroissement des recherches portant sur les atteintes neurologiques du SW1, les modèles animaux et cellulaires modélisant ces

atteintes restent à ce jour peu développés. De ce fait, les atteintes neurologiques ainsi que leurs mécanismes restent insuffisamment étudiés. L'étude des atteintes neurodégénératives et neurodéveloppementales est un enjeu majeur pour la mise au point de thérapies pour les patients, puisqu'aucun traitement curatif n'existe à ce jour.

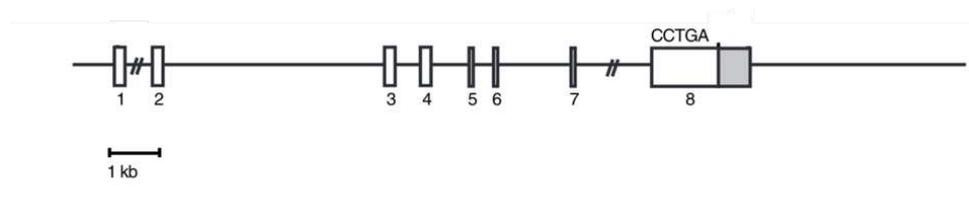
## II) Épidémiologie et génétique

### A) Prévalence du syndrome de Wolfram de type 1

Le syndrome de Wolfram de type 1 est une maladie génétique rare autosomique récessive. Sa prévalence est variable d'un pays à l'autre : de 1/770 000 (Barrett et al., 1995) à 1/500 000 (Kumar, 2010) au Royaume-Uni, 1/710 000 au Japon (Matsunaga et al., 2014), 1/100 000 en Amérique du Nord (Fraser and Gunn, 1977). Des prévalences plus élevées sont retrouvées dans certains pays notamment au Liban (Zalloua et al., 2008) mais aussi en Sicile avec une prévalence de 1/54 478 (Lombardo et al., 2014). De par sa transmission récessive, sa prévalence est plus élevée dans les régions où les unions consanguines sont fréquentes.

### B) Gène associé au syndrome de Wolfram de type 1 : *WFS1*

C'est en 1994 qu'une étude a confirmé la transmission autosomique récessive de la maladie. Réalisée sur 11 familles de patients, cette étude a mis en évidence que le gène à l'origine du syndrome se situe sur le bras court du chromosome 4 (Polymeropoulos et al., 1994). Quatre années plus tard, ce gène est identifié : il s'agit du gène *WFS1* (Inoue et al., 1998 ; Strom et al., 1998). Localisé sur le chromosome 4 en position p16.1, ce gène possède une taille globale de 33,4 Kb (Kilobases) et est constitué de huit exons. Le premier, non codant, est suivi des exons 2 à 7 correspondants à des régions codantes de petites tailles. L'exon 8 est quant à lui le plus grand des exons du gène *WFS1*, représentant plus de 70% du transcrit total (Figure 8). Cela explique que la majorité des mutations responsables du SW1 se situe dans celui-ci.



**Figure 8 : Structure du gène WFS1**  
(D'après Inoue et al., 1998)

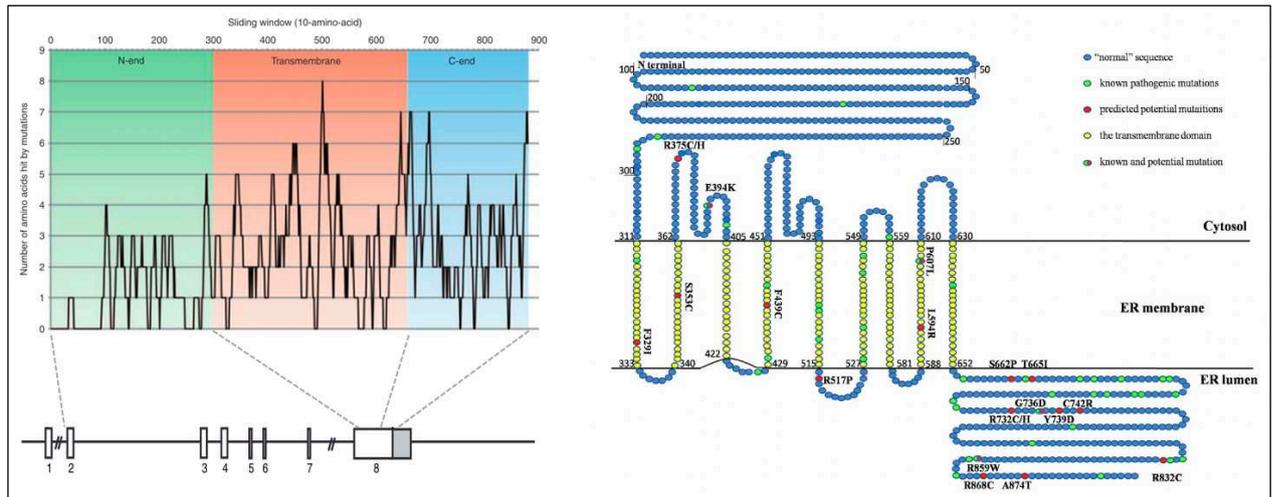
A ce jour, plus de 200 mutations ont été décrites et incluent aussi bien des décalages du cadre de lecture, des mutations non-sens, faux-sens, que des délétions (Rigoli et al., 2010). Des corrélations possibles entre la localisation des mutations et les manifestations neurologiques et psychiatriques ont été suggérées (Chausseot et al., 2011 ; Munshani et al., 2021). En plus des mutations récessives identifiées dans le gène *WFS1* et associées au SW1, des mutations dominantes ont été découvertes dans ce gène et sont à l'origine de maladies voisines associant diabète (ou intolérance au glucose), atrophie optique ainsi que surdité neurosensorielle. C'est le cas notamment de plus de 30 mutations associées à des cas de surdité autosomique dominante de basse fréquence, également connue sous le nom de DFNA6 (*Deafness Autosomal Dominant 6*) (Hildebrand, 2008). L'absence de mutation dans le gène *WFS1*, ou dans celui impliqué dans le SW2, a cependant été rapportée chez des patients, suggérant l'implication d'autres gènes dans le SW (Shahin et al., 2018).

### **C) Protéine codée par le gène *WFS1***

#### ***Structure***

Le gène *WFS1* code une glycoprotéine tétramérique appelée wolframine (*WFS1*). Composée de 890 acides aminés, son poids moléculaire est d'environ 100 KDa (Inoue et al., 1998). Cependant, une étude a rapporté que la protéine était retrouvée dans des fractions cellulaires dont la taille variait entre 300 et 400 KDa, suggérant que celle-ci s'homo-oligomériserait ou réaliserait des interactions fortes avec d'autres protéines (Hofmann et al., 2003). La structure de la protéine se distingue par la présence de trois domaines : une région N-terminale (NH<sub>2</sub>-terminale) hydrophile composée de 287 résidus et située dans le cytosol, une région C-terminale hydrophile composée de 238

résidus et située dans la lumière du RE, et enfin une région centrale hydrophobe composée de 341 résidus qui constituent 9 domaines transmembranaires enchâssés dans la membrane du RE (Inoue et al., 1998 ; Hofmann et al., 2003). Le domaine transmembranaire ainsi que la partie C-terminale sont codés par l'exon 8 du gène *WFS1* (Figure 9). La demi-vie de la protéine a été évaluée à environ deux jours (Hofmann et al., 2003).



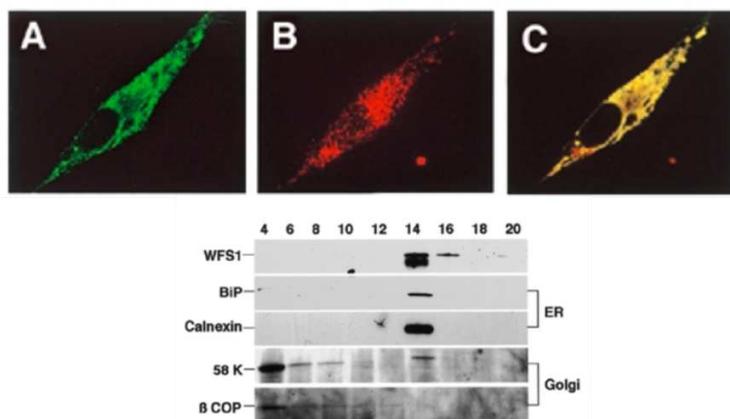
**Figure 9 : Représentation schématique de la wolframine et mutations associées**

(Modifié d'après De Heredia et al., 2013 (figure gauche haut) Inoue et al., 1998 (figure gauche bas) ; et Qian et al., 2015 (figure droite))

*Gauche.* La majeure partie des mutations identifiées à ce jour dans le gène se situent dans l'exon 8 codant pour la partie transmembranaire et C-terminale de la protéine. *Droite.* Ces mutations sont représentées de manière schématique sur la wolframine.

### Localisation

C'est en 2001 qu'une étude met en évidence la localisation de la protéine au niveau de la membrane du RE (Takeda et al., 2001). Réalisée sur de nombreux types cellulaires humains (CCD-1059Sk, Hela, HL-60, HepG2) et animaux (COS-7, PC12), l'étude a permis d'observer une co-expression ainsi qu'une co-localisation de la wolframine avec des marqueurs du RE tels que BIP (*Binding Immunoglobulin Protein*, également connue comme HSPA5, *Heat Shock 70KDa Proteins 5* ou encore GRP78), la calnexine et la concanavaleine A (Figure 10). Cette observation a par la suite été confirmée par d'autres études notamment dans des cellules RIN, INS-1 832/13 et des cellules  $\beta$ -pancréatiques de souris (Hofmann et al., 2003 ; Fonseca et al., 2005).



**Figure 10 : Localisation de la wolframite dans des cellules COS-7**

(D'après Takeda et al., 2001)

La wolframite (A, vert) ainsi que la concanavaleine A (B, rouge, marqueur du RE) ont été identifiés comme co-localisés par immunomarquage (C, jaune). Ces observations ont été renforcées par une analyse de protéines par western-blot qui a montré que la WFS1 était observée dans la fraction dans laquelle BIP, la calnexine ainsi que 58K étaient exprimées.

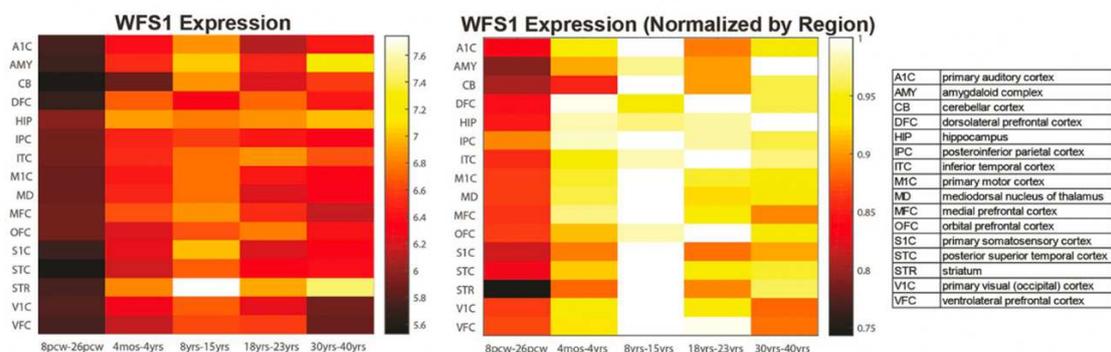
Par ailleurs, la présence de la protéine a également été rapportée dans la membrane des granules sécrétoires de cellules  $\beta$ -pancréatiques de souris (Hatanaka et al., 2011) et de neuroblastomes humains (Gharanei et al., 2013).

### ***Expression de la wolframite : chez l'Homme***

La wolframite est une protéine ubiquitaire, cependant son niveau d'expression diffère selon les cellules et évolue au cours du développement humain. Celle-ci est faible au stade foetal (14-16 semaines de gestation) et augmente graduellement avec le temps selon les organes (De Falco et al., 2012). Une étude ayant pour objectif la classification globale des protéines chez l'Homme a permis de rapporter une expression plus importante du gène *WFS1* dans certains tissus tels que les organes reproducteurs (ovaires, testicules), les poumons, la vessie, le tissu adipeux et le cerveau (Fagerberg et al., 2014 ; analyse disponible à l'adresse suivante : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7466/?report=expression>). De manière globale, la WFS1 est observée de façon plus importante dans certains types tissulaires à l'âge adulte dont le pancréas et le cerveau mais aussi les muscles striés et lisses (Strom et al., 1998 ; Hofmann et al., 2003 ; De Falco et al., 2012). Les cellules qui constituent le pancréas et le cerveau, à savoir respectivement les cellules  $\beta$ -pancréatiques des îlots de Langerhans et les neurones, possèdent certaines similarités comme l'expression du

récepteur du glutamate, la glutamate décarboxylase, les récepteurs des neurotrophines, ainsi que les protéines des neurofilaments (Atouf et al., 1997). Ce sont également des cellules particulièrement atteintes chez les patients (Barrett et al., 1995).

Une étude réalisée en 2019 fondée sur le croisement de données obtenues dans le cadre du projet *BrainSpan Atlas* (<http://www.brainspan.org>) a permis d'analyser l'expression spatio-temporelle du gène *WFS1* dans le cerveau. L'analyse a mis en évidence une expression importante entre 8 et 15 ans notamment dans le cortex primaire de l'audition, le cortex cérébelleux, le cortex moteur primaire, le noyau médiodorsal du thalamus (Figure 11) (Samara et al., 2019). Cela suggère que la wolframine pourrait être plus active au début du développement du cerveau par rapport à l'âge adulte. Il a été montré que cette période correspondant à la fin de l'enfance et au début de l'adolescence se superpose à une période de myélinisation active dans le développement. La période de myélinisation varie en fonction des régions corticales et sous-corticales mais un changement dynamique de ce phénomène a été observé à la préadolescence et à l'adolescence dans la formation de l'hippocampe (Benes et al., 1994).

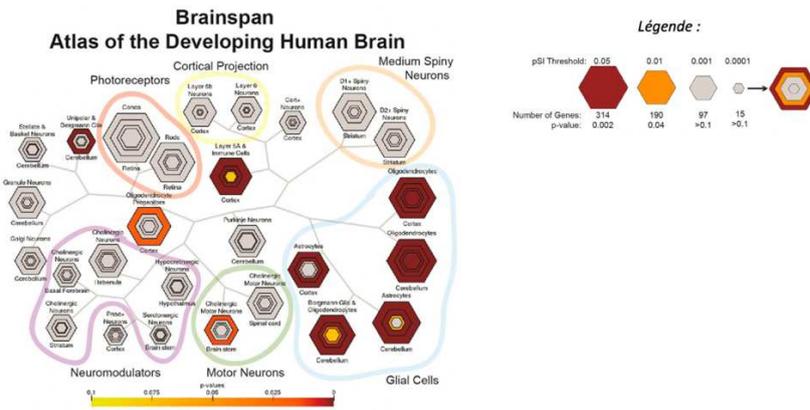


**Figure 11 : Expression de *WFS1* au cours du temps dans les différentes zones cérébrales**

(Samara et al., 2019)

Gauche. Expression spatio-temporelle moyenne de *WFS1* dans 16 régions du cerveau et 5 périodes de développement de la base de données BrainSpan (8-26 semaines post-conceptionnelles (pcw), 4 mois - 4 ans, 8 ans - 15 ans, 18 ans - 23 ans et 30 an - 40 ans). Droite. Expression spatio-temporelle moyenne de *WFS1* normalisée par rapport à l'expression de chaque région du cerveau à travers le temps.

Une analyse plus poussée de cette équipe a montré que les gènes qui corrélerent à l'expression de *WFS1* sont des gènes enrichis dans les oligodendrocytes et les astrocytes dans le cortex et le cervelet (Figure 12).

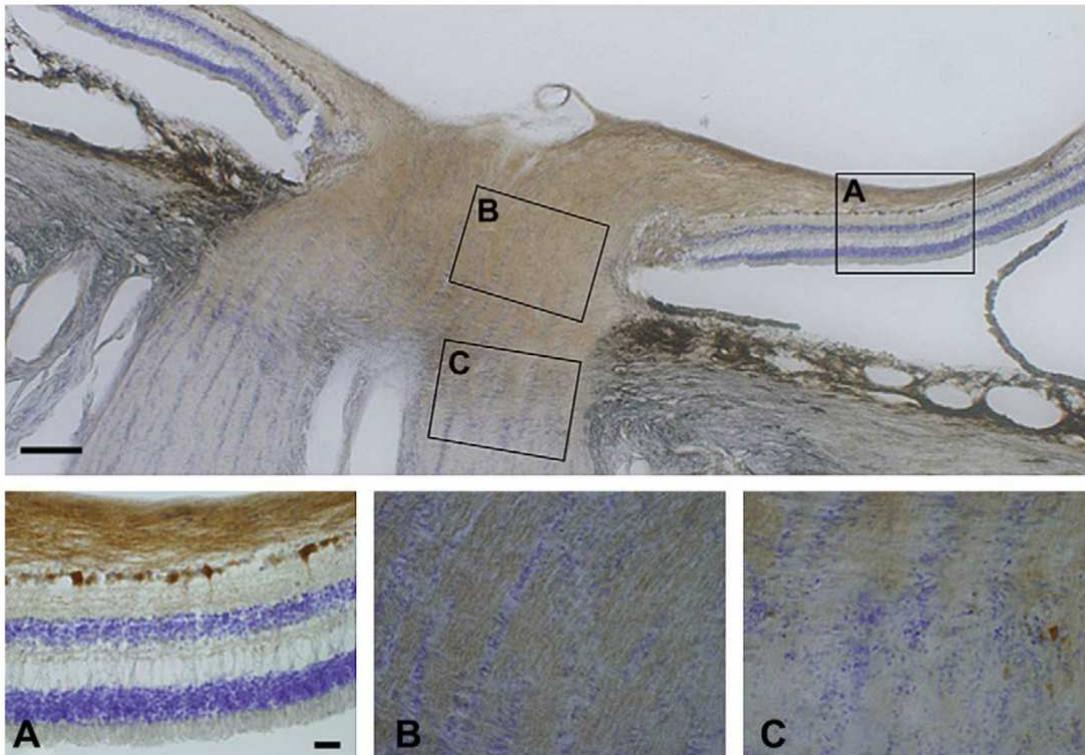


**Figure 12 : Expression type cellulaire-spécifique de gènes corrélés à WFS1 dans le cerveau humain**

(Samara et al., 2019)

Expression spécifique du type de cellule dans le cerveau humain des gènes liés à *WFS1*.

L'expression de la wolframine a également été décrite dans l'œil humain. Son expression a été particulièrement observée dans les RGC et dans différentes couches de la rétine dont l'épithélium pigmentaire (RPE) (Figure 13) (Schmidt-Kastner et al., 2009).



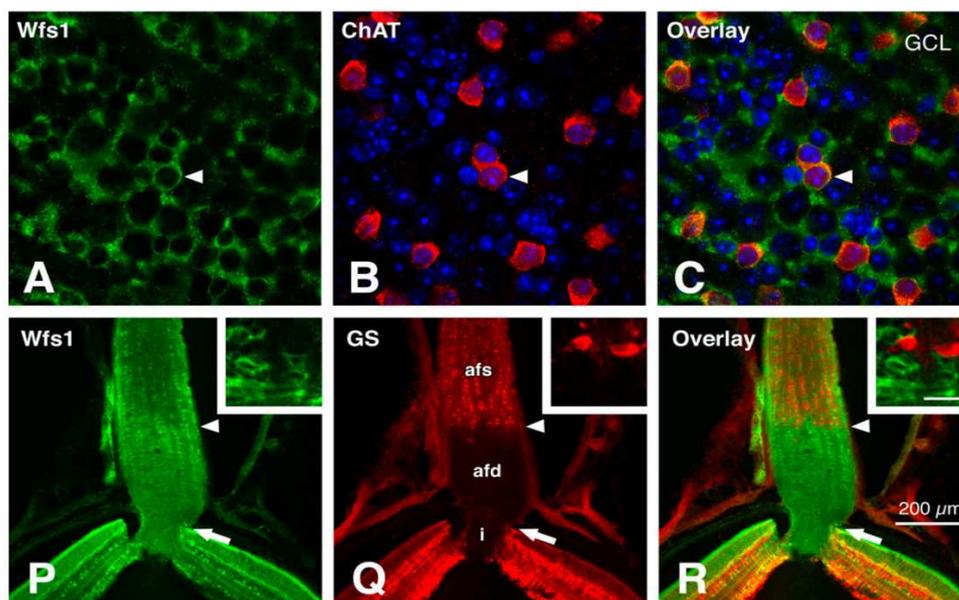
**Figure 13 : Immunomarquage de la wolframine dans la rétine et le nerf optique humains**

(Schmidt-Kastner, 2009)

La wolframine est observée de façon intense dans la rétine (A), de manière plus modérée dans la tête du nerf optique avec un marquage des axones des cellules ganglionnaires de la rétine (B) et de manière réduite à l'interface de la myélinisation de la transition du nerf optique (C).

### *Expression de la wolframine : dans les modèles animaux*

L'étude de l'expression de la wolframine, ainsi que son rôle dans l'organisme via les modèles animaux, a permis de rapporter sa présence dans de nombreux organes. Dans le cerveau, la protéine a été rapportée exprimée de manière plus ou moins importante dans les différentes zones cérébrales chez le rat et la souris (Takeda et al., 2001 ; Luuk et al., 2008, Kawano et al., 2009 ; Plaas et al., 2017). Une forte détection se distingue cependant dans le système limbique, les tubercules olfactifs, le tronc cérébral et le noyau réticulaire thalamique (Takeda et al., 2001 ; Philbrook et al., 2005 ; Luuk et al., 2008, Kawano et al., 2008). Concernant l'expression de l'ARNm de *WFS1*, une étude réalisée dans le cerveau de souris a montré qu'elle était initiée pendant l'embryogenèse tardive (E15.5 et plus) dans le striatum dorsal et l'amygdale, puis dans d'autres régions après la naissance (Tekko et al., 2014). L'expression de l'ARNm de *WFS1* est dynamique et corrélée avec celle des gènes *SYN1* (Synapsine 1) et *DRD1* (Récepteur D1 Dopamine), dont les expressions sont observées dans les cellules nerveuses au cours de la différenciation neuronale (De Camilli et al., 1983 ; Tekko et al., 2014 ; 2017). La wolframine a également été observée dans des rétines de souris (Kawano et al., 2008) (Figure 14) et de singes (Yamamoto et al., 2006).



**Figure 14 : Expression de WFS1 dans l'œil de souris**

(D'après Kawano et al., 2008)

La wolframine est détectée dans différents types cellulaires constituant l'œil chez la souris. Les cellules ammacrines (panel du haut), ChAT : *Choline AceTyltransferase*, ainsi que le nerf optique (panel du bas) GS : *Glutamine Synthetase* (marqueur des cellules gliales).

En raison de la prévalence importante du DM chez les patients, les cellules  $\beta$ -pancréatiques sont largement étudiées. Ainsi, l'expression de la wolframine dans ces cellules a été rapportée dans de nombreux modèles rongeurs (Ishihara et al., 2004 ; Ueda et al., 2005 ; Philbrook et al., 2005 ; Hatanaka et al., 2011). La wolframine a également été observée dans un autre type de cellules du pancréas, les cellules delta, par l'intermédiaire d'une co-expression avec la somatostatine (Ishihara et al., 2004 ; Ueda et al., 2005). Ces études montrent également que cette expression n'est pas partagée avec les autres cellules du pancréas, à savoir les cellules alpha (sécrétion du glucagon) et les cellules gamma (sécrétion du polypeptide pancréatique).

### III) Mécanismes et rôles physiologiques de la wolframine

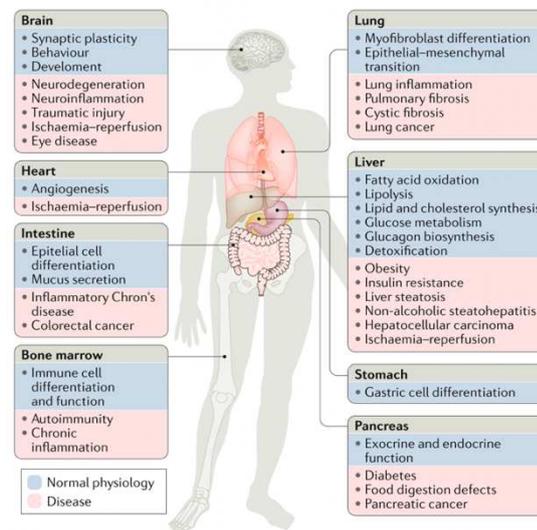
De par sa localisation au niveau de la membrane du RE, la fonction de la wolframine dans l'homéostasie de cet organite a été investiguée dans de nombreuses études. Le RE est une grande structure dynamique impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires dont la synthèse de protéines, le métabolisme des lipides, et le stockage du calcium (Schwarz and Blower, 2016). Il a ainsi été démontré que la WFS1 est une protéine multifonctionnelle, jouant un rôle important dans la réponse au stress du RE, l'homéostasie calcique, le fonctionnement mitochondrial et plus particulièrement des MAMs, ainsi que dans la biosynthèse, la sécrétion et la dégradation de protéines.

#### A) L'*Unfolded Protein Response (UPR)* et la wolframine

##### 1) Généralités sur l'UPR

L'homéostasie du RE est un équilibre fragile et très dynamique car l'organite est mis à l'épreuve de manière constante. Étant le siège de modifications post-traductionnelles d'un grand nombre de protéines, toute perturbation de cet équilibre telle qu'un fort besoin protéique peut engendrer un défaut de leur repliement et une accumulation de celles-ci dans la lumière du RE sous forme mal conformées. Une situation de stress du RE débute alors. Pour répondre à ce stress, assurer un bon

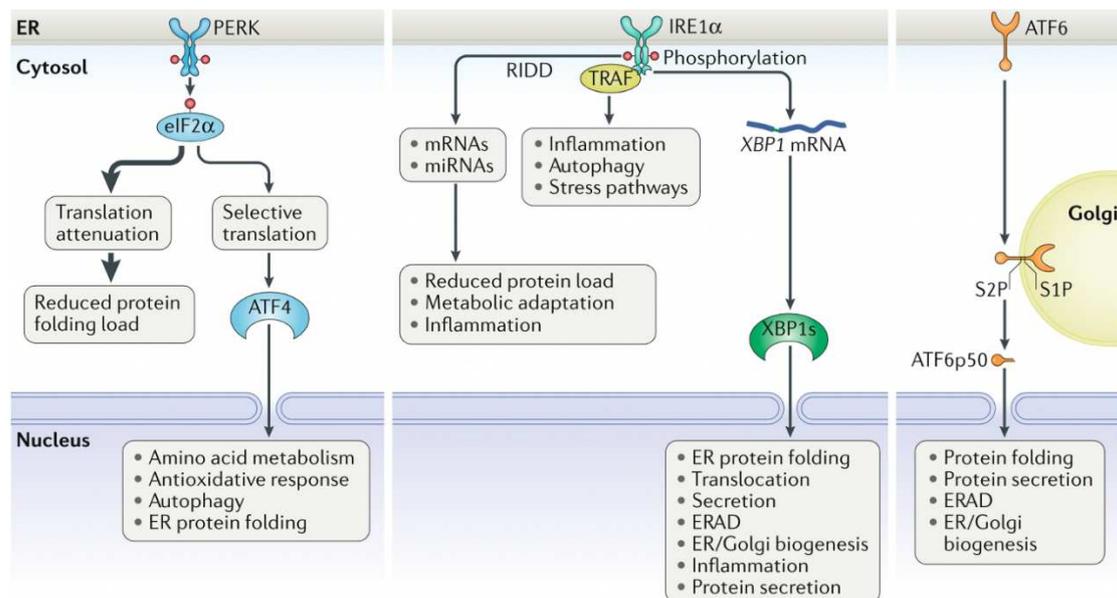
repliement des protéines et maintenir la physiologie du RE, une réponse aux protéines mal conformées, l'*Unfolded Protein Response*, s'active. L'UPR fonctionne comme un mécanisme de rétroaction homéostatique qui intègre des informations sur l'intensité et la durée des stimuli de stress pour rétablir la protéostasie ou induire l'apoptose. A ce jour, l'implication de l'UPR a été rapportée dans de nombreux mécanismes physiologiques, dont la plasticité synaptique (Sossin and Costa-Mattioli, 2019) et le développement cérébral (Hetz, 2020 ; 2021), mais aussi pathologiques, comme dans des maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer (MA) (Figure 15) (Hetz and Saxena, 2017 ; Gerakis and Hetz, 2018).



**Figure 15 : Implication de l'UPR dans des mécanismes physiologiques et physiopathologiques**  
(Hetz et al., 2020)

L'UPR est constituée de trois voies de signalisation principales dont l'activation s'effectue via des protéines transmembranaires du RE : la voie PERK (*Protein Kinase RNA-like ER protein Kinase*), la voie IRE1 $\alpha$  (*Inositol Requiring Enzyme 1*) et la voie ATF6 $\alpha$  (*Activating Transcription Factor 6*) (Kaufman, 2003) (Figure 16). L'un des premiers acteurs de l'activation de l'UPR à avoir été identifié est BIP (Bertolotti et al., 2000), une chaperonne abondante dans le RE (Hetz et al., 2020). Deux modèles différents ont été proposés pour l'activation de l'UPR. Dans le modèle indirect, la détection du stress du RE est couplée à la capacité de repliement du RE et gouvernée par la disponibilité de chaperonnes telles que BIP, qui se lie à PERK, IRE1 $\alpha$  et ATF6 par

leurs domaines situés dans la lumière du RE, maintenant les protéines sous une forme inactive. En condition de stress du RE, BIP va se lier préférentiellement aux protéines mal repliées, se dissociant de PERK et IRE1, entraînant leur dimérisation et leur trans-autophosphorylation. Alternativement, des études récentes suggèrent un modèle de reconnaissance directe dans lequel les protéines mal repliées se lient à IRE1 $\alpha$ , et éventuellement à PERK, induisant leur dimérisation et leur activation (Hetz et al., 2019).



**Figure 16 : Voies de signalisation constituant l'UPR**

(Hetz et al., 2020)

Trois branches majeures de l'UPR : (1) PERK par une phosphorylation du facteur eIF2 $\alpha$  induit une réduction globale de l'initiation de la traduction des ARNm à l'exception de certains dont ATF4 qui va activer la transcription de gènes cibles de l'UPR impliqués dans la voie de biosynthèse des acides aminés, la réponse antioxydante, l'autophagie et l'apoptose. (2) La RNase IRE1 $\alpha$  épisse l'ARNm *XBP1* produisant ainsi la protéine XBP1s (spliced XBP1), qui active l'expression des gènes cibles de l'UPR impliqués dans la protéostasie du RE et la physiopathologie cellulaire. La RNase IRE1 $\alpha$  peut également induire la dégradation d'ARN par la voie IRE1-dépendante (RIDD), modulant la charge de repliement des protéines, le métabolisme cellulaire, l'inflammation et les voies de signalisation de l'inflammasome. (3) ATF6 transite du RE vers l'appareil de Golgi, où il est clivé par la protéase site-1 (S1P) et la protéase site-2 (S2P), ce qui donne un fragment ATF6 cytosolique actif (ATF6p50). Celui-ci migre vers le noyau, activant la transcription des gènes cibles de l'UPR de l'homéostasie du repliement des protéines du RE et la physiologie cellulaire. En outre, les protéines dépliées ou mal repliées accumulées dans la lumière du RE peuvent être dégradées par le mécanisme de dégradation des protéines associées au RE (ERAD), basé sur le protéasome, qui est régulé par les branches de l'UPR médiées par ATF6 et/ou IRE1 $\alpha$ -X-box-binding protein 1 (XBP1).

### **La voie PERK**

Lors d'un stress du RE, la kinase PERK phosphoryle la sous-unité- $\alpha$  du facteur d'initiation de la traduction eIF2 $\alpha$  (*eukaryotic Initiation Factor 2*). Cela a pour conséquence d'atténuer la synthèse protéique (Kaufman, 2003 ; Ron and Walter, 2007). Ainsi, la charge de protéines mal repliées et l'afflux de protéines néosynthétisées sont

limités dans le RE. Simultanément, eIF2 $\alpha$  initie la traduction d'ARNm dont ceux codant pour ATF4 (*Activating Transcription Factor 4*). Ce facteur de transcription est inductible par le stress et va activer à son tour l'expression de gènes impliqués dans la synthèse des acides aminés, la synthèse des protéines, l'homéostasie redox, l'autophagie et l'apoptose (Wang and Kaufman, 2016). ATF4 est impliqué dans la boucle de rétroaction de déphosphorylation de eIF2 $\alpha$ , permettant la restauration de la synthèse protéique lorsque le stress est terminé. Le rôle de la voie PERK, et notamment des différents facteurs qui la constituent, a été démontré dans différents mécanismes dont la survie des cellules  $\beta$ -pancréatiques (Back et al., 2009), la production de cytokines pro-inflammatoires (Iwasaki et al., 2014) mais également dans des formes de diabètes rares comme dans le syndrome de Wolcott-Rallison (Deléprine et al., 2000) et le cancer (Urrea et al., 2016).

### ***La voie IRE1 $\alpha$***

La voie IRE1 $\alpha$  est composée d'une protéine kinase/endoribonucléase qui, lors d'une situation de stress du RE, s'oligomérisent et s'autophosphorylent pour initier son activité RNase (Zhou et al., 2006). Un intron de 26 nucléotides de l'ARNm codant le facteur de transcription XBP1 (*X-Box-binding Protein 1*) est alors excisé, entraînant ainsi un décalage de son cadre de lecture (Yoshida et al., 2001). Le facteur de transcription XBP1 devient actif, et devient XBP1s (*XBP1 spliced*). Celui-ci joue un rôle dans la régulation des gènes impliqués dans la translocation, le repliement et la sécrétion des protéines du RE, ainsi que ceux impliqués dans la dégradation des protéines mal repliées (Kaufman, 2002). IRE1 $\alpha$  peut également dégrader des ARNm et miARN (micro ARN) par son domaine RNase via la voie RIDD (*Regulated IRE1-dependant Decay*). Ce processus est impliqué dans le repliement des protéines, le métabolisme cellulaire, l'inflammation et les voies de signalisation de l'inflammasome (Hetz et al., 2020)

### ***La voie ATF6***

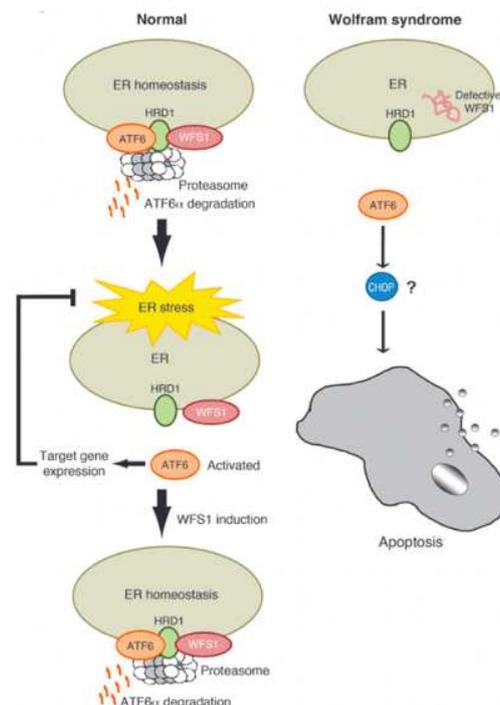
L'activation de la voie ATF6 débute par le transfert de la forme complète d'ATF6, à savoir ATF6p90 du RE vers l'appareil de Golgi. La protéine est ensuite clivée par une

protéase de site 1 (S1P) et une protéase de site 2 (S2P). Le facteur de transcription ATF6p50 est alors libéré et transite vers le noyau, où il va induire l'expression de certains gènes (Haze et al., 1999). L'interaction entre ATF6p50 et XBP1s permet de réguler la transcription de gènes codant pour les chaperonnes et enzymes du RE impliquées dans la translocation, le repliement, la maturation et la sécrétion des protéines du RE, mais aussi dans la dégradation des protéines mal conformées (Shoulders et al., 2013). Ces deux facteurs de transcription augmentent la capacité de sécrétion de la cellule en situation de stress et favorisent la biogenèse du RE (Sriburi et al., 2004 ; Bommasamy et al., 2009).

## 2) Relation entre l'UPR et la wolframine

Bien que le rôle de la wolframine dans l'activité ionique du RE ait été mis en évidence au début des années 2000 (Osman et al., 2003), suggérant ainsi une implication de la protéine dans l'homéostasie de cet organite, le lien entre la wolframine et l'UPR n'a été démontré qu'à partir de 2005. En effet, réalisée sur des cellules de souris, une étude a montré que l'absence d'expression de WFS1 dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques était corrélée à une augmentation de l'activation des voies PERK et IRE1 $\alpha$  (Fonseca et al., 2005). Cela a été mis en évidence principalement dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques de différents modèles comme les cellules INS-1 832/13 (Fonseca et al., 2005 ; Lu et al., 2014 ; Morikawa et al., 2022 ) et MIN6 (Ueda et al., 2005 ; Fonseca et al., 2010), des modèles animaux (Ishihara et al., 2004 ; Riggs et al., 2005 ; Yamada et al., 2006 ; Plaas et al., 2017), ainsi que des cellules  $\beta$ -pancréatiques différenciées à partir de cellules souches pluripotentes induites (CSPi) issues de patients (Shang et al., 2014 ; Maxwell et al., 2020). Il a également été montré que l'induction d'un stress du RE conduit à une augmentation de la quantité d'ARNm de *WFS1*, ainsi que de la quantité de wolframine (Ueda et al., 2005). De plus, il a été décrit que la régulation de la production d'insuline par les cellules  $\beta$ -pancréatiques est corrélée à l'UPR (Lipson et al., 2006). En réponse à des hautes doses de glucose, la phosphorylation de IRE1 est couplée à la biosynthèse de l'insuline.

En 2010, il a été mis en évidence que la wolframine régule de manière négative la voie ATF6 (Fonseca et al., 2010). En effet, en condition physiologique, WFS1 se lie à l'ubiquitine ligase E3 HRD1 (*E3 HydroxyMethyl Glutaryl-Coenzyme A reductase degradation protein 1*) permettant l'ubiquitination d'ATF6 et ainsi sa dégradation par le protéasome. Lors d'un stress du RE, ATF6 $\alpha$  est libéré de la wolframine et va s'activer comme décrit précédemment. Cependant, chez les patients, la protéine n'est pas liée à ATF6 qui n'est donc pas dégradée par le protéasome : la voie entre alors en hyperactivation. Dans ce sens, une augmentation d'ATF6 $\alpha$  a été observée dans différentes études (Figure 17) (Yamada et al., 2006 ; Gharanei et al., 2013). Cette activation anormale conduit à une activation des gènes impliqués dans l'apoptose tels que *XBP1s*, *ATF4*, *CHOP* (*C/EBP homologous protein*, connu également comme *DDIT3 DNA damage-inducible transcript 3*) et entraîne la mort des cellules (Rigoli et al., 2022).



**Figure 17 : Représentation schématique de l'interaction de la wolframine avec ATF6 $\alpha$  par le biais de HRD1**  
(Fonseca et al., 2010)

En condition physiologique (Normal) la dégradation d'ATF6 $\alpha$  par le protéasome est induite après son ubiquitination par HRD1. Lors d'un stress du RE, ATF6 $\alpha$  se dissocie du WFS1, subit un clivage et induit l'expression de gènes cibles du stress du RE afin de réguler cette situation. En situation pathologique (Wolfram syndrome) ATF6 $\alpha$  échappe à la dégradation du protéasome. Cette hyperactivation conduit à l'apoptose des cellules.

L'une des conséquences d'un stress élevé du RE est l'induction de l'apoptose des cellules (Haufman, 2003). Ainsi, en parallèle d'un stress du RE supérieur, l'augmentation de l'expression des acteurs des mécanismes d'induction de l'apoptose a été observée dans les différents modèles du SW1. Il a notamment été observé une augmentation de la protéine P21<sup>ciP</sup> (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1*) dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques de souris (Yamada et al., 2006) et dans un modèle cellulaire issu de neuroblastomes humains (Gharanei et al., 2013). Cette protéine est connue pour inhiber les complexes CDK2 (*Cyclin-Dependant Kinase 2*) et CDK4 (*Cyclin-Dependant Kinase 4*) entraînant l'arrêt du cycle cellulaire (Besson et al., 2008), et est régulée par p53 (*Tumor Protein 53*) (Gartel and Tyner, 1999). Une augmentation d'autres acteurs de l'apoptose tels que CHOP, la forme clivée de la caspase 3, GADD34 (*growth arrest and DNA damage-inducible protein*), l'Annexine V a aussi été décrite (Ishihira et al., 2004 ; Riggs et al., 2005 ; Yamada et al., 2006 ; Plaas et al., 2017 ; Lu et al., 2014 ; Rigoli et al., 2022). De même, une augmentation de l'autophagie dont le marqueur LC3 (*Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*) a été rapportée dans des fibroblastes de patients et des neurones de souris dont l'expression de *wfs1* est altérée (Crouzier et al., 2022). L'autophagie est un processus d'auto-digestion qui s'active notamment en réponse à l'activation de l'UPR et permet au RE de se stabiliser (Hetz et al., 2020).

Bien que de nombreux modèles de la maladie présentent un stress du RE augmenté de façon basale, il est cependant important de relever que ce phénotype est tissu-spécifique et n'implique pas toujours les mêmes voies de l'UPR. En effet, le modèle rat du syndrome développé par une équipe estonienne présente un stress augmenté dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques, avec uniquement une augmentation de BIP dans la medulla du pont de l'olive bulbaire (Plaas et al., 2017). De plus, un modèle de drosophile généré en 2018 par une équipe japonaise, ne présente ni stress du RE ni activation de la voie apoptotique augmentés bien qu'une neurodégénérescence et une mort prématurée soient observées (Sakakibara et al., 2018). Enfin, une analyse protéomique réalisée sur des NSC (Neural Stem Cell, cellules souches neurales)

dérivées à partir de CSPi porteuses de mutation causale du SW1 a montré que l'expression de protéines associées à l'UPR était plus faible dans les cellules mutées en situation basale (absence de stress) (Zmyslowska et al., 2021). L'induction d'un stress du RE par un traitement à la tunicamycine induit une augmentation de l'expression de ces protéines dans les cellules contrôles et mutées bien que plus importante dans les cellules mutées.

Malgré le fait que l'implication de la wolframine dans l'homéostasie de l'UPR ait été identifiée et plus particulièrement la régulation négative de celle-ci sur la voie ATF6, les mécanismes ne sont pas similaires d'une étude à l'autre. En effet, des activations différentes et des intensités variables d'une étude à l'autre et donc d'un modèle à l'autre sont rapportées. Ces résultats suggèrent ainsi que les mécanismes physiologiques de la wolframine sont variés.

## **B) L'homéostasie calcique**

Les ions calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) sont à l'origine de signaux intracellulaires essentiels dans une grande variété de fonctions dont la régulation du cycle cellulaire et la mort cellulaire (Lu and Means, 1993 ; Berridge et al., 2000 ; Orrenius et al., 2003). Le RE est un lieu de stockage majeur du calcium intracellulaire (Schwarz and Brower, 2016). Afin de maintenir un équilibre calcique, cet ion peut être rapidement capté de sources extracellulaires par des protéines cytoplasmiques et/ou de sources intracellulaires via des organites dont le RE et les mitochondries. La perturbation de cette homéostasie calcique intracellulaire a été décrite dans de nombreuses pathologies sévères dont la maladie d'Alzheimer (Magi et al., 2016) et le diabète mellitus (Gilon et al., 2014). Les patients atteints du SW1 souffrant de ce type de diabète, et de par la localisation de la wolframine à la surface du principal lieu de stockage du  $\text{Ca}^{2+}$ , il est très vite apparu pertinent d'étudier le rôle de la protéine dans l'homéostasie calcique du RE. C'est en 2003 que son implication dans l'homéostasie du calcium intracellulaire a été suggérée (Osman et al., 2003). Bien que cette étude n'ait pas permis d'établir le rôle précis de la protéine dans l'homéostasie du calcium, elle a mis en évidence qu'une sur-expression

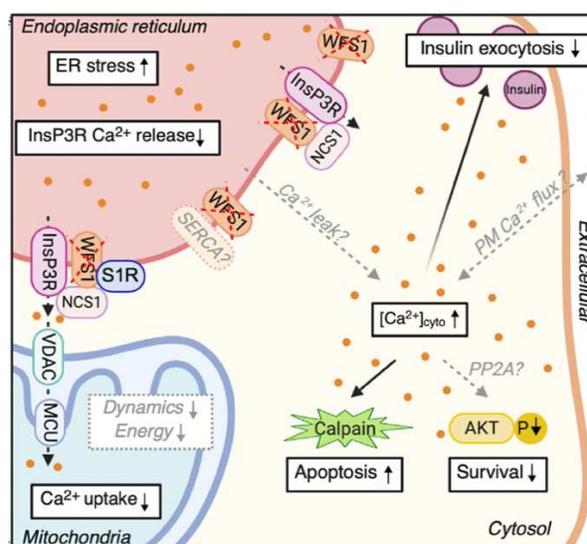
de la protéine dans des ovocytes de Xénope induisait une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique libre au repos ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$ ), émettant ainsi l'hypothèse que WFS1 serait un nouveau canal calcique. Par la suite, cette  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$  augmentée a été décrite *in vivo* et *in vitro* dans différents modèles de la maladie (Lu et al., 2014 ; Cagalinec et al., 2016 ; Nguyen et al., 2020). Des études ont également rapporté l'absence de différence de concentration calcique entre les cellules contrôles et les cellules transfectées avec un siRNA dirigé contre WFS1 (Zatyka et al., 2015). L'origine de cette élévation du  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$  n'est pas clairement déterminée dans le cadre du SW1. Les dysfonctionnements majeurs du RE décrits précédemment pourraient en être à l'origine. Le rôle de la wolframine dans la séquestration du calcium du réticulum endoplasmique ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ ) par le biais de son interaction avec l'ATPase de transport du calcium dans le réticulum sarco-endoplasmique (SERCA), reste encore incertain (Lu et al., 2014 ; Zatyka et al., 2015). Avant de se retrouver dans le cytosol après son stockage dans le RE, une partie du calcium est transférée dans les mitochondries. L'ion leur est indispensable afin de réaliser le cycle de Krebs et, entre autres, alimenter la cellule en énergie (Marchi et al., 2018). Ainsi, une concentration de calcium mitochondrial  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mito}}$  diminuée dans différents modèles mutés a été rapportée. C'est notamment le cas après un traitement des cellules avec des molécules stimulant la sortie du calcium du RE telles que la bradykinine, le glucose, le glutamate (Zatyka et al., 2015 ; La Morgia et al., 2020 ; Angebault et al., 2020 ; Crouzier et al., 2022). Ces résultats mettent en évidence qu'à la suite d'une stimulation, le relargage du  $\text{Ca}^{2+}$  du RE aux mitochondries est réduit. Les interactions et échanges entre les deux organites semblent plus sensibles aux stimulations en l'absence de la wolframine. Il est suggéré que l'augmentation de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyto}}$  ait pour origine un influx augmenté mais une seconde hypothèse suggère au contraire que l'origine soit une diminution de l'efflux via la membrane plasmique de la cellule. Cette dernière est alimentée par le fait que WFS1 régulerait positivement l'expression de la sous-unité  $\beta 1$  de l'ATPase sodium/potassium ( $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase  $\beta 1$ ), ce qui entraînerait une réduction de l'activité de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase et de l'échangeur sodium-calcium (NCX), notamment dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques déficientes

(Zatyka et al., 2008). L'étude de l'impact de la déficience en WFS1 sur les canaux calciques voltage-dépendants et sur les canaux calciques dépendants du stockage, semble particulièrement pertinente pour de prochaines recherches (Fischer and Enrilch, 2020). Il est également suggéré que la wolframine active la voie de libération du  $\text{Ca}^{2+}$  médiée par le récepteur de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3R), un canal calcique intracellulaire situé sur la membrane du réticulum endoplasmique jouant un rôle primordial dans la régulation du  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. Dans les modèles Wolfram, la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  du RE via le récepteur IP3R est altérée, suggérant que WFS1 soit un régulateur positif de  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$  par le biais de celui-ci (Cagalinec et al., 2016 ; Angebault et al., 2018 ; Nguyen et al., 2020 ; La Morgia et al., 2020). Bien qu'une étude ait mis en évidence que le récepteur et la wolframine co-précipitaient, à ce jour, une interaction directe n'est pas identifiée (Angebault et al., 2018). De plus, aucune différence d'expression de IP3R1 et IP3R3 n'a été observée dans les cellules INS1 déficientes en WFS1 (Nguyen et al., 2020), suggérant l'existence d'acteurs intermédiaires.

Parmi les différents candidats, le capteur de calcium neuronal NCS1 (*Neuronal Calcium Sensor 1*) a été identifié comme interagissant directement avec WFS1 et IP3R (Angebault et al., 2018 ; Nguyen et al., 2019 ; Crouzier et al., 2022). En plus d'une quantité diminuée de NCS1, il a été montré que la surexpression de celui-ci permettait la restauration de l'homéostasie calcique dans des cellules modélisant la pathologie (fibroblastes et cellules  $\beta$ -pancréatiques) (Angebault et al., 2018 ; Nguyen et al., 2020). Le dysfonctionnement de l'IP3R peut également être secondaire à des mécanismes physiopathologiques corrélés à la perte de la wolframine comme, par exemple, le stress du RE (Higo et al., 2010). Un autre candidat est le récepteur sigma 1 (S1R). Il a récemment été mis en évidence dans différents modèles (modèle souris, poisson zèbre et fibroblastes de patients) que le récepteur aux chaperonnes interagissait avec IP3R et WFS1 (Crouzier et al., 2022). De plus, l'utilisation d'un agoniste de celui-ci, le PRE-084, permet de corriger le défaut calcique dans le modèle de fibroblastes (Crouzier et al., 2022).

Enfin, il a été décrit une augmentation de la spectrine alpha II clivée, substrat de la calpaïne 2, dans différentes cellules INS-1 832/13, NSC34, ainsi que dans le cerveau et les cellules  $\beta$ -pancréatiques de souris Wolfram (Hara et al., 2014 ; Lu et al., 2014). Une activité augmentée des calpaïnes (*calcium-dependent protease with papain-like activity*) a aussi été observée dans les cellules INS1 (Nguyen et al., 2020). Les calpaïnes sont des protéases à activité de type papaine, dépendantes du calcium. Elles possèdent de nombreux rôles physiologiques mais également pathologiques (Czogalla and Sikorski, 2005 ; Zatz and Starling, 2005). Enfin, il a été montré que leur inhibition par le biais de molécules permet de restaurer l'homéostasie calcique, ainsi que la sécrétion d'insuline dans des cellules INS1 déficientes en wolframine (Nguyen et al., 2020).

Pour conclure, un défaut de l'homéostasie calcique a été décrit dans de nombreux modèles variés. Celui-ci semble induire une cascade de réactions ayant des impacts sur la survie et sur le cytosquelette des cellules. Différents partenaires de WFS1 ont été identifiés dont IP3R, NCS1 et S1R. Les mécanismes physiologiques de la protéine restent cependant à éclaircir, notamment son implication tissu-spécifique. Les connaissances actuelles de son rôle dans l'homéostasie calcique peuvent être synthétisées dans la figure 18 :



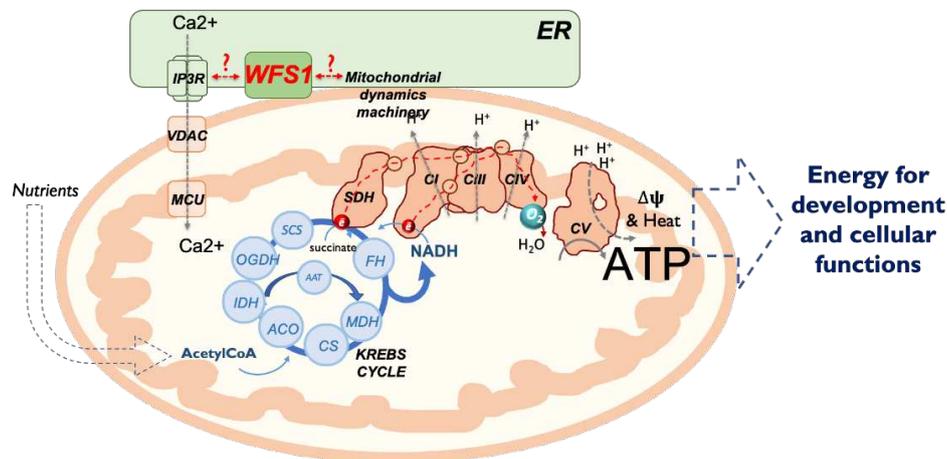
**Figure 18 : Mécanismes moléculaires impliqués dans les défauts calciques en absence de WFS1**

(Modifié d'après Fischer and Elrich, 2020 ; Crouzier et al., 2022)

Les interactions entre WFS1 et plusieurs partenaires dont NCS1, S1R, InsP3R ont été décrites à ce jour. L'absence de la wolframine est à l'origine d'un déséquilibre de l'homéostasie calcique, au niveau des mitochondries ainsi qu'au niveau du cytosol.

### C) Wolframine, mitochondries et MAMs

Un autre type d'organe clé de la cellule est la mitochondrie. Les mitochondries sont indispensables pour le fonctionnement de la cellule par le biais de leur structure et de leurs fonctions. Également appelées « centrale énergétique » de la cellule, elles ont plusieurs fonctions, dont celle de générer de l'ATP (Adénosine TriPhosphate) grâce à la chaîne respiratoire mitochondriale. Celle-ci est constituée de différents complexes protéiques (complexes I à V) dont une ATP synthase, et est essentielle pour le maintien de diverses fonctions physiologiques (figure 19).



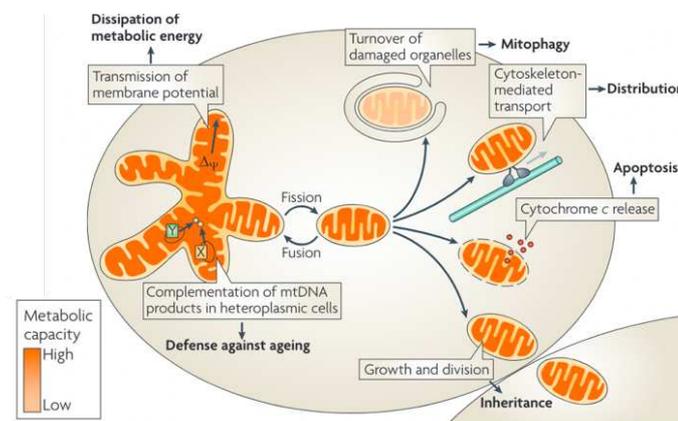
**Figure 19 : Représentation schématique de la chaîne respiratoire mitochondriale et du cycle de Krebs**  
(Schéma du Dr Rak)

Afin d'apporter l'énergie indispensable aux cellules, les mitochondries réalisent la respiration cellulaire, ensemble de réactions permettant la conversion du glucose en ATP. Pour cela, de nombreux acteurs sont impliqués dont le cycle de Krebs. SDH : Succinate déshydrogénase (DH) ; CI : NADH ubiquinone oxydoréductase ; CIII : complexe cytochrome bc1 ; CIV : cytochrome c oxydase ; CV : ATP synthase ; FH : fumarase ; MDH : malate DH ; CS : citrate synthase ; ACO : aconitase ; IDH : isocitrate DH ; OGDH : alpha-cétoglutarate DH ; SCS : Succinyl-CoA synthétase ; IP3R : récepteur à l'inositol triphosphate ; VDAC : Voltage-Dependent-Anion-Channel ; MCU : Mitochondrial Calcium Uniporter ; WFS1 : Wolfram Syndrome 1 ; ER : réticulum endoplasmique

Dans le système nerveux central (SNC), l'activité mitochondriale est essentielle dans des processus variés tels que la neuroplasticité, la différenciation neuronale et la production de neurotransmetteurs (Caicedo et al., 2021). Des dysfonctionnements mitochondriaux ont été rapportés dans de nombreuses maladies neurodégénératives (Murphy and Hartley, 2018), mais aussi des maladies neurodéveloppementales (Kacho et al., 2019). Par exemple, une altération des fonctions de la chaîne respiratoire

mitochondriale peut être retrouvée dans les troubles du spectre autistique (Rossignol and Frye, 2012).

Ces organites sont très dynamiques et sont capables de former un réseau étendu dans la cellule. Pour cela, elles peuvent fissionner ou fusionner, mécanismes hautement régulés, faisant intervenir de nombreuses protéines (Fenton et al., 2021) (Figure 20). Des modifications de la dynamique mitochondriale ont été rapportées dans de nombreuses pathologies (Yapa et al., 2021). Elles ont également un rôle important dans l'homéostasie calcique, la synthèse lipidique et l'apoptose (Giacomello et al., 2020).

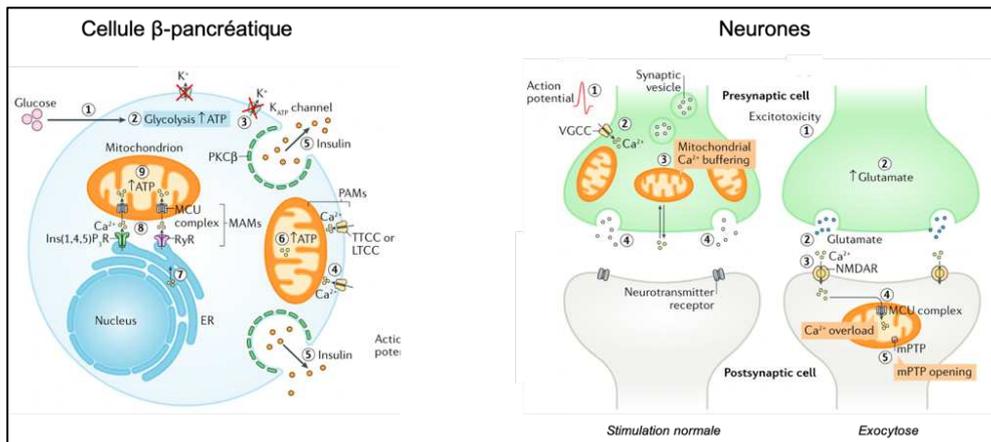


**Figure 20 : Dynamiques mitochondriales et mécanismes associés**

(Adapté d'après Westernmann, 2010)

Les mécanismes de fission et de fusion des mitochondries schématisés ci-dessus sont importants pour de nombreuses fonctions biologiques.

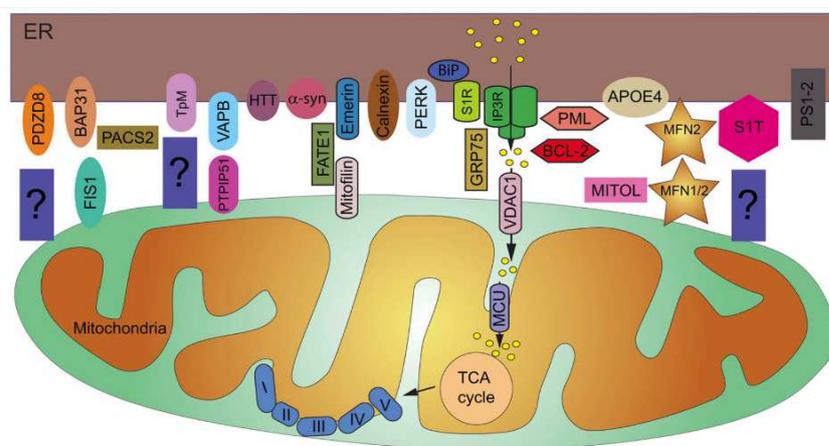
Les mitochondries ont également la capacité d'entrer en contact avec différents organites de la cellule dont les peroxysomes, les lysosomes ou encore le RE. Chaque type d'interaction est réalisé dans un but précis. Les interactions des mitochondries avec le RE sont particulièrement impliquées dans l'UPR (Carreas-Sureda et al., 2017), le transfert de  $Ca^{2+}$  entre les deux organites (Marchi et al., 2018), ainsi que dans le transport lipidique (Prinz et al., 2020). Le  $Ca^{2+}$  mitochondrial est primordial dans le métabolisme de la mitochondrie, car il est indispensable à la réalisation du cycle de Krebs (Marchi et al., 2018). Il est également nécessaire dans la physiologie de cellules sécrétrices telles que les cellules  $\beta$ -pancréatiques, ainsi que les neurones et leurs transmissions synaptiques (Figure 21) (Tarasov et al., 2012 ; Giorgi et al., 2018).



**Figure 21 : Ca<sup>2+</sup> mitochondrial dans les cellules β-pancréatiques et les neurones**  
(Adapté d'après Giorgi et al., 2018)

À la suite d'une stimulation, le calcium va être un message indispensable dans de nombreux mécanismes tissulaires tels que la production d'insuline dans les cellules β-pancréatiques ainsi que dans les neurotransmissions des neurones.

Les zones d'interactions entre les deux organites sont appelées membranes associées aux mitochondries (MAMs, *Mitochondria-Associated Membranes*). Ce sont des structures dynamiques impliquant de nombreuses protéines (Poston et al., 2013 ; Giorgi et al., 2015). De manière intéressante, on retrouve parmi toutes ces protéines un nombre substantiel de protéines impliquées dans l'UPR et l'homéostasie calcique telles que PERK, IRE1, BIP, GRP75, IP3R, SERCA, mentionnées précédemment (Figure 22) (Delprat et al., 2018). De plus, ces zones de contact entre les deux organites ont été identifiées comme impliquées dans différentes maladies, notamment des maladies neurodégénératives (Joshi et al., 2016).



**Figure 22 : Structure et fonctions des MAMs**  
(Delprat et al., 2018)

Les zones appelées membranes associées aux mitochondries (MAMs) sont des lieux d'interactions étroites entre les mitochondries et le RE. Une multitude de fonctions en résultent. La structure des MAMs est étroitement contrôlée par différentes interactions comme schématisé ci-dessus.

Dans le cadre du SW1, des défauts morphologiques des mitochondries ont été observés dès le début des années 90 dans les cellules de patients (Bundey et al., 1992). Ces observations, en plus des différentes mutations décrites dans l'ADN mitochondrial de patients, avaient conduit à la classification du syndrome comme maladie mitochondriale (Bu and Rotter, 1993). L'étude des mitochondries s'est donc très vite imposée. L'hypothèse du rôle fonctionnel de la wolframine dans les MAMs a émergé à la suite d'observations de l'expression de la protéine dans des échantillons de cerveau de souris (Poston et al., 2013). Une étude a montré récemment que la déficience en wolframine induit des changements dramatiques dans la dynamique mitochondriale de neurones corticaux de rats transfectés avec un shRNA dirigé contre *WFS1*. Il a notamment été observé dans ce modèle une inhibition de la fusion des mitochondries, une taille et une densité diminuées, ainsi qu'une mitophagie augmentée (Cagalinec et al., 2016). Ces neurones présentent également des atteintes de la bioénergie mitochondriale, dont un potentiel de membrane mitochondriale diminué ainsi qu'une quantité d'ATP plus faible que les neurones contrôles.

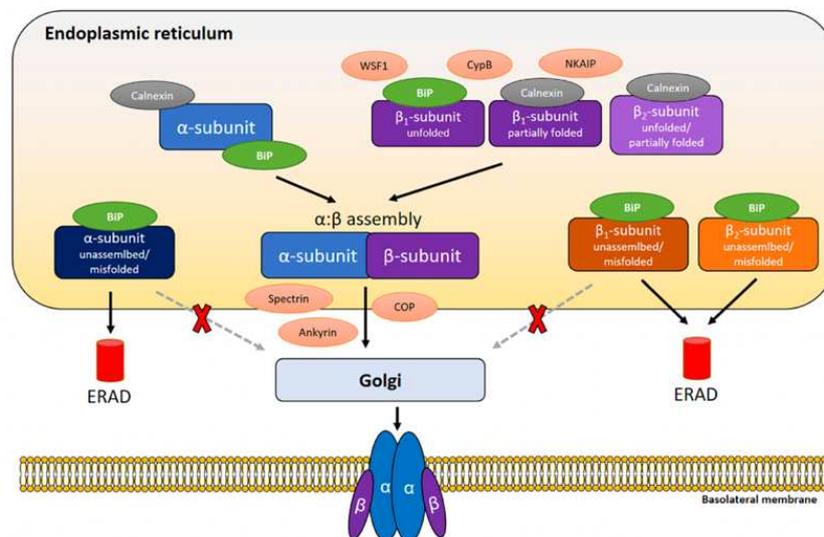
Des anomalies morphologiques ont également été rapportées dans des NSC issues de fibroblastes de patients (Zmyslowska et al., 2021). Ces anomalies morphologiques restent à ce jour non retrouvées dans d'autres études basées sur des cellules de patients (Angebault et al., 2018 ; La Morgia et al., 2020 ; Crouzier et al., 2022). Cependant, un nombre diminué d'interactions entre le RE et les mitochondries a été décrit dans des fibroblastes de patients et dans le stroma de neurones de l'hippocampe de souris (Angebault et al., 2018 ; Delprat et al., 2019 ; Crouzier et al., 2022). De manière surprenante, bien que l'absence de la wolframine ne semble pas impacter la morphologie des mitochondries de manière directe, leurs fonctions sont altérées. En effet, des défauts de l'homéostasie calcique mitochondriale ont été observés dans de nombreux modèles (Angebault et al., 2018 ; La Morgia et al., 2020 ; Nguyen et al., 2020 ; Crouzier et al., 2022). De plus, les cellules mutées possèdent un niveau d'ATP cytosolique plus faible (Zatyka et al., 2015 ; Cagalinec et al., 2016 ; Crouzier et al., 2022). Cette différence s'explique en partie par une diminution de l'expression de certains

complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale, et donc de la respiration mitochondriale (Angebault et al., 2018 ; Delprat et al., 2018 ; La Morgia et al., 2020, Crouzier et al., 2022). Ces atteintes ont également été confirmées dans l'étude multiomique de Zmyslowska et al.,. Cette étude a mis en évidence une diminution de l'expression génique et protéique des protéines impliquées dans l'import mitochondrial et dans le transport d'électrons de la respiration dans les CSPi (analyses transcriptomiques) et les NSC (analyses protéomiques) mutées (Zmyslowska et al., 2021).

#### D) Synthèse et sécrétion protéique

En plus de son rôle clé dans les différents mécanismes explicités précédemment, l'implication de la wolframine dans la biosynthèse et la sécrétion des protéines a été soulevée. Une fois de plus, sa localisation au niveau de la membrane du RE a suggéré qu'elle pourrait jouer un rôle dans la production des protéines. De plus, son expression a été détectée dans les granules sécrétoires d'insuline de cellules  $\beta$ -pancréatiques de souris (Hatanaka et al., 2011). Il a également été observé qu'en absence de la wolframine les granules sécrétoires présentes en nombre restreint, présentaient un défaut d'acidification ainsi que d'insuline (Ishihara et al., 2004 ; Hatanaka et al., 2011). Cette hypothèse a été validée par la suite dans des cellules de neuroblastomes humains. En effet, Gharanei et al., ont mis en évidence que l'extrémité N-terminale de la wolframine, située dans le cytosol, était capable d'interagir avec la pompe à protons V-ATPase H<sup>+</sup>, notamment avec le domaine VA1 de celle-ci (sous-unité impliquée dans l'hydrolyse de l'ATP) (Gharanei et al., 2013). Ces pompes situées au niveau de la membrane plasmique des cellules sont impliquées dans différents mécanismes physiologiques comme le trafic membranaire, la dégradation des protéines et l'acidification d'organites intracellulaires (Forgac, 2007). Une déplétion de *WFS1* induit une diminution d'expression de la pompe à protons V-ATPase H<sup>+</sup> (Gharanei et al., 2013). L'équipe a aussi observé une co-localisation de la wolframine avec la protéine associée à la membrane des vésicules (*Vesicle associated membrane protein*, VAMP).

Une interaction de WFS1 avec une autre pompe a également été démontrée par la même équipe (Zatyka et al., 2008). L'étude réalisée à partir de différents types cellulaires dont des cellules MIN6 et SKNAS (cellules de neuroblastome humain) a mis en évidence une interaction entre la sous unité  $\beta 1$  de la pompe ATPase  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  et la partie C-terminale de la wolframine (Zatyka et al., 2008). Il est intéressant de relever que cette pompe établit le gradient électrochimique des cellules via un échange actif d'ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$  en consommant de l'ATP. Le transporteur fonctionnel minimal est constitué d'une sous-unité  $\alpha$  catalytique et d'une sous-unité  $\beta$  à activité chaperonne (Figure 23). Il a été décrit que la pompe ATPase  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  participe à diverses voies de signalisation intracellulaire et à l'adhésion cellulaire, et qu'une perte de fonction de la pompe était associée à différentes pathologies dont des maladies neurologiques (Kryvenko et al., 2021).

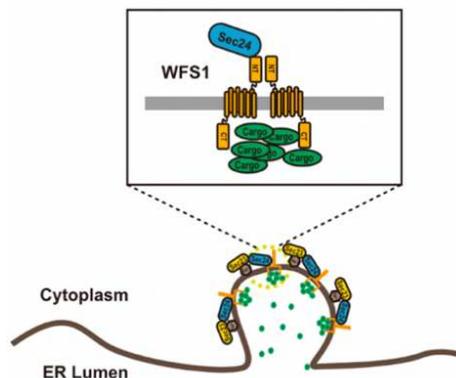


**Figure 23 : Représentation schématique du repliement de la Na/K-ATPase dans le réticulum endoplasmique**

(Kryvenko et al., 2021)

Les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de la Na/K-ATPase sont présentes dans le RE dans différents états physiologiques et pathologiques, y compris des sous-unités correctement repliées, dépliées ou mal repliées de l'enzyme et des complexes assemblés. La calnexine et BiP participent au repliement des sous-unités de la Na/K-ATPase avec une spécificité d'isoforme et des propriétés de liaison préférentielle. De plus, la wolframine (WFS1), la cyclophiline B (CypB) et la protéine d'interaction de la Na/K-ATPase (NKAIP) s'associent aux sous-unités de la Na/K-ATPase dans le RE avec diverses fonctions. Seuls les complexes Na/K-ATPase  $\alpha$ - $\beta$  assemblés peuvent sortir du RE et être transférés au Golgi, tandis que les sous-unités non assemblées ou mal repliées sont retenues avec l'aide de BiP et ciblées pour la dégradation associée au réticulum endoplasmique (ERAD). La spectrine, l'ankyrine et les protéines enrobées (COP) aident au trafic des complexes Na/K-ATPase  $\alpha$ - $\beta$  assemblés du RE vers le Golgi.

L'implication de la wolframine dans le transport des vésicules entre le RE et l'appareil de Golgi a été mise en lumière récemment (Wang et al., 2021). Les auteurs ont identifié dans des cellules HEK-293T, INS1 et des cellules  $\beta$ -pancréatiques de souris que la wolframine interagissait avec 4 des 11 protéines cargo de vésicules, à savoir la proinsuline, le neuropeptide Y (NPY), la carboxypeptidase E (CPE) et la protéine neuroendocrine 7B2 (SCG5) via son domaine C-terminal. Le domaine N-terminal, quant à lui, interagit avec la protéine de transport SEC24, composant du complexe protéique II (COPII) (Figure 24).



**Figure 24 : Implication de la wolframine dans la formation de vésicules**

(Wang et al., 2021)

La partie C-terminale de la wolframine interagit avec des protéines cargo au niveau de la lumière du RE, à l'inverse de la partie N-terminale de la protéine qui interagit avec la protéine SEC24 au niveau du cytoplasme.

Le complexe COPII est un acteur indispensable de l'homéostasie du RE mais aussi dans la biogenèse de l'insuline dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques (Fang et al., 2015). De plus, il est indispensable pour le transfert de vésicules entre le RE et l'appareil de Golgi (Brandizzi and Barlowe, 2013).

L'ensemble de ces études a permis de mieux comprendre l'implication de la wolframine dans les mécanismes de sécrétion des protéines, et notamment dans le transport via des vésicules. Il semblerait que le transport de protéines entre le RE et l'appareil de Golgi soit impacté dans le SW1, particulièrement dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques. Ces atteintes pourraient expliquer les mécanismes sous-jacents du diabète sucré des patients (Wang et al., 2021). Cependant, les cellules  $\beta$ -pancréatiques ne sont pas les seules cellules à être particulièrement sécrétrices, c'est également le cas des cellules neuronales. A ce jour, l'implication de la wolframine dans la sécrétion de protéines ou d'hormones dans les neurones reste peu étudiée.

## IV) Modèles de la pathologie

Comme pour de nombreuses maladies, les objectifs de la recherche sur le syndrome de Wolfram consistent à (i) identifier les mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine des atteintes qui se manifestent chez les patients, et (ii) développer des thérapeutiques. Pour cela, différentes approches *in vivo* et *in vitro* ont été développées par les équipes et ont permis l'obtention de différents modèles de la pathologie du SW1. On peut cependant soulever le fait que la majorité d'entre eux portent sur les atteintes des cellules  $\beta$ -pancréatiques. Cela peut s'expliquer par différents facteurs : (i) le diabète est un symptôme précoce et touche la plupart des patients, (ii) le diabète est une maladie de plus en plus répandue dans le monde et dont l'incidence ne cesse d'augmenter, ce qui explique que de nombreux modèles aient été développés. Bien que de plus en plus d'équipes s'intéressent aux atteintes de l'ouïe, de l'atrophie optique et aux atteintes cérébrales, les modèles restent limités.

### A) Les modèles cellulaires *in vitro*

De manière générale, afin de modéliser une pathologie, la première démarche consiste à développer un modèle cellulaire *in vitro*. Une approche fréquente est d'exploiter les cellules primaires obtenues directement à partir de patients. Les prélèvements réalisés sur la peau des patients ont l'avantage d'être simples à mettre en place mais assez invasifs. Les cellules présentent l'intérêt non négligeable de posséder le patrimoine génétique des patients atteints du syndrome et donc les mutations à l'origine de la maladie. Dans le cadre de la recherche menée sur le syndrome, plusieurs études ont permis de rapporter des mécanismes associés à la perte de la wolframine, notamment les aspects biochimiques, à partir de biopsies musculaires ou de fibroblastes de patients (Bundey et al., 1992 ; Takeda et al., 2006 ; Zatyka et al., 2008 ; Lu et al., 2014 ; Angebault et al., 2018 ; La Morgia et al., 2020, Crouzier et al., 2022). Cependant, les fibroblastes ne sont pas des cellules particulièrement atteintes dans le contexte de la pathologie et leur pertinence reste discutable. Ainsi, afin de développer des modèles plus pertinents, de nombreuses

études ont exploité des lignées cellulaires immortalisées, en induisant une déficience de la wolframine. Pour cela, les cellules sont transfectées avec des siRNA (Small interfering RNA) ou shRNA (Short Haipin RNA) dirigés contre *WFS1*. Cette approche a permis d'obtenir plusieurs modèles cellulaires *in vitro* de la pathologie.

Concernant la modélisation du diabète mellitus, de nombreuses équipes ont exploité les lignées MIN6, INS-2, INS-832/13, particulièrement pertinentes car elles sécrètent de l'insuline (Riggs et al., 2004 ; Fonseca et al., 2005 ; 2010 ; Zatyka et al., 2008, 2015 ; Lu et al., 2014 ; Abreu et al., 2020 ; Nguyen et al., 2020 ; Morikawa et al., 2022). Les atteintes neurologiques, quant à elles, ont été modélisées à partir de lignées cellulaires PC12, Neuro2A, NT2, SK-N-AS, SH-SY5Y et NSC34 (Kakuichi et al., 2006 ; Fonseca et al., 2010 ; Gharanei et al., 2012 ; Lu et al., 2014 ; Zatyka et al., 2015 ; Cagalinec et al., 2016). Enfin, d'autres lignées ont été exploitées telles que les lignées Cos7, JEG3 ou encore HEK-293 (Zatyka et al., 2005 ; Hara et al., 2014 ; Angebault et al., 2018). Bien que toutes ces lignées possèdent de nombreux avantages en termes de culture cellulaire (simplicité des protocoles, lignées connues, potentiel de prolifération élevé) et d'efficacité de transfection, elles ne possèdent pas le génome des patients. De plus, les approches basées sur l'utilisation de siRNA ou shRNA ne permettent pas une absence totale d'expression, une expression résiduelle plus ou moins importante est toujours présente en fonction des cellules utilisées. Enfin, certaines de ces lignées ont été obtenues à partir de tissus malins (neuroblastome, choriocarcinome, insulinome) et parfois d'animaux (rat, souris, singe). Elles ont cependant permis d'identifier de nombreux mécanismes de la protéine.

Face à ces limites et grâce à la découverte des cellules souches induites à la pluripotence (CSPi), différents modèles cellulaires ont été générés à partir de cellules prélevées sur des patients. Les CSPi possèdent deux principaux avantages (cf chapitre 3) : un auto-renouvellement théoriquement infini et une capacité de différenciation dans tous les types cellulaires de l'organisme. De plus, l'obtention de ces cellules est réalisée à partir de fibroblastes de patients, permettant ainsi l'obtention de lignées porteuses de mutations à l'origine de la maladie et avec le contexte génétique du

patient. Actuellement, différentes études rapportent l'obtention de cellules  $\beta$ -pancréatiques à partir de CSPi issues de patients (Shang et al., 2014 ; Maxwell et al., 2020). Maxwell et al., a également mis en évidence que l'édition génique par la technologie CRISPR-Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats - CRISPR associated protein 9*) dans des CSPi de patients permet, après différenciation en cellules  $\beta$ -pancréatiques, de corriger le défaut d'insuline. De plus, la greffe de ces cellules dans des souris diabétiques a permis de corriger le diabète (Maxwell et al., 2020). Le potentiel des CSPi a également permis d'obtenir des progéniteurs neuraux (NSC, *Neural Stem Cells*) (Lu et al., 2014 ; Zmyslowska et al., 2021). Cependant, il est important de relever qu'aucune caractérisation des progéniteurs neuraux obtenus n'a été réalisée dans l'étude de Lu et al., 2014, contrairement à Zmyslowska et al., 2021.

### B) Les modèles *in vivo*

Les modèles animaux sont également une source indispensable pour la modélisation de pathologies et la découverte de thérapeutiques. Bien que plus coûteux et plus difficiles à générer, ils permettent d'obtenir un modèle plus complexe et plus complet. Différents modèles animaux tels que le rat, la souris, le poisson zèbre ou encore la drosophile ont été élaborés afin de modéliser le SW1 (Figure 25). Cependant, ces modèles reproduisent parfois les symptômes de manière partielle, et les atteintes neurologiques restent peu étudiées.

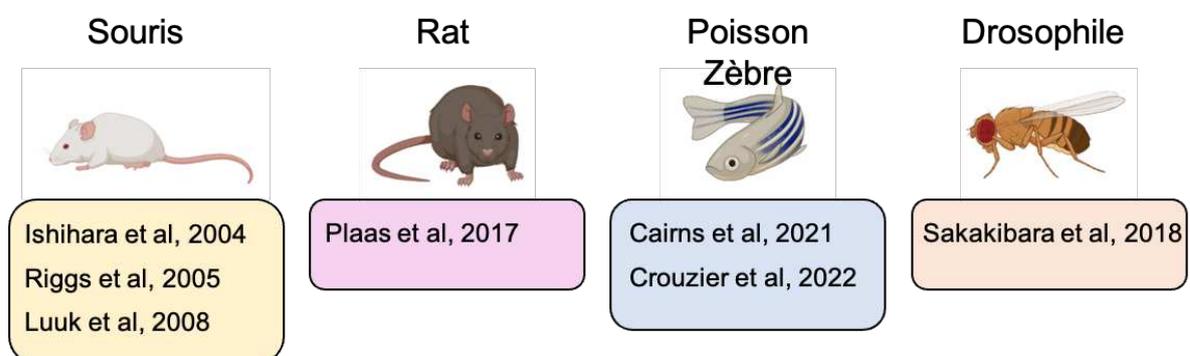


Figure 25 : Différents modèles animaux du syndrome de Wolfram de type 1

BioRender a été utilisé pour générer cette figure.

Parmi tous les phénotypes, le stress du RE est, de manière générale, le premier à être investigué. Depuis leur développement, de nombreuses études ont exploité ces modèles, ce qui a permis d'approfondir les connaissances des différents mécanismes physiopathologiques du syndrome (Koks et al., 2009 ; Bonnet-Wersinger et al., 2014 ; Ivask et al., 2016, 2018 ; Cagalinec et al., 2019). Ces modèles animaux sont des outils précieux et indispensables pour le test de molécules à potentiel thérapeutique, bien que la majorité des études évaluent l'effet de la molécule sur le diabète mellitus (Fischer and Ehrlich, 2020).

## V) Stratégies thérapeutiques du syndrome de Wolfram de type 1

Il n'existe actuellement aucun traitement curatif pour le SW1. Seuls des traitements symptomatiques peuvent être proposés aux patients (pour le diabète par exemple), ainsi qu'un accès à une prise en charge pluridisciplinaire. Les objectifs de cette approche visent à pallier le manque de thérapeutiques en limitant les complications endocriniennes, urologiques et neurologiques. Certaines atteintes dont la neuropathie optique et les atteintes neurologiques ne bénéficient d'aucun traitement.

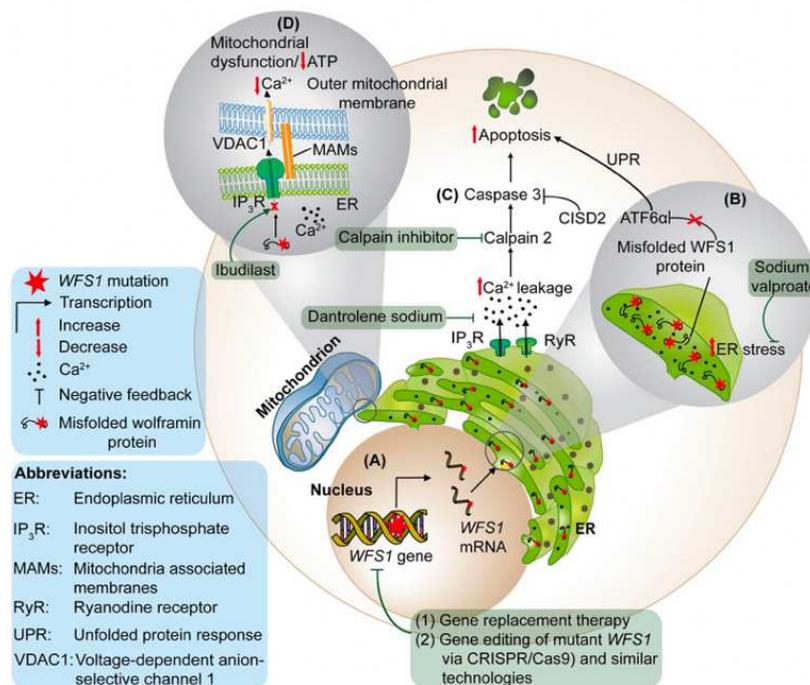
Ces dernières années, la recherche sur le syndrome n'a cessé de progresser, notamment sur l'identification et la compréhension des mécanismes pathologiques de la maladie. Ces avancées ont permis de favoriser le développement de nouvelles approches thérapeutiques, principalement par le biais de molécules pharmaceutiques, mais aussi par des approches de thérapie génique (Figure 26) (Rigoli et al., 2022). L'identification de molécules thérapeutiques est l'approche la plus avancée à ce jour. Celle-ci est basée sur le repositionnement de molécules déjà connues dans le cadre d'autres pathologies et ayant pour cible des mécanismes cellulaires bien précis. Certaines de ces molécules font actuellement l'objet d'essais cliniques. L'accumulation de formes mal conformées de wolframine induit un stress cellulaire, signature moléculaire du SW1. Afin de résoudre ce problème, des chaperonnes chimiques sont actuellement testées pour améliorer la structure des protéines WFS1 mutées. Des

chaperonnes chimiques telles que l'acide tauroursodésoxycholique (TUDCA) et l'acide 4-phénylbutyrique (4-PBA) se sont montrées efficaces dans la régulation de la synthèse d'insuline et dans la diminution du stress du RE sur les cellules  $\beta$ -pancréatique dérivées de CSPi de patients ainsi que dans des cellules HEK-293 (Abreu and Urano, 2019 ; Shang et al., 2014 ; Batjargal et al., 2020). Ces chaperonnes possèdent l'avantage d'être approuvées par la FDA (*Food and Drug Administration*). Plus récemment, une étude a mis en évidence que le PRE-084 restaure l'homéostasie calcique, la respiration mitochondriale, ainsi que l'autophagie et la mitophagie cellulaires sur différents modèles dont des fibroblastes de patients (Crouzier et al., 2022). Le PRE-084 est un agoniste de la chaperonne du récepteur sigma 1 (S1R), protéine localisée dans la membrane du RE et notamment impliquée dans le transfert d'ions calcium via l'IP3R (Hayashi et al., 2000).

Une autre stratégie thérapeutique consiste à stabiliser le calcium du RE. Dans ce contexte, l'inhibiteur de la calpaïne XI (*Calpain Inhibitor XI*) ainsi que l'Ibudilast se sont montrés particulièrement prometteurs sur des cellules  $\beta$ -pancréatiques déplétées en WFS1 (Nguyen et al., 2020). De plus, l'Ibudilast est déjà administré pour certaines pathologies et est actuellement en essai clinique de phase 2 dans le cadre de la sclérose en plaques (Rolan et al., 2009 ; Fox et al., 2021). L'efficacité du dantrolène a également été identifiée notamment dans la stabilisation du niveau calcique du RE (Lu et al., 2014). Celui-ci inhibe l'efflux du calcium du RE en ciblant les récepteurs à la ryanodine (Fruen et al., 1997). Cette molécule est actuellement en essai clinique aux Etats-Unis chez des patients atteints du SW (identifiant [clinicaltrials.gov NCT02829268](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02829268)) (Abreu et al., 2021). D'autres molécules telles que la Rapamycine, le Carbachol et plus récemment le JVT-519 ont démontré leur effet sur le potentiel calcique, ainsi que sur la sécrétion d'insuline (Hara et al., 2014 ; Toots et al., 2019 ; Rigoli et al., 2022).

Une autre approche consiste à réduire le stress du RE. Actuellement, la protéine p21 (cip), un inhibiteur des kinases dépendantes des cyclines, est étudié pour la thérapie du syndrome. Cette protéine interagit avec le facteur de transcription p53, régulateur important du cycle cellulaire, de l'apoptose et de l'autophagie. L'expression

de p21 est décrite dérégulée dans les cellules SW1 (Yamada et al., 2006 ; Gharanei et al., 2013). L'acide valproïque (VPA), également connu sous le nom de Dépakine, médicament antiépileptique, a été identifié comme modulant l'expression de WFS1 et diminuant le stress du RE (Kakiuchi et al., 2009 ; Batjargal et al., 2020). De plus, l'effet neuroprotecteur du VPA ainsi que son effet sur la croissance neuritique ont été mis en évidence (Li et al., 2017). Les mécanismes d'action de la molécule ne sont pas clairs, mais une activité inhibitrice d'histones désacétylase (HDAC) a été identifiée (Göttlicher et al., 2001). A ce jour, deux essais cliniques évaluent l'effet du VPA sur les patients (identifiants clinicaltrials.gov : NCT03717909 et NCT04940572).



**Figure 26 : Différentes approches thérapeutiques pour le SW1**  
(Mishra et al., 2021)

Les mécanismes physiopathologiques du SW1 ont des mécanismes d'action variés. Ainsi les approches de thérapeutique développées sont basées sur des actions différentes. Certaines démarches ont pour objectif de cibler directement le gène muté (A), d'autres le stress augmenté du RE (B), tandis que certaines ciblent le calcium et enfin d'autres visent à réguler les échanges entre le RE et les mitochondries (D).

Les agonistes du récepteur du peptide 1 de type glucagon (GLP-1R) sont également à l'étude. Ce récepteur est largement exprimé dans les cellules neuronales, et apparait comme une cible à privilégier pour les mécanismes neuroprotecteurs (Iwai et al., 2006 ; Hölscher, 2012). Les agonistes tels que le liraglutide et l'Exendin-4 (Ex-4) ont prouvé leur efficacité de par leur action anti-diabétique, leur effet neuroprotecteur

et le ralentissement des atteintes visuelles sur les modèles rongeurs (Kondo et al., 2018 ; Seppa et al., 2019, 2021 ; Jagomäe et al., 2021). Ces résultats *in vivo* ont permis une utilisation hors indication « off-label » du Liraglutide dans le cadre d'une étude de cas sur quatre patients en Italie (Frontino et al., 2021). Plus récemment, les inhibiteurs de la dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4), une enzyme qui désactive le GLP-1R, ont été proposés comme traitement car ils entraîneraient une augmentation du GLP-1 (Iafusco et al., 2022).

Au-delà de l'identification de molécules thérapeutiques, d'autres axes sont actuellement en développement. Le premier est la thérapie génique dont le principe est d'apporter au sein de la cellule du matériel génétique par le biais de vecteurs viraux (Abreu and Urano, 2019). Cette approche est particulièrement développée pour les atteintes visuelles et plus précisément les RGC. Une étude prometteuse a mis en évidence qu'un vecteur AAV2-CMV-WFS1 introduit par injection intravitreuse dans l'œil d'une souris modélisant la pathologie permettait de stabiliser l'acuité visuelle de celle-ci pendant plusieurs mois (Hamel et al., 2017). Une autre approche de thérapie génique envisagée consiste à faire produire le facteur neurotrophique MANSF (*Mesencephalic Astrocyte-derived Neurotrophic Factor*), facteur dont l'expression et la sécrétion augmentent lors d'un stress du RE (Yu et al., 2021). De plus, le rôle du MANSF a été identifié comme critique dans la prolifération et la survie des cellules  $\beta$ -pancréatiques (Lindahl et al., 2014). L'ensemble de ces éléments a mené à une étude du facteur dans le contexte du syndrome, et a montré des résultats très encourageants sur les cellules  $\beta$ -pancréatiques (Mahadevan et al., 2020).

Récemment, une étude a mis en évidence qu'une nouvelle approche basée sur la combinaison d'édition génique et de thérapie cellulaire permettait de retrouver un phénotype normal dans un modèle de souris diabétique (Maxwell et al., 2020). L'équipe a obtenu ces résultats en corrigeant directement dans des cellules CSPi dérivées de fibroblastes de patients Wolfram, par la technologie CRISPR-Cas9, les variants géniques mutés. Ces cellules ont ensuite été différenciées en cellules  $\beta$ -pancréatiques, puis transplantées dans des souris diabétiques. Le diabète préexistant des souris a ainsi été

corrigé et l'expression de gènes associés au stress du RE a été diminuée. Cette étude combinant différentes stratégies s'avère très prometteuse. Bien que les recherches de thérapeutiques pour les patients aient considérablement avancé ces dernières années (Figure 27), il reste encore de nombreux obstacles à franchir afin d'identifier un traitement curatif. La compréhension des mécanismes à l'origine des atteintes neurologiques des patients reste un enjeu crucial pour cela.

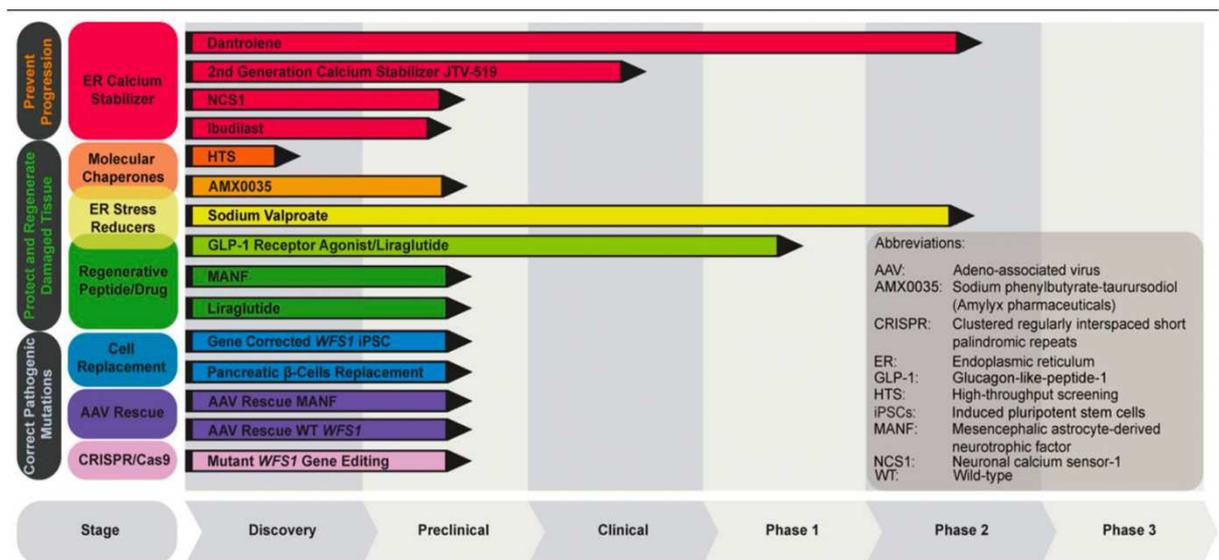


Figure 27 : Avancées des différents traitements élaborés pour le SW1

(Mishra et al., 2021)

Résumé des stratégies thérapeutiques actuelles pour le traitement du syndrome de Wolfram à différents stades de développement préclinique et clinique.

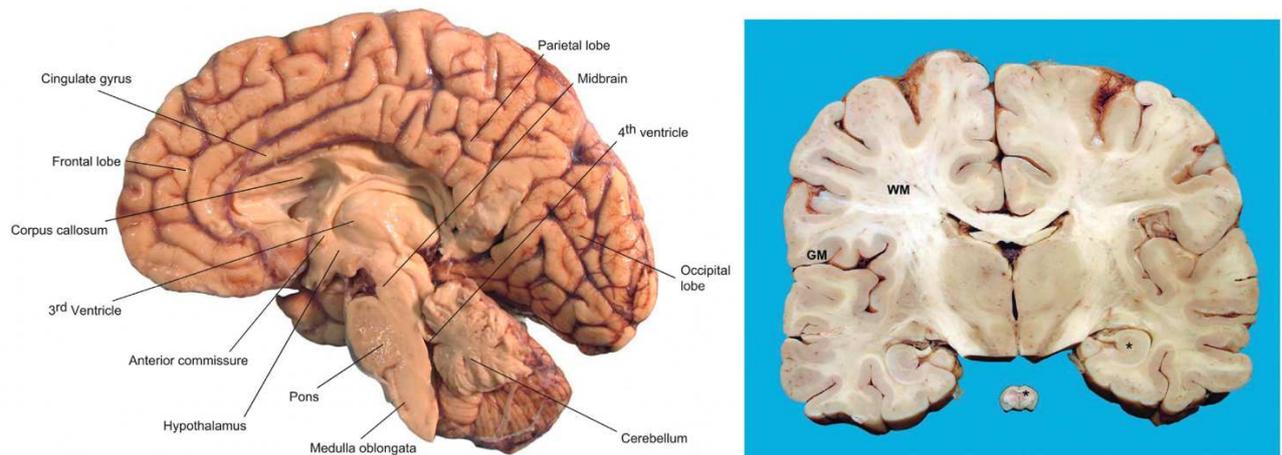
## Chapitre 2 : Étude du système nerveux

Dans le cadre de mon projet de thèse, je me suis intéressé aux atteintes neurologiques du SW1 et, plus précisément, aux aspects neurodéveloppementaux. La mise en place des différentes zones cérébrales est le fruit d'une régulation spatio-temporelle complexe qui implique de nombreux mécanismes physiologiques tout au long du développement embryonnaire. Comprendre l'implication de la wolframine dans les processus neurodéveloppementaux et neurodégénératifs est indispensable afin de mieux comprendre les atteintes neurologiques, améliorer le diagnostic, la prise en charge ainsi que l'élaboration de traitements pour les patients. Ainsi, avant d'aborder les différentes approches expérimentales réalisées au cours de ce projet de thèse, il convient de rappeler les différentes étapes de l'élaboration du système nerveux (SN) et plus particulièrement du cortex, ainsi que les différents mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués.

### I) Organisation du système nerveux humain

#### A) Généralités

Le système nerveux (SN) de l'Homme est divisé en un système nerveux central (SNC) et un système nerveux périphérique (SNP). Ceux-ci contrôlent les fonctions automatiques (involontaires) et somatiques (sensorimotrices ou volontaires). Le SNC se compose du cerveau et de la moelle épinière, qui sont protégés par le crâne et la colonne vertébrale. Le SNP quant à lui constitue le lien entre le SNC et l'ensemble des structures situées à la périphérie de l'organisme. Celui-ci est majoritairement composé de nerfs rejoignant le cerveau et la moelle épinière. Le SNC est une structure très hétérogène quant à la distribution des corps neuronaux et de leurs prolongements. Certaines zones sont riches en corps neuronaux (surface des hémisphères cérébraux) et sont qualifiées de substance grise. D'autres zones sont principalement constituées de fibres nerveuses (axones, dendrites), elles sont généralement myélinisées et sont qualifiées de substance blanche (de par leur coloration pâle) (Figure 28).



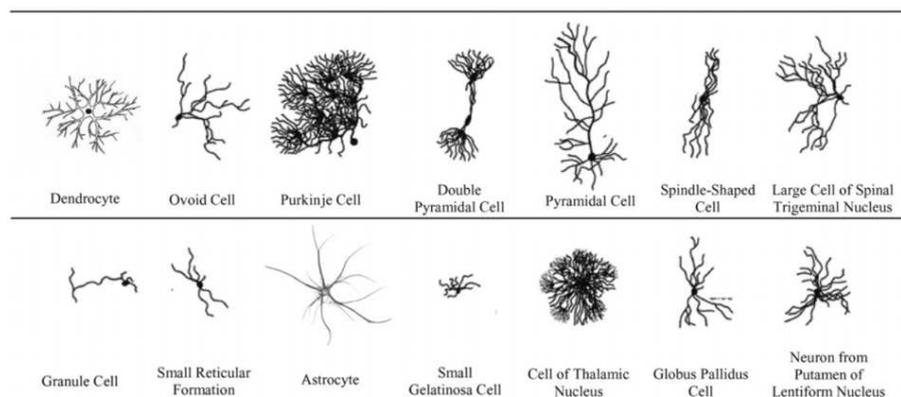
**Figure 28 : Anatomie du cerveau et coupe coronale**

(Snyder et al., 2018)

Gauche : cerveau humain. L'hippocampe n'est pas visible en plan sagittal. Droite : coupe coronale du cerveau humain GM : Gray Matter, Matière grise ; WM : White Matter, Matière blanche

### *Constituants cellulaires du cerveau*

L'unité structurelle et fonctionnelle fondamentale du cerveau est la cellule nerveuse. On en distingue deux grands types : les neurones et les cellules gliales. Le nombre de neurones est estimé à environ 100 milliards chez l'Homme. La fonction principale de ces cellules est de réceptionner, intégrer et transmettre une information. Dans le but d'effectuer ces fonctions, le neurone possède une structure hautement spécialisée (Figure 29) (Weissman et al., 2007).



**Figure 29 : Illustration des différents types de neurones constituant le SNC**

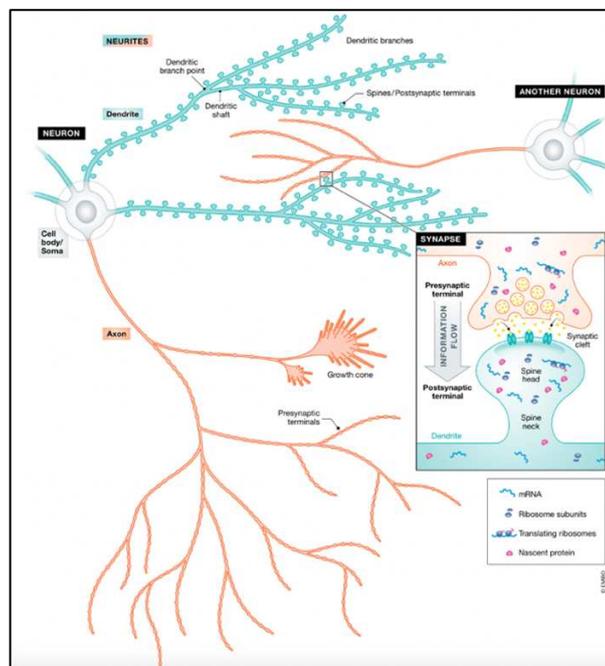
(Weissman et al., 2007, Adapté des dessins de Ramon Y Cajal)

Il existe un grand nombre de types de neurones qui possèdent des structures et des tailles variées.

Depuis les premières descriptions histologiques détaillées du système nerveux réalisées par le Dr Ramon y Cajal au cours du 19<sup>ème</sup> siècle, de nombreux types de

neurones ont été identifiés. Les progrès techniques des technologies de séquençage et d'imagerie n'ont cessé de contribuer à ces avancées. De nos jours, nous continuons à mettre en lumière de nouveaux types neuronaux comme le montre une étude réalisée en 2018 identifiant un nouveau sous-type de neurones GABAergique dans la couche externe du cortex (Boldog et al., 2018).

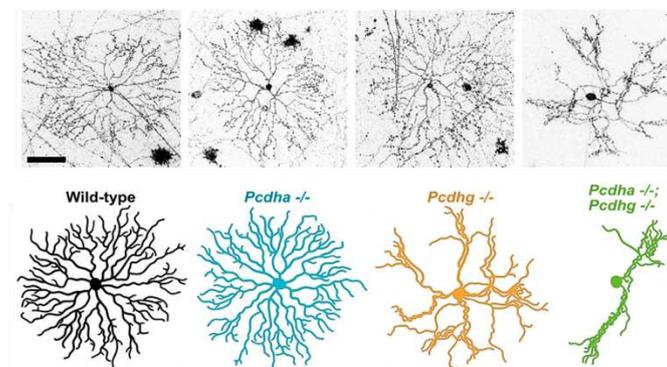
Les neurones se distinguent des autres cellules notamment par la communication intercellulaire via les **synapses** (situées tout au long des dendrites) mais également par leur spécialisation pour la signalisation électrique à longue distance. Bien qu'il existe une grande diversité de taille et de forme de neurones dans l'ensemble du SNC, ces cellules partagent certaines caractéristiques communes : chaque neurone est une entité propre délimitée par sa membrane cellulaire et possède des prolongements (Figure 30). Le neurone est constitué d'un corps cellulaire également appelé **soma**. Au sein de celui-ci, on retrouve l'information génétique dans le noyau. Le volume du soma représente moins de 1% du volume total du neurone (Soukup et al., 2018). Un certain nombre d'excroissances ramifiées émergent de ce corps cellulaire, possédant des caractéristiques et des fonctions différentes.



**Figure 30 : Représentation schématique des composants structuraux des neurones**  
(Rangaraju et al., 2017)

Le neurone est constitué d'un corps cellulaire (en gris) et de neurites : dendrites (en bleu) et axones (en orange). L'encart montre une synapse formée entre la borne présynaptique d'un neurone (orange) et la borne postsynaptique d'un autre neurone (bleu).

La plupart de ces excroissances sont les **dendrites**. Chaque neurone développe son propre arbre dendritique qui se forme à partir de la coordination de différents paramètres tels que la forme et la taille des dendrites, la complexité des branches, la configuration des canaux ioniques et synaptiques ainsi que leur ciblage. La mise en place de cet arbre nécessite l'implication de nombreux mécanismes de régulation ainsi que l'expression de protéines spécifiques (Lefebvre and Marocha, 2020). Il a notamment été montré que des mutations dans les gènes régulant les protocadhérines impactaient l'arborisation des dendrites chez les souris (Figure 31) (Ing-Esteves et al., 2018).



**Figure 31 : Implication des protocadhérines dans la mise en place de l'arbre dendritique**

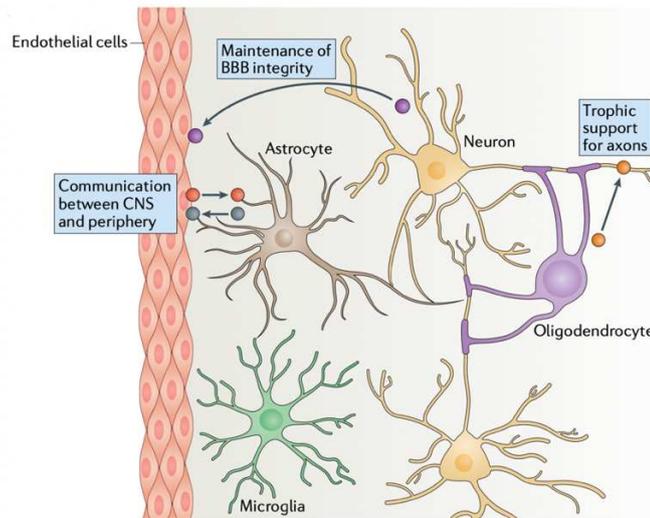
(D'après Ing-Esteves et al., 2018 ; Lefebvre and Marocha., 2020)

Les différentes mutations des protocadhérines n'affectent pas de manière similaire la mise en place de l'arbre dendritique.

L'autre type d'excroissance émergeant du corps cellulaire du neurone est appelé **axone** et permet la transmission de l'information à distance du corps cellulaire. Les axones possèdent des longueurs très variables et peuvent se subdiviser en plusieurs branches, permettant ainsi de distribuer l'information simultanément à plusieurs destinations différentes. L'extrémité de cet axone se termine par des formations spécialisées appelées boutons terminaux, zone de transmission d'information aux dendrites d'autres neurones.

Au-delà des neurones, la population cellulaire majeure constituant le système nerveux est les cellules gliales ou névroglie. Plus nombreuses que les neurones, elles ne possèdent pas les mêmes rôles. Si celles-ci n'ont pas de fonction directe dans le traitement de l'information, elles ont cependant des rôles cruciaux pour le bon

fonctionnement des cellules nerveuses. On distingue trois grands types de cellules gliales : les astrocytes qui participent au fonctionnement synaptique et constituent l'essentiel de la barrière hémato-encéphalique ; les oligodendrocytes qui constituent une gaine de myéline entourant certaines fibres nerveuses et améliorant ainsi la conduction du message ; les cellules de la microglie qui ont un rôle phagocytaire en réaction à une lésion spécifique du système nerveux (Figure 32).



**Figure 32 : Différents constituants cellulaires du SNC**

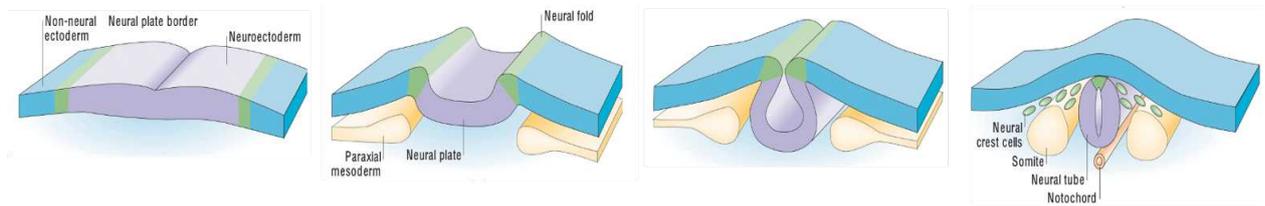
(Modifié d'après Zhang et al., 2019)

En condition physiologique, le SNC est constitué d'un nombre varié de types cellulaires. Ces cellules interagissent par différents mécanismes et contribuent au bon fonctionnement du SNC.

## B) Mise en place du SN chez l'Homme

La formation du SN se fait au niveau de l'ectoderme, un des trois feuilletts primitifs issus de la gastrulation, et débute par la neurulation. La conséquence de la neurulation est la formation de la corde dorsale également appelée notochorde. La formation de ce cylindre individualisé de cellules mésodermiques va induire une succession de mouvements cellulaires. L'ectoderme situé au-dessus de la corde est appelé neuroectoderme et est à l'origine de l'entièreté du système nerveux. En effet, un épaissement localisé de l'ectoderme selon un axe antéro-postérieur va induire la formation de la plaque neurale. Une dépression médiane longitudinale de la plaque neurale va induire la formation d'une gouttière. La fusion des bords de la gouttière neurale s'initie dans la future région cervicale et se propage de part et d'autre. La

gouttière est alors fermée et le tube neural primitif est créé (Figure 33).



**Figure 33 : Premières étapes de la neurulation**

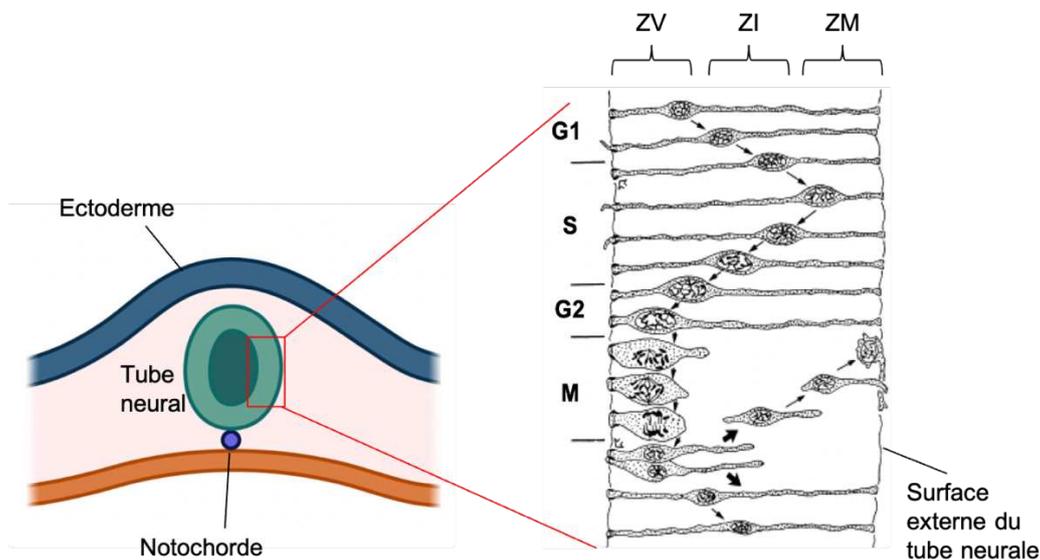
(Modifié d'après Gammill and Bronner-Fraser, 2003)

La bordure de la plaque neurale (vert) est induite par la signalisation entre le neuroectoderme (violet) et l'ectoderme non-neural (bleu) et par le mésoderme sous-jacent (jaune). Au cours de la neurulation, les bords de la plaque neurale s'élèvent, entraînant l'enroulement de la plaque neurale en un tube neural. Les cellules de la crête neurale (en vert) se détachent des plis neuraux ou du tube neural dorsal.

Au moment de la fermeture de ce tube, certaines cellules des bourrelets neuraux vont subir une transition épithélio-mésenchymateuse et vont migrer en suivant des trajectoires spécifiques. Ces cellules constituent les crêtes neurales et participent entre autres à l'édification du SNP, contrairement au tube neural qui donne naissance au SNC. Par la suite, sous l'influence d'une cascade moléculaire complexe mettant en jeu de nombreux signaux développementaux, les cellules du tube neural subissent une multiplication intense ainsi qu'une spécification régionale. Ainsi, aux alentours de la 5<sup>ème</sup> semaine, le tube neural est subdivisé en trois vésicules cérébrales dont le prosencéphale (le plus antérieur) qui par la suite se divisera en télencéphale et diencéphale, à l'origine du cerveau antérieur.

La neurogenèse qui suit débute par une phase intense de divisions cellulaires dont la conséquence est un épaississement du neuroépithélium et un élargissement des tissus. Les cellules migrent par la suite afin d'atteindre ce qui deviendra leur structure définitive. Le neuroépithélium est constitué de deux zones au début de la neurogenèse (entre la 10<sup>ème</sup> et la 20<sup>ème</sup> semaine de gestation chez l'Homme) : la zone ventriculaire (ZV), au contact de la lumière du tube neural, au sein de laquelle on retrouve les cellules neuroépithéliales ; la zone marginale (ZM), externe et qui contient un grand nombre de prolongements cellulaires. Le neuroépithélium s'épaissit par la

suite, constituant une couche intermédiaire (Figure 34). L'ensemble de ces mécanismes sont à l'origine de l'organisation en couches du cortex cérébral.



**Figure 34 : Division symétrique des cellules neuroépithéliales**

ZV : Zone Ventriculaire, ZI : Zone Intermédiaire ; ZM : Zone Marginale

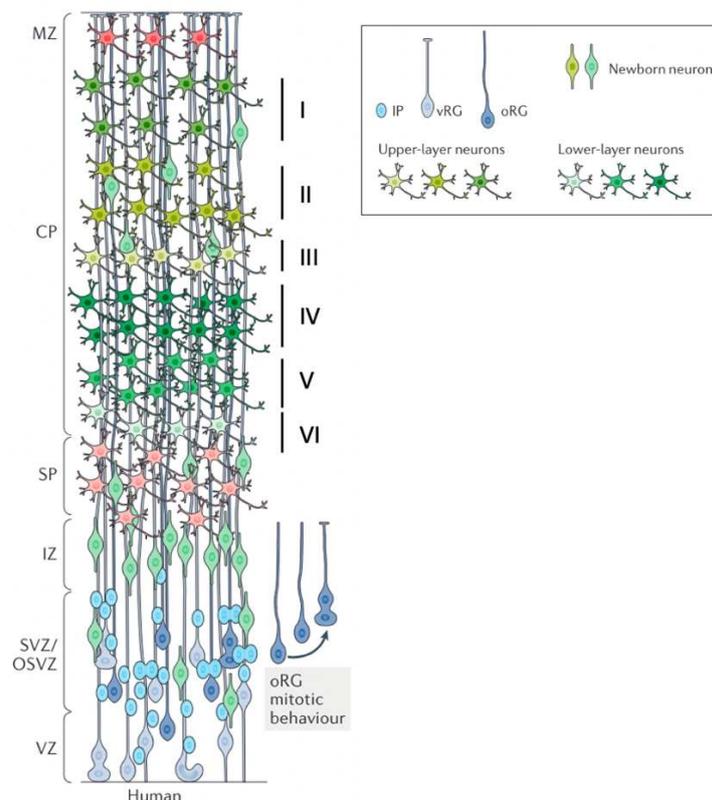
BioRender a été utilisé pour générer une partie de cette figure.

## II) Développement du cortex cérébral

Le cortex cérébral de l'Homme est une structure hautement organisée, complexe et constituée de six couches distinctes. Chacune contient une centaine de sous-types de neurones dont les profils d'expression génique, les modèles de projection ainsi que les morphologies diffèrent (Molyneaux et al., 2007). Les six couches qui le constituent sont annotées de I à VI en partant de la surface vers la profondeur et se distinguent par un ordre précis (Figure 35) (Mukhtar and Taylor, 2018) :

- La couche I ou couche moléculaire : pauvre en cellules nerveuses, elle est principalement composée de cellules gliales et fibres nerveuses horizontales de Cajal. Celles-ci ont un trajet parallèle à la surface corticale et leurs axones réalisent des synapses avec les cellules pyramidales.
- La couche II ou couche granulaire externe : principalement constituée de petits neurones non pyramidaux et reçoit des afférences cortico-corticales.

- La couche III ou couche pyramidale externe : contient la majorité des neurones pyramidaux ainsi que les interneurons et les connexions cortico-corticales efférentes. Les axones de ces neurones réalisent des connexions intra-hémisphériques ainsi qu'entre les deux hémisphères, interhémisphériques.
- La couche IV ou couche granulaire interne : contient des petits neurones non pyramidaux, principalement des cellules étoilées. Cette couche contient également des afférences extérieures au cortex.
- La couche V ou couche pyramidale interne : est constituée principalement de neurones pyramidaux de grande taille dont les dendrites projettent dans la couche IV ou la couche I. Les axones quant à eux projettent à distance vers des structures telles que la moelle épinière, le tronc cérébral ou encore le striatum.
- La couche VI ou couche polymorphe : est la source principale des neurones qui projettent vers le thalamus.



**Figure 35 : Organisation des couches corticales dans le cortex cérébral humain durant la corticogenèse**

(Modifié d'après Di Lullo and Kriegstein, 2017)

VZ : Zone Ventriculaire ; SVZ / OSVZ : Zone Sous-Ventriculaire / Zone Sous-Ventriculaire Extérieure ; oRG : Glie Radiale externe ; IZ : Zone Intermédiaire ; SP : Sous-Plaquette ; CP : Plaquette Corticale ; MZ : Zone Marginale ; IP : Progéniteurs Intermédiaires ; vRG : cellules ventriculaires de la glie radiale

Dans chaque couche corticale, on retrouve des neurones excitateurs et inhibiteurs. La majorité des neurones de projection sont excitateurs et synthétisent un acide aminé indispensable aux cellules : le glutamate. Ces neurones excitateurs possèdent majoritairement une morphologie de type pyramidale et possèdent une activité électrique active et régulière en réponse à un courant constant. De plus, ils projettent hors du cortex. Les interneurons sont quant à eux principalement inhibiteurs par le biais de la synthèse de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique, plus connu sous l'acronyme GABA, et représentent entre 15 et 20% de la population (Rubenstein, 2011). Leurs morphologies sont plus variées ainsi que leur activité électrophysiologique. De plus, ils jouent un rôle indispensable dans la mise en place des circuits neuronaux fonctionnels par le biais de leur fonction inhibitrice. Contrairement aux neurones excitateurs, ceux-ci ne projettent pas leurs axones en dehors du cortex (Connors and Gutnick, 1990).

Comme abordé précédemment, la corticogenèse (neurogenèse du cortex) est initiée par une phase très proliférative du neuroépithélium, lui permettant ainsi d'accroître la surface du télencéphale, qui deviendra *in fine* le cortex. Pendant cette période, les cellules qui constituent le neuroépithélium se divisent de manière symétrique, entraînant la production d'un groupe de progéniteurs corticaux se transformant par la suite en cellules gliales radiales ventriculaires (vRGC). Ces cellules peuvent également réaliser une division cellulaire asymétrique. Cette division correspondant à une phase de différenciation permet à partir d'une cellule de la glie radiaire de générer une nouvelle cellule de la glie radiaire mais aussi un progéniteur neural intermédiaire (PI) de type neuronal ou oligodendrocytaire. Les cellules ainsi générées dans la zone ventriculaire vont migrer vers les neurones de la zone intermédiaire (ZI), le long des fibres de la glie radiale et ce, jusqu'à la plaque corticale (PC). Ainsi, les premiers neurones qui naissent et migrent sont hétérogènes et s'assemblent afin de former la pré-plaque, considérée comme une ébauche du cortex et facilitant les migrations des cellules ainsi que l'établissement des projections axonales. Par la suite, la pré-plaque se divisera en sous-plaque (SP) et zone marginale

(ZM).

Pendant le processus de corticogénèse, plusieurs sous-types neuronaux sont générés par les divisions asymétriques successives des vRGC. Les premiers neurones atteignant la plaque corticale vont constituer les couches corticales les plus profondes tandis que ceux qui quittent le cycle des divisions cellulaires plus tard vont devoir traverser ces couches profondes afin d'atteindre leur position définitive au sein des couches corticales les plus superficielles. Au dernier stade du développement du cortex, le neuroépithélium est considérablement étendu et la ZV ne constitue plus qu'une simple couche de cellules qui limite les ventricules cérébraux. La zone sous ventriculaire (SVZ) contient des progéniteurs neuraux capables de se diviser et qui assureront le renouvellement de cellules gliales par la suite. La ZI forme alors la substance blanche sous-corticale (Figure 36) (Greig et al., 2013 ; Agirman et al., 2017 ; Muhktar and Taylor, 2018 ; Molnár et al., 2019).

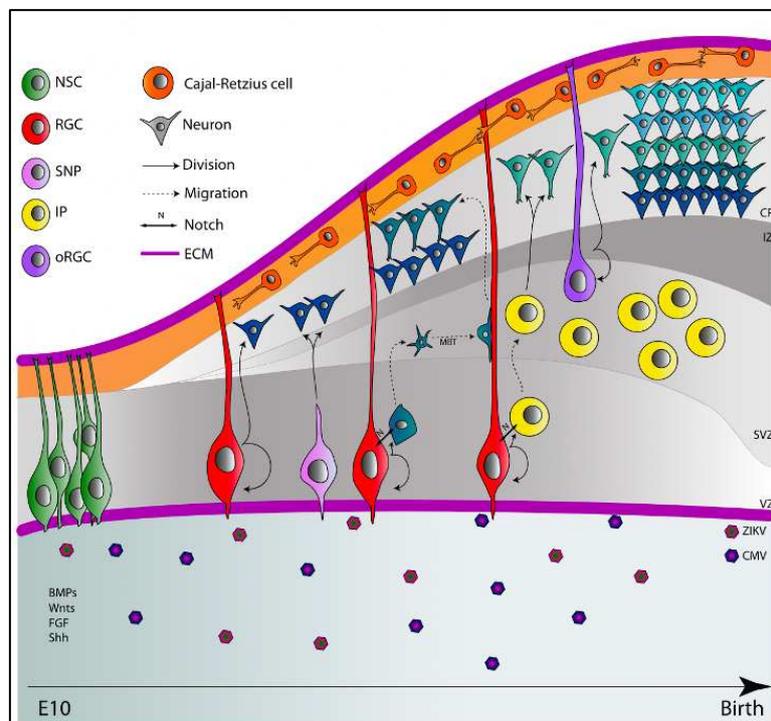


Figure 36 : Neurogenèse corticale de l'Homme  
(D'après Argiman et al., 2017)

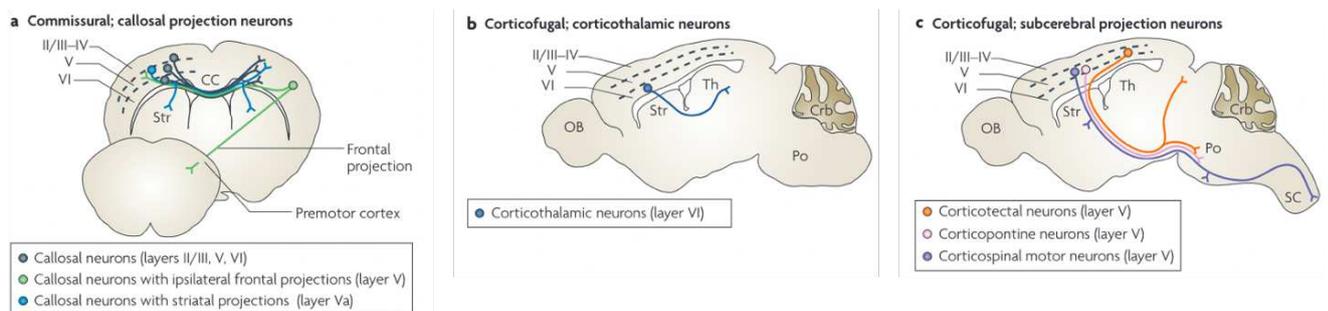
Le développement cortical nécessite l'implication de différents morphogènes et voies de signalisation. A ce jour, plusieurs voies de signalisation ont été identifiées dont les voies Notch, Shh (*Sonic hedgehog*), Wnt, l'acide rétinoïque (RA) ainsi que les facteurs TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor- $\beta$* ) et le FGF (*Fibroblast Growth Factor*) (Rallu et al., 2002 ; Agirman et al., 2017). Au cours du développement du cortex, les vRGC ainsi que des neurones voisins et des PI expriment les récepteurs Notch1/3. A la suite d'un contact entre les vRGC et des cellules avoisinantes, la voie de signalisation Notch s'active. Cette activation est indispensable pour le développement des cellules progénitrices (Pierfelice et al., 2011). La voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -Caténine est indispensable pour de nombreux processus physiologiques et cellulaires impliqués dans la prolifération, la différenciation ainsi que la migration au cours du développement embryonnaire (Bengoa-Vergniory and Kypta, 2015). Au-delà de son rôle dans la mise en place de la polarité dorso-ventrale, le facteur Shh est nécessaire à la régulation de la cinétique du cycle cellulaire des vRGC ainsi que dans la production des PI (Komada et al., 2008 ; Huang et al., 2010). Ce facteur contribue également à la génération d'oligodendrocytes et d'interneurones GABAergiques, se localisant dans la PC (Xu et al., 2010). Enfin, les facteurs de croissance TGF- $\beta$  et FGF ont été décrits comme impliqués dans la génération neuronale, la survie ainsi que la migration (Stipursky et al., 2014 ; Sahara and O'Leary, 2009).

### III) Mise en place des connexions neuronales dans le SN

#### A) Généralités

Les différents neurones qui constituent le cortex mettent en place un réseau de connexions riche sur de courtes distances mais également sur de longues distances. Ces différentes connexions sont indispensables pour le bon fonctionnement du cortex et la transmission des informations. A ce jour, les neurones de projection sont classés en trois catégories majeures, en fonction de leur position au sein des différentes couches corticales ainsi que des structures sur lesquelles ils projettent leur axone. Ainsi,

on distingue les neurones corticothalamiques, les neurones à projection calleuse et enfin les neurones à projection sous-corticale (Figure 37) (Molyneaux et al., 2007 ; Leyva-Díaz and López-Bendito, 2013; Kast and Levitt, 2019).

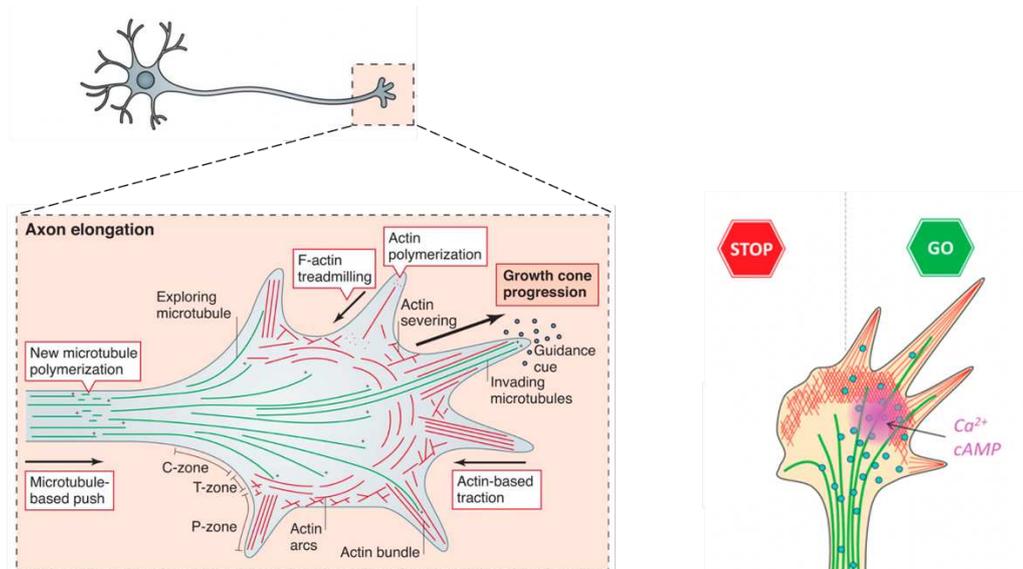


**Figure 37 : Différents types de connexions et neurones impliqués**

(D'après Molyneaux et al., 2007)

CC : Corps calleux ; Str : Striatum ; OB : Bulbe olfactif ; Th : Thalamus ; Po : Pons ; SC : moelle épinière

Afin de réaliser ces connexions parfois éloignées, les neurones ont besoin de projeter leur axone sur de très longues distances, processus qui implique de nombreux acteurs. Le premier évènement à se dérouler est la mise en place de la polarité des neurones. Cette polarité est acquise par les neurones en migration qui vont réaliser un déplacement postérieur, dirigé vers le ventricule, ainsi qu'un processus antérieur, dirigé vers la surface du cortex. Ce mouvement va induire l'apparition des futures dendrites et axone (Barnes and Polleux, 2009). A la suite de cette première étape induisant les prémisses de l'axone, celui-ci va croître afin de réaliser ses connexions avec ses cibles par le biais du guidage axonal. Pour cela, le cytosquelette du neurone doit être dynamique. La croissance de l'axone implique une structure bien spécifique de celui-ci, appelée cône de croissance (Figure 38) (Lewis et al., 2013). La mobilité de ce cône est permise par un réarrangement rapide et contrôlé du cytosquelette, notamment de l'actine et des microtubules dont le taux intracellulaire de  $Ca^{2+}$  est le facteur principal (Dent and Kalil, 2001 ; Gomez and Zheng, 2006 ; Igarashi, 2019 ; Dogterom and Koenderink, 2019). C'est par le biais de ce cône de croissance que les axones initient leur trajet jusqu'à leur cible, parfois très éloignée.



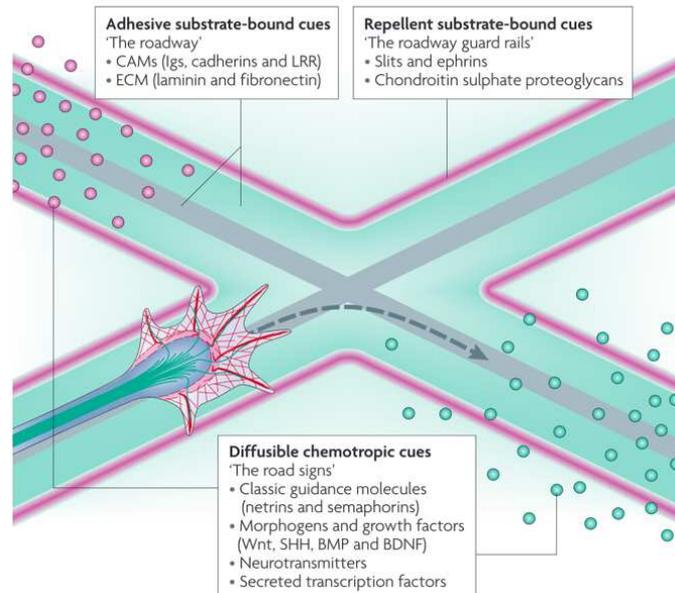
**Figure 38 : Structure et mécanismes du cône de croissance des neurones**

(Modifié d'après Lewis et al., 2013 (gauche) ; Igarashi et al., 2019 (droite))

*Gauche.* Le cytosquelette est une structure dynamique lors de la croissance du cône de croissance. Dans le but d'être guidé jusqu'à sa cible, différentes forces s'effectuent sur celui-ci, attractives mais également répulsives. *Droite.* La croissance du cône est régulée par des molécules de guidage axonal via des sur ou sous-régulations de seconds messagers tels que  $Ca^{2+}$  et cAMP.

## B) Molécules impliquées dans le guidage axonal

Dès les premières observations du cône de croissance axonal permettant au neurone de s'orienter et de réaliser ses connexions, une interrogation a émergé. Comment cette structure complexe fait elle pour se diriger jusqu'à sa cible ? Longtemps restée sans réponse, cette question a maintenant plusieurs éléments de réponse. Dès le début des années 60, il est suggéré que le cône possède une « étiquette moléculaire » afin de se diriger en répondant à des gradients de molécules (Sperry, 1963). Depuis cette hypothèse, des études ont permis d'identifier différents acteurs du guidage axonal dont plusieurs familles de ligands et de récepteurs. A ce jour, on distingue quatre grands types de mécanismes : la chimio-attraction, la chimio-répulsion, l'attraction de contact et enfin la répulsion de contact (Figure 39) (Tessier-Lavigne and Goodman, 1996 ; Lowery and Van Vactor, 2009).



**Figure 39 : Différents mécanismes impliqués dans le guidage du cône de croissance de l'axone**

(D'après Lowery et al., 2009)

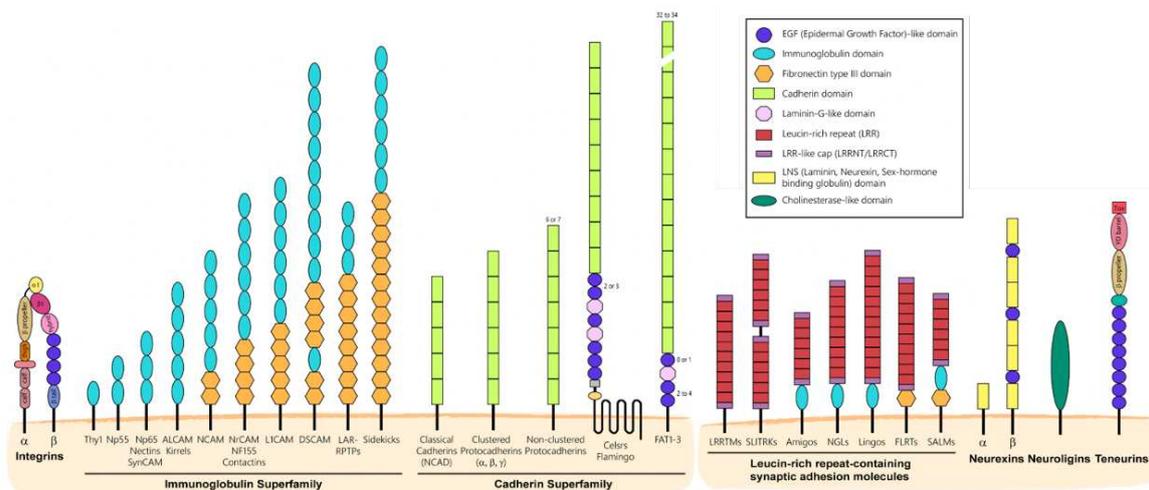
Le cône de croissance rencontre de nombreux types de signaux différents dans son environnement. Il se déplace sur une "route" constituée de molécules adhésives qui sont soit assemblées dans une matrice extracellulaire (MEC) dense et complexe (par exemple, la laminine et la fibronectine), soit présentées directement sur la surface d'une cellule voisine (par exemple, les molécules d'adhésion cellulaire transmembranaires (CAM)). En outre, des molécules anti-adhésives liées à la surface (telles que les Slit, les éphrines et les protéoglycans chondroïtine sulfate) peuvent empêcher l'avancée du cône de croissance et fournir ainsi les "garde-fous" qui déterminent les limites de la route pour le cône. Enfin, les signaux chimiotropes diffusibles sont les "panneaux de signalisation" qui donnent d'autres instructions de direction au cône de croissance et comprennent diverses molécules chimiotropes diffusibles (telles que les netrines et les sémaphorines), ainsi que des morphogènes (tels que Wnt, sonic hedgehog (SHH) et la protéine morphogénétique osseuse (BMP)) et des facteurs de croissance ou neurotrophiques (tels que le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF)), des facteurs de transcription sécrétés et des neurotransmetteurs.

### ***Les signaux non diffusibles***

Il existe différentes classes de molécules non diffusibles de guidage de l'axone. Les premières molécules dont le rôle a été identifié sont les fibronectines, les laminines et les collagènes (Evans et al., 2007). Ces trois molécules d'adhésion appartiennent au complexe macromoléculaire extérieur à la cellule appelé matrice extracellulaire (MEC) et possèdent des actions différentes en fonction du type neuronal avec lequel elles sont en contact. La laminine favorise la pousse axonale ainsi que la pousse dendritique (Chen and Strickland, 2003 ; Chen et al., 2009). Largement utilisée en tant que support de culture pour les cellules *in vitro*, elle permet une adhérence solide des neurones. A l'inverse, la fibronectine, engendre différentes réactions en fonction du type neuronal, favorisant une pousse des cellules nerveuses du SNP à l'inverse des cellules nerveuses

du SNC (Rogers et al., 1989). Bien que ces molécules puissent être sécrétées par les cellules elles-mêmes ou par les cellules avoisinantes, elles ne sont pas diffusées sur de grandes distances.

La seconde classe est composée de molécules d'adhérences cellulaires (CAM, *Cell Adhesion Molecules*) (Figure 40). Depuis leur classement initial en quatre familles, l'identification de nombreuses protéines telles que les intégrines, les cadhérines et d'autres a été réalisée (Moreland and Poulain 2022).



**Figure 40 : Principales familles des CAMs**

(Modifié d'après Moreland and Poulain, 2022)

Différentes familles de CAMs ont été identifiées et sont exprimées dans le système nerveux. Ces molécules ont des localisations et des structures qui diffèrent, leur permettant des interactions variées et spécifiques.

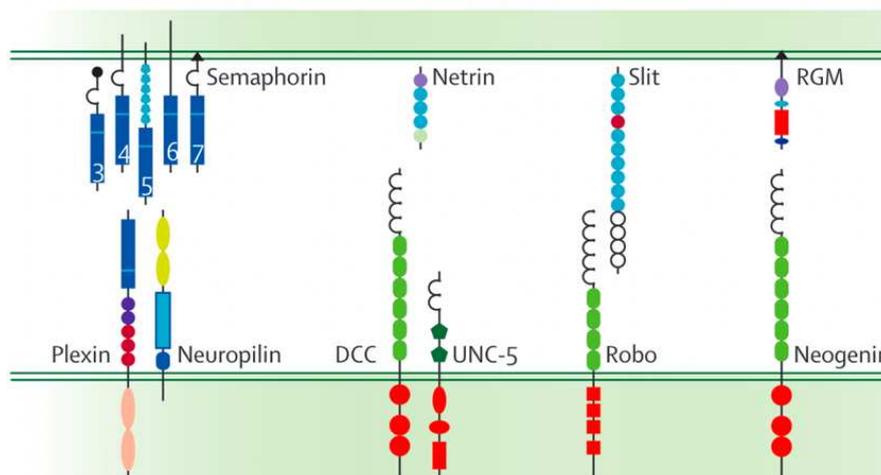
Les domaines extracellulaires de ces protéines sont divers et permettent de réguler différents aspects neurodéveloppementaux dont celui de la neurogenèse (Huang et al., 2020), la migration neuronale (Chen et al., 2018), le développement neuritique (Missaire and Hindges, 2015) et la synaptogenèse (Yogev and Shen, 2014). Au-delà de leurs fonctions dans l'adhésion des neurones, certaines CAMs peuvent stimuler la transcription de gènes par l'activation de voies de signalisation intracellulaires (Moreland and Poulain, 2022). C'est le cas par exemple de L1CAM (*L1 cell adhesion molecule protein*) qui est capable d'activer la voie des MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) dans le but de promouvoir la pousse neuritique (Poplawski et al., 2012).

Enfin, il existe une dernière classe de molécules non diffusibles impliquées dans le guidage axonal constituée des éphrines et de leurs récepteurs (Yu and Bargmann, 2001). Les récepteurs Eph sont particulièrement nombreux, on dénombre 16 récepteurs divisés en deux sous-familles : EphAs et EphBs (Zhang et al., 2021). Les récepteurs Eph de type A sont divisés en EphA1-EphA10, tandis que les récepteurs Eph de type B sont divisés en EphB1-EphB6 (Alfaro et al., 2020). Certains récepteurs de type A (EphA1-EphA8 et EphA10) peuvent se lier aux éphrines de type A (EphrinA1-Ephrin-A5) et les activer avec des spécificités de liaison distinctes. Les récepteurs Eph de type B (EphB1-EphB4 et EphB6) interagissent avec les éphrines de type B (Ephrin-B1-Ephrin-B3). Cependant, il existe certains cas particuliers de liaison entre les deux types (Barquilla and Pasquale, 2015). Ces protéines situées à la surface ont, de par leurs interactions ainsi que le contexte cellulaire, un effet attractif ou répulsif (Klein, 2005 ; Klein and Kania, 2014). Tout comme les CAMs, le rôle des éphrines dans le développement cérébral ne se limite pas à ses fonctions d'attraction ou de répulsion. Leurs implications dans le développement synaptique ainsi que la plasticité ont été identifiées (Lai and Ip, 2009). De plus, elles régulent la migration cellulaire ainsi que la direction des axones au cours du développement (Zhang et al., 2021). Par exemple, l'Ephrine-A1-3 et l'Ephrine-B1-3 sont impliquées dans la régulation de la morphologie et de la structure des épines dendritiques afin de réguler la plasticité synaptique, favoriser la génération et l'expansion transitoires des NSC ainsi que des cellules progénitrices (Murai et al., 2003 ; Asthon et al., 2012). Chez l'adulte, les Ephrines ont été décrites comme impliquées dans la réparation des systèmes nerveux endommagés (Bundesen et al., 2003), la régénération du système nerveux central et la régulation de la neuroplasticité (Coulthard et al., 2012).

### *Les signaux diffusibles*

Bien que les signaux non diffusibles permettent de guider le cône, ces signaux ne sont pas les seuls impliqués. En effet, lors de la croissance de l'axone, celui-ci a pour objectif de trouver sa cible tout en évitant les cibles inappropriées. Prédite par le

neuroscientifique Ramón y Cajal, l'identification des molécules impliquées dans le guidage axonal par chimio-attraction et chimio-répulsion s'est initiée à partir du début des années 1990. A ce jour, différentes familles de molécules chimiotactiques ont été identifiées dans le processus de guidage axonal (Figure 41) (Yu and Bargmann, 2001, Van Battum et al., 2015).



**Figure 41 : Molécules du guidage axonal diffusibles et leurs récepteurs**

(Modifié d'après Van Battum et al., 2015)

Plusieurs familles de protéines de guidage axonal ont été identifiées (haut) qui se lient à des récepteurs de cônes de croissance spécifiques et émettent des signaux par leur intermédiaire (bas).

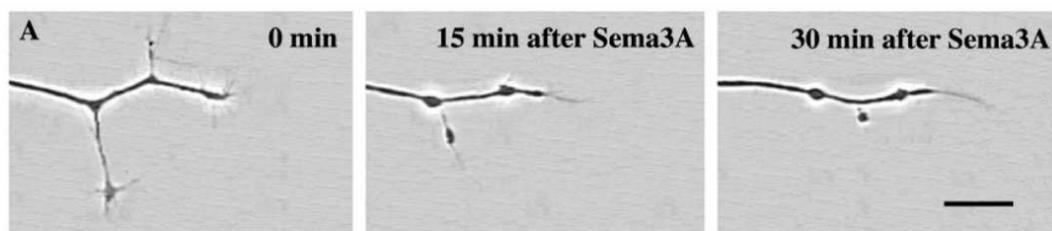
RGM : Molécules de Guidage Répulsives ; DCC : *Deleted in Colorectal Cancer*

Parmi ces familles, la plus connue est celle de la nétrine. Découverte chez *Caenorhabditis elegans*, elle est initialement nommée *Unc6 (Unccordinated 6)* (Ishii et al., 1992). Celle-ci est conservée chez les mammifères, qui expriment les nétrines-1, -3, -4, -5, -G1 et -G2 (Lai Wing Sun et al., 2011). La nétrine-1 est une molécule primordiale dans le guidage axonal, sa fonction (attractive ou répulsive) variant en fonction du récepteur avec lequel elle interagit. En effet, celle-ci-peut interagir avec la molécule DCC (*Deleted in Colorectal Cancer*) induisant un réarrangement du cytosquelette modulant l'attraction ou la répulsion (Finci et al., 2014). Un autre récepteur, *Unc5* médie quant à lui la chimio-répulsion dépendant de la nétrine, bien que cet effet semble être dépendant de la présence de DCC (Finci et al., 2014).

Une autre famille est celle de Slit et de son récepteur *Robo (Roundabout)*. Découverts chez la *Drosophile* (Rothberg et al., 1988), Slit est une protéine sécrétée qui interagit avec son récepteur *Robo* ayant un effet répulsif, empêchant ainsi l'axone de

faire demi-tour et l'obligeant donc à prendre un chemin unidirectionnel (Kidd et al., 1999). Les ligands Slit et leurs récepteurs Robo sont conservés chez les mammifères. A ce jour, chez l'Homme, Slit compte 3 sous-types (Slit1-Slit3) et Robo en compte 4 (Robo1-Robo4) (Tong et al., 2019). Son implication dans d'autres mécanismes que le guidage axonal tel que la prolifération des cellules progénitrices du néocortex a également été mise en évidence (Gonda et al., 2020).

Enfin, les sémaphorines sont des molécules chimio-répulsives principalement actives au cours du développement neural. Chez les mammifères, les sémaphorines sont divisées en cinq classes et leurs principaux récepteurs sont des protéines membres des familles des plexines et des neuropilines (Van Battum et al., 2015). Ces protéines sont capables de se lier à la surface des cellules ou à la MEC et ainsi empêcher la croissance d'axones voisins (Figure 42) (Dontchev and Letourneau, 2002). Bien que l'activité du domaine cytoplasmique de ces récepteurs ne soit pas connue, la signalisation de celle-ci va induire des changements dans la concentration de calcium intracellulaire (Treinys et al., 2014). Ainsi, les sémaphorines et leurs récepteurs régulent différents aspects du développement du circuit neuronal dont la croissance et le guidage de l'axone (Pasterkamp, 2012).



**Figure 42 : Effet de la Sémaphorine 3A (Sema3A) sur le guidage du cône de croissance**

(Dontchev and Letourneau, 2002)

L'exposition du cône à la Semaphorine 3A empêche sa croissance. Ainsi, les structures telles que des courbes et des boucles sont limitées.

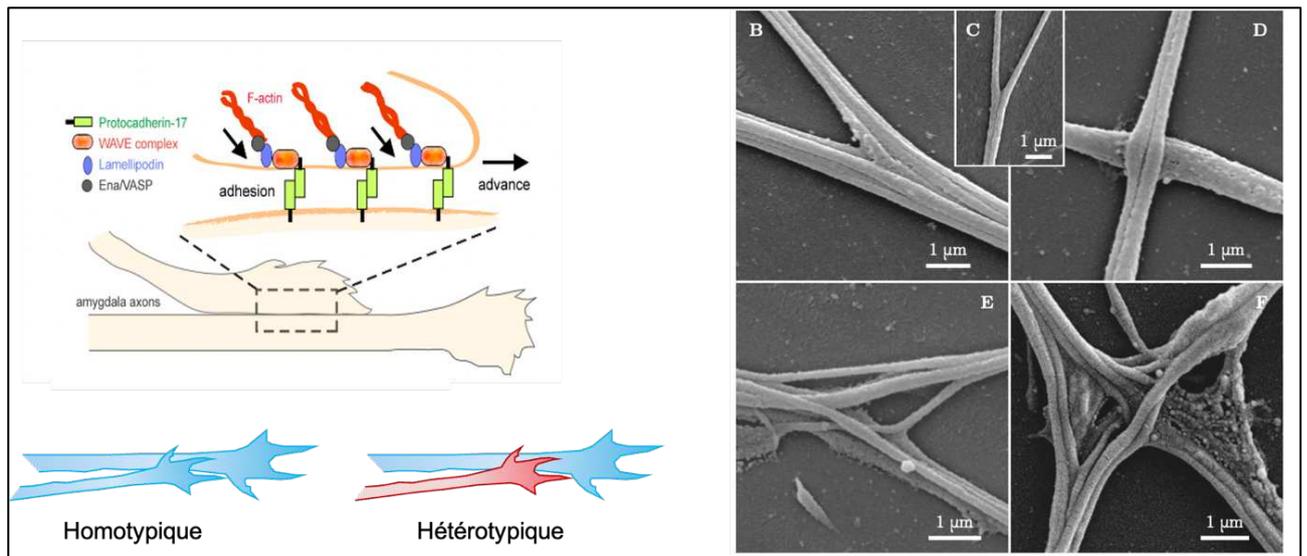
D'autres molécules telles que les RGM (*Repulsive Guidance Molecule*), les ALCAM (*Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule*), les NCAM (*Neural Cell Adhesion Molecule*) et les DSCAM (*Down Syndrome Cell Adhesion Molecule*) ont été identifiées comme impliquées dans les mécanismes de guidage axonal par des effets chimiotactiques (Van Battum et al., 2015 ; Moreland and Poulain, 2022).

Ainsi, les axones, lors de leur croissance, suivent des signaux précis de reconnaissance et de guidage jusqu'à leur cible. Ces mécanismes sont complexes et font intervenir des signaux non diffusibles (molécules d'adhésion cellulaire) ainsi que des signaux diffusibles (molécules chimiotactiques et leurs récepteurs). Le cône de croissance va croître ou régresser en fonction de ses interactions avec certaines de ces molécules.

### **C) Le mécanisme de fasciculation axonale**

Le premier axone à définir l'itinéraire vers la cible appropriée est appelé axone pionnier. Au-delà de son rôle essentiel dans l'initiation de l'assemblage des circuits neuronaux, il sert de guide en fournissant un échafaudage aux axones apparaissant plus tard et qui vont le suivre (Rash and Richards, 2001). Ce phénomène, également appelé fasciculation axonale, est indispensable dans la mise en place de nombreuses connexions mais aussi dans un contexte structural, comme c'est le cas dans les systèmes olfactif et rétino-ectal. L'ablation des neurones pionniers induit une altération de l'acheminement des axones suiveurs qui ne parviennent pas à établir les connexions appropriées (Whitlock and Westerfield, 1998 ; Pittman et al., 2008 ; Okumura et al., 2016).

La fasciculation peut se réaliser de manière homotypique ou hétérotypique impliquant notamment les CAMs dans la régulation de celle-ci (Figure 43) (Spead and Poulain, 2020). Ces interactions dynamiques entre les axones dans le but de fasciculer entre eux implique également un comportement de type fermeture éclair (Figure 43) (Šmít et al., 2017). Les CAMs engagées dans des fasciculations homotypiques (entre les mêmes CAMs) ou hétérotypiques (entre des CAMs différentes) modulent la reconnaissance sélective entre les cônes de croissance et les tiges axonales déjà existantes. Elles apportent aussi la force adhésive nécessaire à l'avancée des cônes de croissance par le biais de leur couplage au cytosquelette d'actine (Figure 43) (Pollerberg et al., 2013 ; Abe et al., 2018).



**Figure 43 : Axone pionnier et suiveur, nature des interactions et mécanisme de fermeture éclair**

(Moreland and Poulain, 2022 ; Šmít et al., 2017)

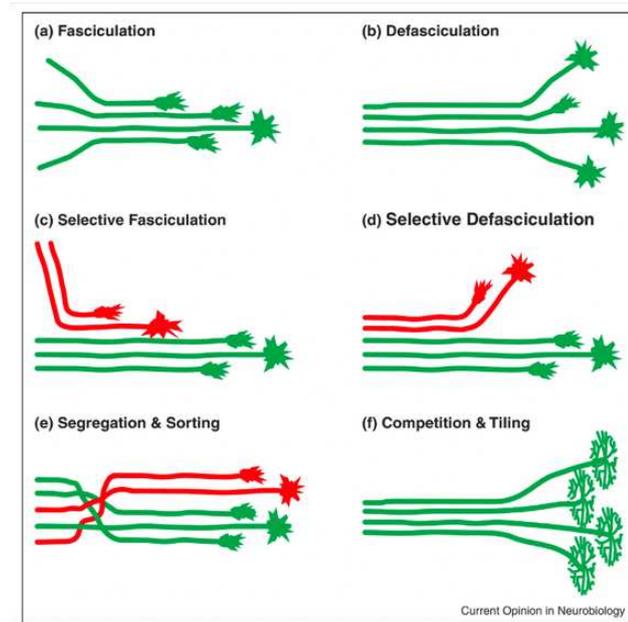
Différentes molécules sont impliquées dans le mécanisme de fasciculation et le déplacement du neurone suiveur le long du neurone pionnier. La nature des interactions peut être homotypique ou hétérotypique. Suite à l'interaction entre les deux neurones, un mécanisme de fermeture éclair permet aux neurones de fasciculer.

Une altération des CAMs induit des trajets désorganisés. Il a notamment été montré qu'une inhibition de L1CAM dans le membre postérieur du poussin induit une défasciculation (séparation) des axones moteurs et sensoriels qui n'arrivent pas à rejoindre leurs cibles (Honig et al., 2002). Pareillement, l'implication de la DSCAM et la ALCAM dans la fasciculation des axones rétiniens a été mise en évidence (Weiner et al., 2004 ; Bruce et al., 2017).

La superfamille des cadhérines a également été décrite comme régulatrice de la fasciculation homotypique. Les axones suiveurs réalisent une fasciculation sélective avec les axones exprimant la même cadhérine (Treubert-Zimmermann et al., 2002). Ces résultats ont soulevé la complexité et la spécificité des interactions des molécules lors de la fasciculation. Par exemple, la cadhérine-8 et la N-cadhérine sont toutes deux nécessaires à la fasciculation dans l'hippocampe de souris (Bekirov et al., 2008), alors que la cadhérine-11 est nécessaire pour la fasciculation des axones moteurs (Marthiens et al., 2005). Enfin, les rôles d'autres molécules comme la protocadhérine-17 (Pcdh17), la sémaphorine-3D (Sema3D), la sémaphorine-3A (Sema3A), la NF-protocadhérine (NFPC) ou encore la NCAM, dans les mécanismes de fasciculation et l'inhibition de celle-ci ont été identifiés (Hayashi et al., 2014 ; Wolman et al., 2007 ; Leung et al., 2013,

Wakade et al., 2013).

La compréhension des mécanismes impliqués dans l'élaboration des connexions entre les axones n'a cessé de se perfectionner depuis des années. A ce jour, différents mécanismes permettant aux axones de se regrouper ou au contraire de se séparer sont décrits (Figure 44) (Wang and Marquardt, 2013).



**Figure 44 : Différents types d'interactions axone-axone**  
(Wang and Marquardt, 2013)

Dans le contexte *in vivo*, les rencontres axone-axone peuvent se réaliser dans un certain nombre de configurations différentes et donner lieu à des résultats variés. On peut distinguer quatre configurations principales : (a) fasciculation (regroupement des axones), (b) défasciculation (dissolution des faisceaux d'axones) (c) fasciculation sélective (regroupement d'axones suiveurs spécifiques le long des axones pionniers), et (d) défasciculation sélective (dissociation d'un ensemble spécifique d'axones d'un faisceau). D'autres interactions ont été décrites : (e) ségrégation ou tri (d'ensembles spécifiques d'axones par rapport à d'autres axones au sein d'un faisceau) et (f) compétition (des axones pour l'espace cible) ainsi que le « carrelage » (espacement des arborisations terminales des axones).

Cependant, bien que de nombreuses molécules aient été identifiées comme impliquées dans le phénomène de fasciculation axonale, leur régulation espèce-dépendante reste à étudier. De même, l'implication de certaines molécules, dont les Ephrines et les Slits dans la fasciculation et notamment leurs interactions avec les CAMs, restent encore à déterminer (Wang and Marquardt, 2013 ; Moreland and Poulain, 2022).

#### IV) Guidage axonal et pathologies neurologiques

Comme présenté précédemment, la mise en place d'un réseau neuronal est indispensable pour les fonctions du SN et nécessite l'intervention d'un ensemble de processus variés et hautement régulés. La perturbation d'un seul d'entre eux, que ce soit en raison d'une mutation génétique ou par l'exposition à des substances chimiques, peuvent induire des effets dévastateurs sur leur mise en place (Gandawijaya et al., 2021 ; Mathews et al., 2021).

A ce jour, des défauts de connexions neuronales ont été rapportés dans de nombreuses maladies neurodéveloppementales dont le syndrome de l'X fragile (Swanson et al., 2018), la sclérose tubéreuse de Bourneville (Baumer et al., 2015 ; Im et al., 2016) ainsi que dans les troubles du spectre autistique (Hamamy et al., 2015 ; Van Battum et al., 2015). Dans ce sens, des mutations dans les gènes codant pour les protéines impliquées dans le guidage axonal présentées précédemment ont été identifiées dans plusieurs maladies psychiatriques et neurodéveloppementales (Sakurai, 2017 ; Cuttler et al., 2021). C'est notamment le cas de L1CAM dont les mutations sont corrélées à plusieurs maladies dont le syndrome de CRASH (hypoplasie du Corps calleux, Retard mental, pouces Adductus, paraplégie Spastique et Hydrocéphalie) ou les HSP (Hereditary Spastic Paraplegia), (Fransen et al., 1997). De même, le défaut de plusieurs intégrines a été identifié dans la schizophrénie, l'épilepsie et les troubles du spectre autistique (Jaudon et al., 2021). Des mutations dans le gène *ROBO* ont également été associées à des défauts axonaux du cerveau postérieur (cervelet, pons et bulbe rachidien, Jen et al., 2004). De manière plus spécifique, des anomalies de fasciculation ont été rapportées dans plusieurs études. Par exemple, dans le cadre de la modélisation du syndrome de Rett, il a été montré dans un modèle murin que la mutation du gène *MECP2* (*methyl CpG binding protein 2*) était à l'origine d'une altération fonctionnelle de SemA3F, induisant un défaut de fasciculation des axones du bulbe olfactif (Degano et al., 2009). Une étude réalisée en 2018 a montré qu'une mutation du gène *TFG* (*tropomyosin receptor kinase-fused gene*), identifié comme impliqué dans la HSP, favorise l'accumulation de L1CAM à la surface des axones et que

son inhibition induit une altération du mécanisme physiologique de fasciculation des axones des neurones corticaux reliés à la moelle épinière (Slosarek et al., 2018). De plus, cette étude rapporte également que la mutation de *TFG* impacte le trafic sécrétoire des protéines et qu'elle induit une élévation du stress du RE.

Des altérations des connexions neuronales ne sont pas exclusivement observées dans les maladies neurodéveloppementales, mais également dans certaines maladies neurodégénératives, notamment dans les maladies de Parkinson (MP), d'Alzheimer (MA) et la Sclérose Latérale Amyotrophique (ALS, maladie de Charcot) (Van Battum et al., 2015). De manière intéressante, des variations dans les gènes impliqués dans le guidage axonal ont été identifiées par différentes études notamment pour la MP et la MA (Lin et al., 2009 ; Bossers et al., 2009 ; Antonell et al., 2013 ; Wang et al., 2016). Bien que des modulations de ces gènes soient observées dans le contexte de la plasticité cérébrale ainsi que lors de réparations des lésions dans le SN adulte (Curinga et al., 2008, Pasterkamp and Giger, 2009), l'étude de ces variations pourrait être un outil puissant afin d'identifier les prémisses de ces maladies. Actuellement, une partie des rôles et mécanismes des protéines du guidage axonal a été élucidée dans la MA (Mann et al., 2007 ; Pasterkamp and Giger, 2009 ; Zhang et al., 2021).

Depuis plus de cinquante ans maintenant, les connaissances de la neurogenèse et de l'ensemble des processus qu'elle implique n'ont cessé de s'enrichir. L'identification des différentes familles de molécules du guidage axonal ainsi que leurs rôles ont ainsi permis de mieux appréhender la complexité de la mise en place des connexions neuronales de l'organisme. Leur implication dans des maladies neurodéveloppementales et neurodégénératives ont notamment été identifiées. Ainsi, la nécessité d'approfondir nos connaissances de celles-ci est indispensable afin de mieux appréhender ces maladies.

Dans le cadre du syndrome de Wolfram, l'identification d'atteintes neurodéveloppementales et neurodégénératives soulève de nombreuses interrogations quant au rôle de la wolframine dans la mise en place du cortex cérébral. Bien que mis en évidence par IRM, l'étude des mécanismes à l'origine de ces atteintes

reste compliquée de par la nature et la localisation de celles-ci. Face à ces limites, l'approche réalisée pendant mon doctorat au sein de l'équipe a consisté à exploiter les propriétés des cellules souches pluripotentes présentées dans le chapitre suivant.

## Chapitre 3 : Les cellules souches pluripotentes

Pendant de nombreuses années, les études portant sur la compréhension des mécanismes physiologiques (cellulaires et moléculaires), développementaux et physiopathologiques chez l'Homme ont été restreintes par la source des modèles. Initiées sur des échantillons post-mortem et sur des biopsies de patients permettant l'obtention de cellules primaires, ces études ont permis d'acquérir de nombreuses connaissances scientifiques et médicales actuelles. Cependant, bien que ces travaux aient été majeurs, ces modèles cellulaires possèdent un grand nombre de limites telles que des capacités prolifératives faibles, des difficultés d'obtention et leur utilisation limitée dans le cadre de thérapie cellulaire.

Face aux limites de ces modèles, la découverte réalisée en 1998 par l'équipe d'Alexander Thomson a bouleversé la communauté scientifique. L'équipe américaine est parvenue à maintenir *in vitro* pour la première fois des cellules souches embryonnaires humaines (CSEh). La découverte de ces cellules, dotées de propriétés exceptionnelles qui seront développées dans ce chapitre, a été synonyme d'espoir dans de nombreux domaines. Cependant, leur origine a soumis l'utilisation de celles-ci à des débats éthiques relatifs à la recherche sur l'embryon. Cette contrainte est levée en 2007 par une équipe japonaise dirigée par le Pr Shinya Yamanaka qui est parvenue, par modification génétique, à convertir des cellules somatiques humaines adultes en cellules souches dites induites à la pluripotence (CSPi). L'enthousiasme de la communauté scientifique autour des capacités extraordinaires de ces cellules n'a jamais diminué et ce depuis leur première description. Les cellules souches pluripotentes (CSP) ont révolutionné la recherche biomédicale et ont démontré la puissance de leur exploitation. Il est donc nécessaire d'en comprendre l'émergence, les applications médicales, sans oublier les limitations afin d'évaluer le potentiel et l'intérêt de l'utilisation de ces cellules dans le cadre de la modélisation de maladies génétiques rares telles que le syndrome de Wolfram.

## l) Les cellules souches : un outil précieux pour la recherche

### A) Cellules souches : définitions

Les cellules souches sont caractérisées par deux propriétés fondamentales : elles ont la capacité d'une part de s'auto-renouveler et d'autre part de donner naissance à des cellules filles spécialisées. Cependant, toutes les cellules souches n'ont pas le même potentiel de différenciation. A l'heure actuelle, quatre catégories de cellules souches ont été identifiées et se distinguent principalement par leur capacité de différenciation ainsi que par leur présence au cours de la vie (Figure 45).

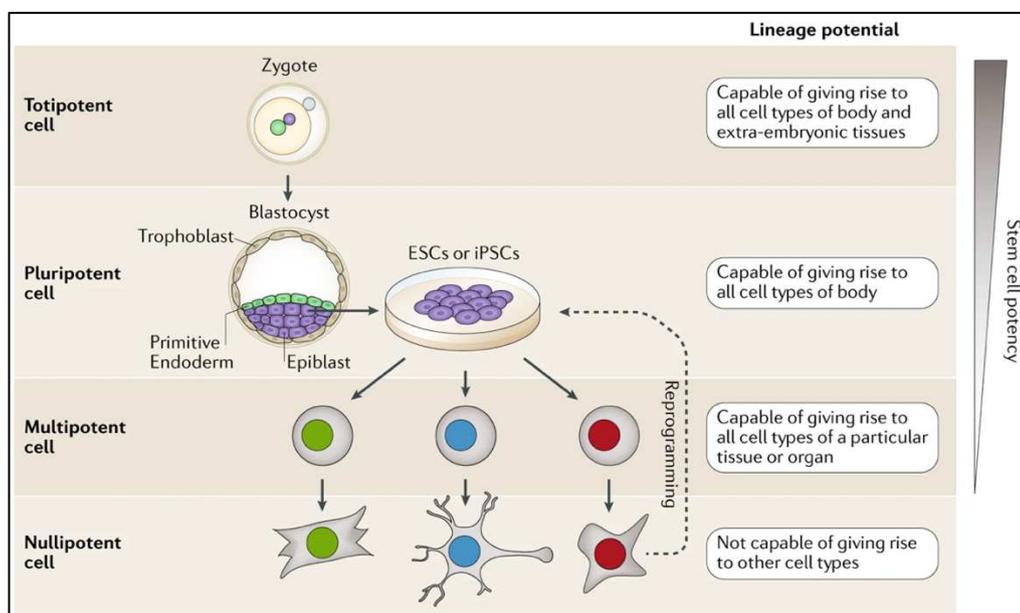


Figure 45 : Hiérarchie des cellules souches

(Tewary et al., 2018)

Issues des premières divisions de l'œuf fécondé, les cellules souches totipotentes sont capables de donner naissance à tous les types de cellules de l'organisme. Au stade blastocyste, les cellules deviennent pluripotentes et peuvent donner naissance à toutes les cellules du corps à l'exception des annexes embryonnaires. Les cellules se spécialisent ensuite dans l'un des trois feuillets embryonnaires au stade multipotent. Enfin, les cellules atteignent un niveau d'unipotence dont la capacité de division est limitée. ESC : Embryonic Stem Cells / Cellules souches embryonnaires ; iPSCs : induced Pluripotent Stem Cells / Cellules Souches induites à la Pluripotence

Les cellules souches **totipotentes** sont présentes du stade zygote (stade une cellule, ovule fécondé) jusqu'au stade morula (stade de seize à soixante-quatre cellules). Ces cellules sont à l'origine d'un organisme entier et possèdent ainsi la capacité de générer tous les types cellulaires : embryonnaires (dans les trois feuillets : ectoderme, endoderme et mésoderme), ainsi qu'extra-embryonnaires (cordon ombilical, membranes et placenta).

Les cellules souches **pluripotentes** (CSP) apparaissent environ au 4 – 5<sup>ème</sup> jour après la fécondation. Suite à une succession de divisions cellulaires de la morula, le nombre de cellules devient supérieur à soixante-quatre et la morula devient alors blastocyste. Cette structure est caractérisée par la présence d'un amas de cellules appelé masse cellulaire interne (MCI) et d'une couche de cellules périphériques jointives en couronne appelée trophoblaste. Le trophoblaste va être à l'origine des tissus extra-embryonnaires, la MCI quant à elle va se développer et devenir l'embryon (Wobus and Boheler, 2005). Les CSP sont issues de la MCI et sont appelées ainsi car elles possèdent la capacité de générer les trois feuillets embryonnaires (ectoderme, endoderme et mésoderme) cependant, elles ne peuvent pas générer les annexes embryonnaires.

Les cellules souches **multipotentes** apparaissent à un stade du développement plus avancé. Comme les CSP, ces cellules sont indifférenciées et possèdent la capacité de s'auto-renouveler, cependant leur potentiel de différenciation est moins important. En effet, elles sont capables de donner uniquement les différentes cellules spécialisées d'un lignage cellulaire donné. Ces cellules sont présentes au stade fœtal ainsi qu'au stade adulte. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont un bon exemple de ces cellules (Clevers, 2015).

Enfin, les cellules souches **unipotentes** ont un potentiel de différenciation très limité et ces cellules ne peuvent se différencier qu'en un seul type cellulaire, du même lignage dont elles sont issues.

## **B) Les cellules souches pluripotentes humaines : découvertes**

### **1) Les cellules souches embryonnaires**

C'est au début des années 1980 que les premières dérivations de cellules souches embryonnaires (CSE) murines ont été décrites par deux équipes (Evans and Kaufman, 1981 ; Martin, 1981). Ces études réalisées à partir de blastocystes murins ont permis de générer de manière efficace des lignées stables et sans anomalie caryotypique. Depuis ces travaux princeps, la culture de CSE a été étendue à d'autres

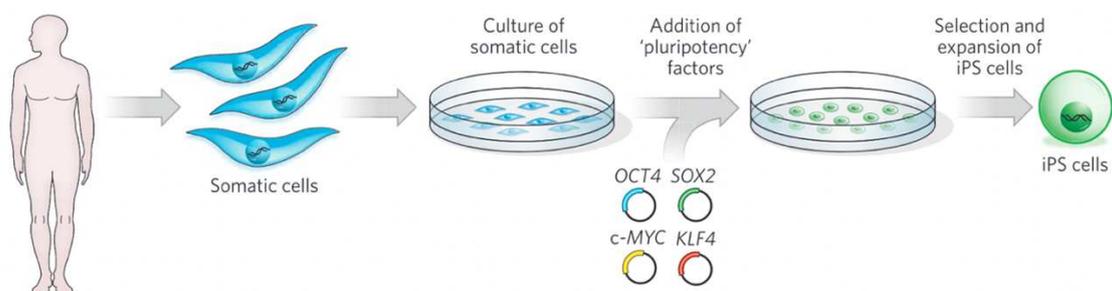
mammifères tels que le hamster (1988), le cochon (1991), le vison (1992), le lapin (1993), le rat (1994), le Macaque rhésus (1995) (Thomson et al., 1995 ; Gardner and Brook, 1997). C'est en 1998 que la dérivation de la première lignée de CSE humaines (CSEh) est réalisée (Thomson et al., 1998). Celle-ci a été générée à partir de blastocystes humains issus de fécondation *in vitro* (FIV), cédés à la recherche avec le consentement éclairé des parents. Suite à cette découverte, les méthodes de culture *in vitro* des CSEh se sont continuellement améliorées. Initialement, les CSEh étaient cultivées sur une couche de cellules nourricières de fibroblastes murins (MEF : *Mouse Embryonic Fibroblast*) inactivées par traitement chimique ou irradiations. De même, l'évolution des matrices de culture, des milieux de culture, l'identification de facteurs de croissance et cytokines ont contribué à l'amélioration de la qualité des CSEh et de leur maintien en culture (Skottman and Hovatta, 2006 ; Kawamura et al., 2012). Toutes ces avancées ont permis d'optimiser les conditions de culture afin de permettre un maintien stable des lignées de CSEh, paramètre indispensable dans de nombreux aspects dont la thérapie cellulaire (Tannenbaum et al., 2012).

Cependant, l'origine de ces cellules soulève des questions éthiques impliquant une utilisation réglementée. En France, leur législation est stricte et évolue avec prudence. Initialement interdite dans les premières lois de Bioéthique, une évolution législative a permis en 2004 de passer d'une interdiction formelle à une interdiction avec dérogation délivrée par l'Agence de la Biomédecine (structure étatique créée en 2005), pour une durée de 5 ans. Cette évolution a ainsi permis à quelques laboratoires de voir le jour tel que l'I-STEM (*Institute for Stem cell Therapy and Exploration of Monogenic diseases*). Une révision récente de cette loi (2021) a permis de passer d'une demande de dérogation à une déclaration. Bien que moins contraignantes à l'heure actuelle, de nombreux groupes ont souhaité s'affranchir des difficultés associées à ces questions éthiques et se sont intéressés à disséquer les mécanismes moléculaires impliqués dans la pluripotence avec comme but d'identifier la possibilité de reproduire cet état *in vitro*.

## 2) Les cellules souches pluripotentes induites

C'est en 2006 que le monde des cellules souches va connaître un nouveau bouleversement. En effet, une équipe japonaise de l'université de Kyoto parvient à convertir des fibroblastes murins adultes en cellules possédant les propriétés fondamentales des CSE et ainsi obtenir un nouveau type de cellules souches pluripotentes : les CSPi (Cellules Souches Pluripotentes induites). Pour cela, les auteurs ont réalisé une « reprogrammation » de cellules somatiques en introduisant un cocktail de quatre facteurs de transcription par le biais de rétrovirus (Figure 46, Takahashi and Yamanaka, 2006). L'année suivante, deux équipes parviennent à obtenir des CSPi en reprogrammant des fibroblastes humains par des approches différentes, les facteurs de transcriptions ne sont pas tous les mêmes et le moyen de transmission diffère également (vecteurs lentiviraux) (Takahashi et al., 2007 ; Yu et al., 2007).

De par l'innovation et l'espoir générés autour de leurs travaux sur la pluripotence et sur la reprogrammation, le Pr Yamanaka, conjointement avec le Pr Gurdon, s'est vu attribuer en 2012 le prix Nobel de physiologie ou médecine.



**Figure 46 : Stratégie d'obtention des CSPi**

(Yamanaka and Blau, 2010)

Une cellule somatique est reprogrammée via des facteurs exogènes spécifiques. Ce processus donne naissance à une CSPi humaine qui, dans des conditions de culture appropriées, est amenée à se différencier en n'importe quel type de cellules de l'organisme.

## II) Les cellules souches pluripotentes : caractéristiques

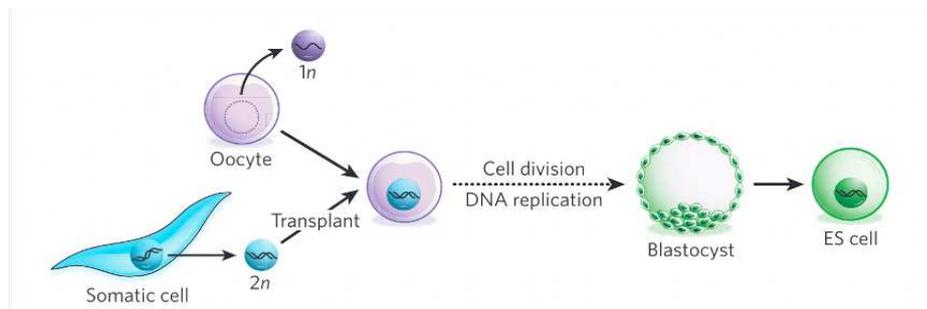
### A) Induction à la pluripotence

La découverte des CSPi a été guidée par une succession de travaux antérieurs qui avaient pour but d'identifier les mécanismes impliqués dans cet état de

pluripotence. Depuis plus d'un siècle maintenant, cet état de pluripotence ainsi que toutes les possibilités qu'il permet ont suscité un vif attrait pour les scientifiques. Les premières approches avaient pour objectif de convertir une cellule adulte en une cellule embryonnaire par le biais de modification de son transcriptome. Pour cela, différentes méthodes ont été développées (Jaenisch and Young, 2008, Jullien et al., 2013, Brouwer et al., 2016).

### 1) Le transfert nucléaire

Le transfert nucléaire, plus largement connu sous le terme de « clonage », est une technique basée sur le transfert d'un noyau extrait d'une cellule somatique dans une cellule énucléée (Figure 47). Les premières expériences menées par Briggs et King en 1952 ont été réalisées sur la grenouille. L'implantation de noyaux issus du stade blastula de têtards dans des oocytes (œufs non fécondés) a permis un développement larvaire, bien que la survie ne dépassât pas 130 heures (Briggs and King, 1952).



**Figure 47 : Principe du transfert nucléaire**

(Yamanaka and Blau, 2010)

Le transfert nucléaire implique le transfert du noyau d'une cellule somatique dans un oocyte énucléé. Les divisions cellulaires et la réplication de l'ADN qui suivent vont donner naissance à un blastocyste générant des CSE portant le matériel génétique de la cellule somatique donneuse. En laissant l'embryon se développer à son terme, il s'agit de clonage reproductif, totalement interdit chez l'Homme.

Gurdon a réussi le premier clonage sur le xénope 10 ans plus tard, par le transfert de noyau de cellules intestinales dans une cellule énucléée (Gurdon, 1962). Bien que le taux d'efficacité de ces expériences soit très faible, elles ont mis en évidence que, bien que la cellule soit différenciée, elle possède toujours au cœur de son noyau les informations indispensables à la formation d'un embryon. Cela suggère que ces informations ne sont pas modifiées au cours du développement et que les cellules

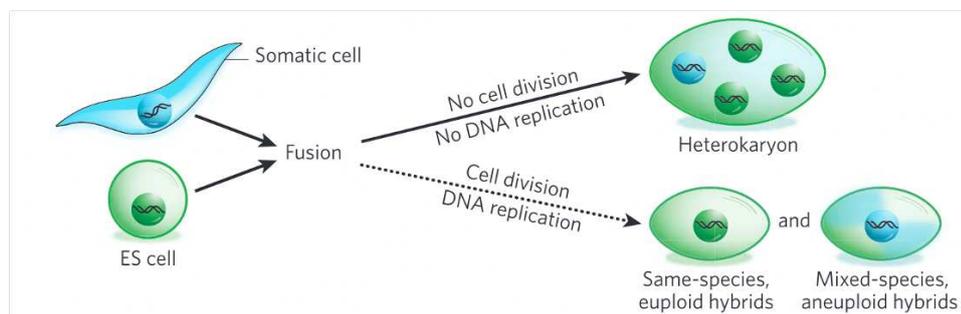
somatiques possèdent les capacités à revenir à l'état pluripotent. L'efficacité de la technique de transfert nucléaire a été démontrée par la suite sur de nombreux mammifères tels que le lapin (Bromhall, 1975), la souris (McGrath and Solter, 1983) et le mouton (Willadsen, 1986). Cependant, ce n'est qu'en 1997 que Wilmut réussit le transfert nucléaire chez le mammifère avec succès pour donner naissance à la célèbre brebis Dolly (Wilmut et al., 1997). Cet évènement a été suivi par une vague de réussite de clonage dans de nombreuses espèces de mammifères : la vache, la souris, la chèvre, le cochon ainsi que les primates non humains (Meng et al., 1997 ; Liu et al., 2018 ; Matoba and Zhang, 2018). Le début des années 2000 marque également le début des transferts nucléaires inter-espèces comme par exemple entre le coyote et le chien (Hwang et al., 2013 ; Matoba and Zhang, 2018). L'application de cette technique sur l'Homme a fait l'objet de publications du scientifique sud-coréen Hwang Woo-Suk dans le journal Science en 2004 et 2005. Cependant, après une enquête, il s'est avéré que sur les 11 lignées que Hwang affirmait avoir générées, aucune n'existait. Face à ces résultats contradictoires et controversés ainsi qu'aux questions éthiques qu'elle soulève, l'utilisation de cette technique est strictement interdite en France.

Bien que les avancées du transfert nucléaire aient été spectaculaires et rapides, l'efficacité de la reprogrammation reste très faible (avec des taux variant de 1 à 5%) et variable d'une espèce à l'autre (Fulka and Fulka, 2007 ; Gouveia et al., 2020). De plus, de nombreuses anomalies sont constatées chez les animaux clonés (Yang et al., 2007 ; Palmieri et al., 2008 ; Long et al., 2014). Face à toutes ces anomalies, les recherches se sont rapidement focalisées sur la part épigénétique de la cellule donneuse. Des méthodes basées sur des modulations de l'état transcriptionnel via l'utilisation de molécules chimiques ont ainsi émergé (Enright et al., 2003 ; Thuan et al., 2010).

## 2) La fusion cellulaire

La fusion cellulaire est une technique basée sur la fusion entre deux cellules. L'objectif de cette fusion est le mélange des cytoplasmes des deux cellules afin d'obtenir une seule cellule hybride également appelée hétérocaryon (Figure 48). Dans

le cadre de la pluripotence, la stratégie développée consiste à fusionner une cellule somatique et une cellule souche embryonnaire.



**Figure 48 : Principe de la fusion cellulaire**

(Yamanaka and Blau, 2010)

La fusion cellulaire de cellules somatiques avec des CSE a pour objectif de former une seule entité qui présente les caractéristiques des CSP. Les cellules fusionnées qui en résultent seront des hétérocaryons (multinucléés) ou des hybrides en fonction de leur prolifération.

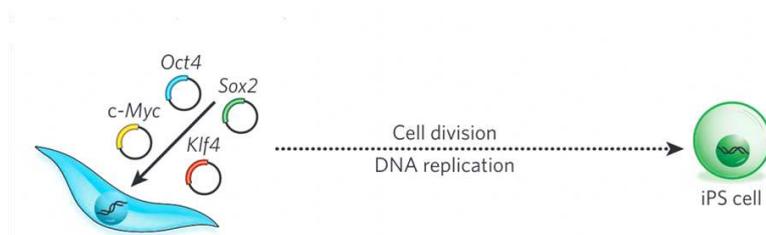
Réalisée en 1976, la première expérience de fusion cellulaire impliquait des cellules de thymus et des cellules pluripotentes de tératocarcinome (Miller and Ruddle, 1976). La technique s'est par la suite étendue à l'utilisation entre des thymocytes adultes et des CSE murines (Tada et al., 2001) et enfin des cellules somatiques adultes et des CSE humaines (Cowan et al., 2005). Le potentiel pluripotent de ces cellules hybrides générées a été démontré par la présence *in vivo* des trois couches germinales des embryons chimériques (Tada et al., 2001), ainsi que par l'expression de gènes tels que *OCT4* (Cowan et al., 2005).

Bien que cette technique ait mis en évidence la possibilité de convertir des cellules somatiques par la fusion avec des CSE, la fusion cellulaire ne peut être vouée à des applications thérapeutiques du fait que les cellules hybrides générées sont tétraploïdes.

### 3) La reprogrammation induite

Les résultats obtenus par l'approche de fusion cellulaire ont mis en évidence que les CSE avaient en leur possession des facteurs permettant leur maintien à l'état de pluripotence. Par la suite, les recherches se sont portées sur l'identification des mécanismes moléculaires impliqués. C'est sur ce postulat qu'en 2006 l'équipe du Pr Yamanaka parvient à identifier une technique afin d'obtenir une cellule pluripotente à

partir d'une cellule somatique. La capacité à induire la pluripotence a été étudiée à partir de vingt-quatre facteurs candidats, de manière individuelle et combinée. Les auteurs ont ainsi identifié que l'introduction de quatre facteurs de transcription : c-Myc (*Myc proto-oncogene protein*), KLF4 (*Kruppel-Like Factor 4*), OCT3/4 (*Octamer-binding Transcription factor 3/4*) et SOX2 (*SRY-box transcription factor 2*) par le biais de rétrovirus dans les fibroblastes embryonnaires et adultes de souris, permettait d'obtenir des CSPi (Figure 49).



**Figure 49 : Principe de la transduction de facteurs de transcription**  
(Yamanaka and Blau, 2010)

Ces cellules possèdent une morphologie similaire à celle des CSE (Takahashi and Yamanaka, 2006). L'injection de ces cellules dans des souris immunodéficientes conduit à la formation de tératomes. Les analyses de ces tumeurs ont montré la présence des trois lignées germinales (ectoderme, endoderme et mésoderme) (Takahashi and Yamanaka, 2006 ; Kooreman and Wu, 2015 ; Nelakanti et al., 2015). L'année suivante, cette approche a été réalisée sur des fibroblastes humains et a permis l'obtention de CSPi humaines (Takahashi et al., 2007). De manière intéressante, la même année, une équipe américaine parvient également à reprogrammer des fibroblastes humains en CSPi mais avec un cocktail de facteurs différents. Bien que cette nouvelle combinaison de facteurs contienne toujours les facteurs OCT3/4 et SOX2, deux nouveaux facteurs sont apparus : LIN28 (*Protein Lin-28 Homolog*) et NANOG (*Nanog Homeobox*) (Yu et al., 2007). De plus, l'outil de transfert des facteurs est différent, les auteurs ayant utilisé un lentivirus.

Suite à ces résultats, de nombreuses combinaisons de facteurs de transcription ainsi qu'un grand nombre de moyens de délivrance ont été testés (González et al., 2011 ; Al Abbar et al., 2020). Les recherches réalisées ces dernières années ont également permis la découverte de molécules permettant d'améliorer l'efficacité de la

reprogrammation. Ainsi, certaines molécules impactant le remodelage de la chromatine, la réponse hypoxique, le cycle cellulaire ou encore l'apoptose ont été identifiées (Brouwer et al., 2016).

## **B) Les cellules souches pluripotentes induites**

Depuis leur découverte, les chercheurs n'ont cessé d'essayer d'améliorer l'efficacité de la reprogrammation ainsi que la pureté des cellules obtenues. De nombreux paramètres ont été modulés tels que le choix de la cellule sélectionnée pour la reprogrammation, le cocktail de facteurs de transcription, la méthode de délivrance mais aussi les conditions de culture des cellules.

### 1) Le choix de la cellule pour la reprogrammation

Le choix initial des fibroblastes se justifie par de nombreux avantages de ce type cellulaire. Ces cellules sont faciles à obtenir par biopsie de la peau, leur amplification et leur maintien en culture sont simples. Enfin, ces cellules sont dotées d'une bonne prédisposition à la reprogrammation. Bien que possédant des avantages non négligeables, de nombreux autres types cellulaires murins et humains ont permis l'obtention de CPSi (Aoi et al., 2008 ; Aasen et al., 2008 ; Eminli et al., 2008 ; Loh et al., 2009). L'efficacité de la reprogrammation a été reliée à la nature de la cellule source utilisée. Par exemple, la reprogrammation est plus rapide et efficace sur les kératinocytes humains que les fibroblastes (Aasen et al., 2008). Le stade de différenciation de la cellule est également important, les progéniteurs hématopoïétiques sont plus simples à reprogrammer que des cellules ayant un stade de différenciation plus important tels que les lymphocytes T (Eminli et al., 2009). Il est également important de tenir compte de l'âge des cellules utilisées. Les cellules plus âgées possèdent une sénescence accrue. Il a été montré qu'une augmentation de l'expression de p53, p16<sup>INK4A</sup> (également connu comme CDKN2A, *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A*) et P21<sup>cip1</sup> induites par la sénescence était un obstacle à la reprogrammation. Cet obstacle est, de plus, renforcé par le fait que cette augmentation

est également induite par certains facteurs utilisés pour la reprogrammation (Banito et al., 2009 ; Kawamura et al., 2009 ; Li et al., 2009 ; Marión et al., 2009). Cependant, la sénescence cellulaire n'est pas une limite à la reprogrammation (Lapasset et al., 2011).

Enfin, il est important de tenir compte que les CSPi conservent une signature épigénétique de la cellule source à partir de laquelle elles sont obtenues. Ce statut épigénétique peut influencer la reprogrammation (Marchetto et al., 2009 ; Kim et al., 2011 ; Bar-Nur et al., 2011 ; Ohi et al., 2011).

## 2) Le choix des facteurs de transcription pour la reprogrammation

Le cocktail de quatre facteurs de transcription également appelés facteurs de Yamanaka ou OKSM (pour : Oct3/4, KLF4, Sox2, c-Myc) avaient préalablement été sélectionnés pour leur rôle associé à des mécanismes impliqués dans l'état de pluripotence chez la souris. Le gène *OCT3/4* code pour une protéine impliquée dans le passage du stade morula au stade blastocyste ainsi que dans l'auto-renouvellement (Nichols et al., 1998). Le gène *KLF4* quant à lui a été décrit comme jouant un rôle dans la régulation de la transcription des gènes impliqués dans l'auto-renouvellement (Li et al., 2005). Le gène *SOX2* est impliqué dans la pluripotence et l'auto-renouvellement des cellules embryonnaires (Avilion et al., 2003). Le dernier gène de ce cocktail, *c-Myc*, code pour un oncogène s'exprimant dans les cellules possédant une activité proliférative importante et possède également un rôle dans l'auto-renouvellement (Akari et al., 2009).

En parallèle des travaux menés par l'équipe du Pr Yamanaka, l'équipe américaine dirigée par le Pr Thomson a identifié le potentiel des facteurs de transcription NANOG et LIN28. Des travaux préliminaires avaient montré que NANOG est impliqué dans le maintien de la pluripotence ainsi que dans l'auto-renouvellement des cellules embryonnaires murines (Chambers et al., 2003 ; Mitsui et al., 2003). Le rôle de LIN28 a été mis en évidence dans une étude du profil transcriptomique de CSE humaines. En effet, une diminution de l'ARNm LIN28 au cours de la différenciation des cellules a été observée, suggérant son rôle dans le maintien de la pluripotence (Richards et al., 2004).

Depuis, d'autres facteurs de transcription intéressants ont été identifiés comme UTF1 (*Undifferentiated Embryonic Cell Transcription Factor 1*) (Zhao et al., 2008), ou encore SALL4 (*Splat Like Transcription Factor 4*) (Tsubooka et al., 2009). Dans le cadre de l'application clinique des CSPi, une efficacité de reprogrammation optimale est indispensable. Il a été montré que la combinaison OKSM ne correspondait pas à ce critère. Plus récemment, des études ont montré que l'efficacité de la reprogrammation pouvait être drastiquement augmentée (d'environ 200 fois) par l'utilisation de molécules (Lin et al., 2009 ; Federation et al., 2014).

### 3) Méthodes de reprogrammation et vecteurs

Dans le but de générer des CSPi, il est nécessaire de transmettre à la cellule à reprogrammer les bons messages. La méthode sélectionnée pour délivrer les facteurs de transcription est un paramètre à ne pas négliger. Différentes stratégies de délivrance existent à ce jour : les systèmes intégratifs et non intégratifs (Figure 50) (Oh et al., 2012). Les premières études ont privilégié l'utilisation de vecteurs intégratifs en partie par leur bonne efficacité de délivrance et de la bonne stabilité au cours du temps. Cependant, le nombre de copies n'est pas modulable et leurs insertions non maîtrisées peuvent activer des facteurs jusqu'alors silencieux.

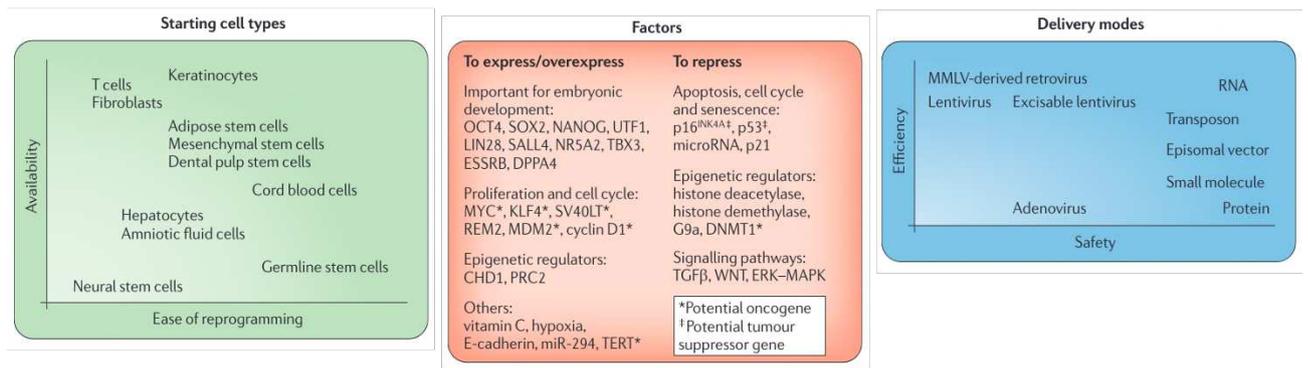
Delivery systems	Reprogramming factors	Somatic cells	iPSCs	Methods	Advantage	Disadvantage	Species	Efficiency (%)	Safety
Retrovirus				Integration	Retroviral vectors	Multiple integration, incomplete silencing, tumorigenicity possible	P, R, Rh, M, H	0.01-0.5	No good
					Lentiviral vectors	Tight transcriptional regulation, dividing or nondividing cell infection, moderate efficiency	M, H	0.1-1	No good
					Induced lentiviral vectors	Integrated vector-fragment possible, low efficiency	P, M, H	0.1-1	No good
Adenovirus				Integration	Adenoviral vectors	Nonintegration	M, H	~0.001	Good
					Sendaiviral vectors	Transgene decreased during cell division, nonintegration, easy to remove Sendaivirus	H	0.001-1	Good
Sendaivirus				Integration free	Plasmids	Simple transfection	M, H	~0.001	Good
					Plasmids + Nanoparticles	Rapid and simple transfection	M	0.001-0.003	Good
Plasmid DNA (episomal)				Integration free	oriP/EBNA-1 episomal vectors	Nonintegrating vector, long-term persistent transcription	H	~0.0003	Good
					Cre/loxP recombination systems	Precise excision possible, dividing or nondividing cell infection	M, H	~0.1	Good
RNAs				Integration free	Piggyback transposon/transposase system	Improved efficiency, nonintegration	H	~0.005	Good
					Mimicircle DNA	Extremely low efficiency, long-term treatment required, abnormal signaling pathway possible, virus used	M, H	~0.001	Very good
Proteins				Integration free	Proteins	DNA-free	M, H	~1	Very good
					Factors + Small molecules	High efficiency	M, H	~2.05	No good

Figure 50 : Stratégies afin de générer des CSPi (Oh et al., 2012)

De nombreuses approches ont été développées afin d'améliorer la génération de CSPi. Des paramètres variés peuvent ainsi être modulés. P : Pig ; R : Rat ; Rh : Rhesus monkey ; M : mouse ; H : human

Les différentes approches intégratives exploitent notamment : les rétrovirus (Takahashi et al., 2007 ; Aasen et al., 2008) ; les lentivirus (Yu et al., 2007 ; Hockemeyer et al., 2008 ; Maherali et al., 2008) ; les transposons (Woltjen et al., 2009 ; Grabundzija et al., 2012) ; les bactériophages (Ye et al., 2010) ; les nucléases à doigt de zinc (Ramalingam et al., 2013). Cependant, face aux nombreuses limitations liées à l'intégration (risques d'intégration multiple, tumorigenèse possible, efficacité cellule spécifique, extinction de gènes importants pour une voie de différenciation...), des techniques non intégratives ont très vite été développées. Ces techniques permettent ainsi de ne pas intégrer les transgènes dans le génome des cellules receveuses. Des approches basées sur l'utilisation de vecteurs épisomaux (Yu et al., 2009), d'ARNm (Warren et al., 2010), de vecteurs ADN mini-circulaires (Narsinh et al., 2011), de protéines recombinantes (Kim et al., 2009), ou encore de vecteurs viraux mais non intégratifs tels que des adénovirus (Zhou and Freed, 2009) ou le virus de Sendai (SeV) (Fusaki et al., 2009 ; Ban et al., 2011) ont été développées. Ce dernier possède une efficacité de reprogrammation relativement élevée, dans de multiples types de cellules somatiques, ce qui en fait un choix pertinent pour la reprogrammation. A titre indicatif, l'utilisation du SeV permet d'atteindre une efficacité de reprogrammation d'environ 1%, augmentant ainsi de plus de 100 fois l'efficacité de reprogrammation initiale avec les vecteurs intégratifs (Oh et al., 2012).

De nombreuses stratégies de délivrance ont été développées depuis une quinzaine d'année. Cependant, chacune de ces techniques possède des avantages ainsi que des inconvénients. Que ce soit en termes d'intégration ou non, du taux d'efficacité, du type de cellule à reprogrammer, il est nécessaire de ne pas négliger l'ensemble de ces éléments lorsqu'une reprogrammation est initiée (Figure 51).

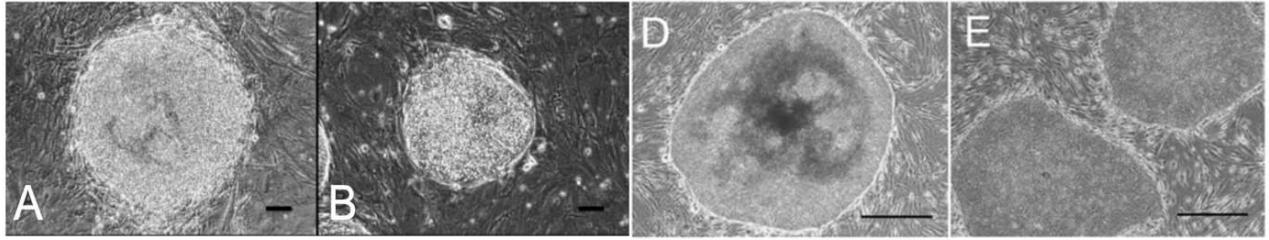


**Figure 51 : Différents paramètres de reprogrammation des CSPi**  
(Gonzalez et al., 2011)

La nature des cellules à reprogrammer, des facteurs et du système de délivrance ont des impacts sur l'efficacité de la reprogrammation.

#### 4) Caractéristiques moléculaires et contrôle qualité des CSPi

Les recherches menées à partir des CSPi nécessitent, tout comme la culture cellulaire de manière générale, une attention particulière sur la caractérisation des cellules obtenues. En effet, de par les techniques d'obtention de ces cellules et de leur potentiel de pluripotence, il n'est pas rare d'obtenir des lignées porteuses d'anomalies génétiques. Ainsi, les procédures de contrôle qualité de ces cellules sont devenues indispensables et surtout standardisées. Il est nécessaire de s'assurer que les cellules ne « dérivent » pas au fil du temps de culture et conservent ainsi leur potentiel de pluripotence et leur intégrité génomique. Dans un premier temps, une simple observation par microscopie en contraste de phase peut être réalisée. En effet, les CSP possèdent une morphologie caractéristique en formant des colonies plates à bord lisses et possédant de gros noyaux avec peu de cytoplasme (Figure 52) (Robinton and Daley, 2012). L'émergence de nouvelles technologies telles que l'utilisation d'algorithmes et des mathématiques avancées ou encore l'intelligence artificielle (IA) ont mis en évidence qu'il était possible de prédire la qualité des cellules à partir de l'analyse de leur morphologie, permettant ainsi une sélection des meilleures colonies (Wakui et al., 2017 ; Fan et al., 2017).



### Figure 52 : Aspects morphologiques des CSP

(Thomson et al., 1998 ; Takahashi et al., 2007)

Les CSP se présentent sous la forme de colonies circulaires, cultivées sur une couche de cellules nourricières constituée de fibroblastes embryonnaires de souris. Cellules souches embryonnaires humaines (A et B) Barre d'échelle à 100 μm. Cellules souches pluripotentes induites humaines (D et E) Barre d'échelle à 200 μm.

A l'échelle cellulaire et moléculaire, il est possible d'analyser de nombreux marqueurs. Parmi eux, certains sont extracellulaires, associés au stade embryonnaire tels que SSEA3 et SSEA4 (*Stage Specific Embryonic Antigen 3 / 4*) ainsi que TRA1-60 et TRA1-81 (*tumor-related antigen -60/-81*) (Henderson et al., 2002) tandis que d'autres sont intracellulaires tels que OCT4, SOX2 et NANOG (Sullivan et al., 2018).

De par leur technique d'obtention, leur auto-renouvellement important, ou encore leur condition de maintien *in vitro*, des anomalies (perte de chromosome, tumorigenèse augmentée, mutation d'un gène, erreur de réplication de l'ADN) peuvent apparaître au cours de l'obtention des CSP humaines (Maitra et al., 2005 ; Ben-David and Benvenisty, 2011 ; Halliwell et al., 2020). Certaines de ces anomalies semblent plus récurrentes que d'autres comme, par exemple, l'amplification 20q11.21 (Lefort et al., 2008). La raison biologique de telles anomalies récurrentes est encore discutée, mais il semblerait qu'elles puissent entraîner un fort avantage de croissance sélective pour les cellules cultivées (Zhang et al., 2019). Il est donc indispensable de s'assurer de l'intégrité génomique des cellules. Pour cela, l'analyse du caryotype est la plus couramment utilisée, notamment pour la détection d'anomalies telles que des polyploïdies. Il est cependant nécessaire de combiner plusieurs analyses à des degrés de finesse de détection différents (Assou et al., 2018). L'analyse du caryotype est souvent couplée à des analyses telles que le mFISH (*multicolor Fluorescent in situ Hybridation*), des analyses de *Single Nucleotide Polymorphisms* ou encore des séquençages permettant ainsi l'analyse d'anomalies plus fines comme par exemple des mutations ponctuelles

(Steichen et al., 2019). Des techniques plus récentes comme la PCR (*polymerase chain reaction*) droplet digital peuvent détecter jusqu'à 90% des anomalies courantes des CSPh à partir de l'analyse du surnageant (Assou et al., 2020).

Les CSP possèdent la capacité de donner les trois feuillets embryonnaires (l'ectoderme, l'endoderme et le mésoderme). Cette capacité était initialement analysée *in vivo* par injection dans des souris immunodéficientes. La formation d'un tératome va alors être observée et des analyses histologiques sont réalisées afin d'observer la présence des trois feuillets humains (Przyborski et al., 2005 ; Smith et al., 2009). Cette capacité est maintenant évaluée *in vitro*, en analysant les structures tridimensionnelles formées spontanément par les CSPh en condition non adhérentes. Ces structures nommées corps embryoïdes (EB, *Embryonic Bodies*) sont composées de précurseurs des trois feuillets embryonnaires (Itskovitz-Eldor et al., 2000 ; Pekkanen-Mattila et al., 2004).

### **C) Potentiel de différenciation**

L'engouement autour des CSP ne s'explique pas seulement par leur capacité d'auto-renouvellement. Ces cellules, de par leur nature, sont dotées de la capacité à se différencier dans les trois feuillets embryonnaires. Il est donc possible en théorie d'obtenir tous les types cellulaires d'un organisme, à l'exception des annexes embryonnaires. Ainsi, depuis la découverte des CSE, les connaissances des mécanismes impliqués dans le maintien de la pluripotence ainsi que l'identification des voies de signalisation impliquées au cours du développement ont permis l'élaboration de nombreux protocoles de différenciations dans des types cellulaires très variés (Figure 53) (Williams et al., 2012).

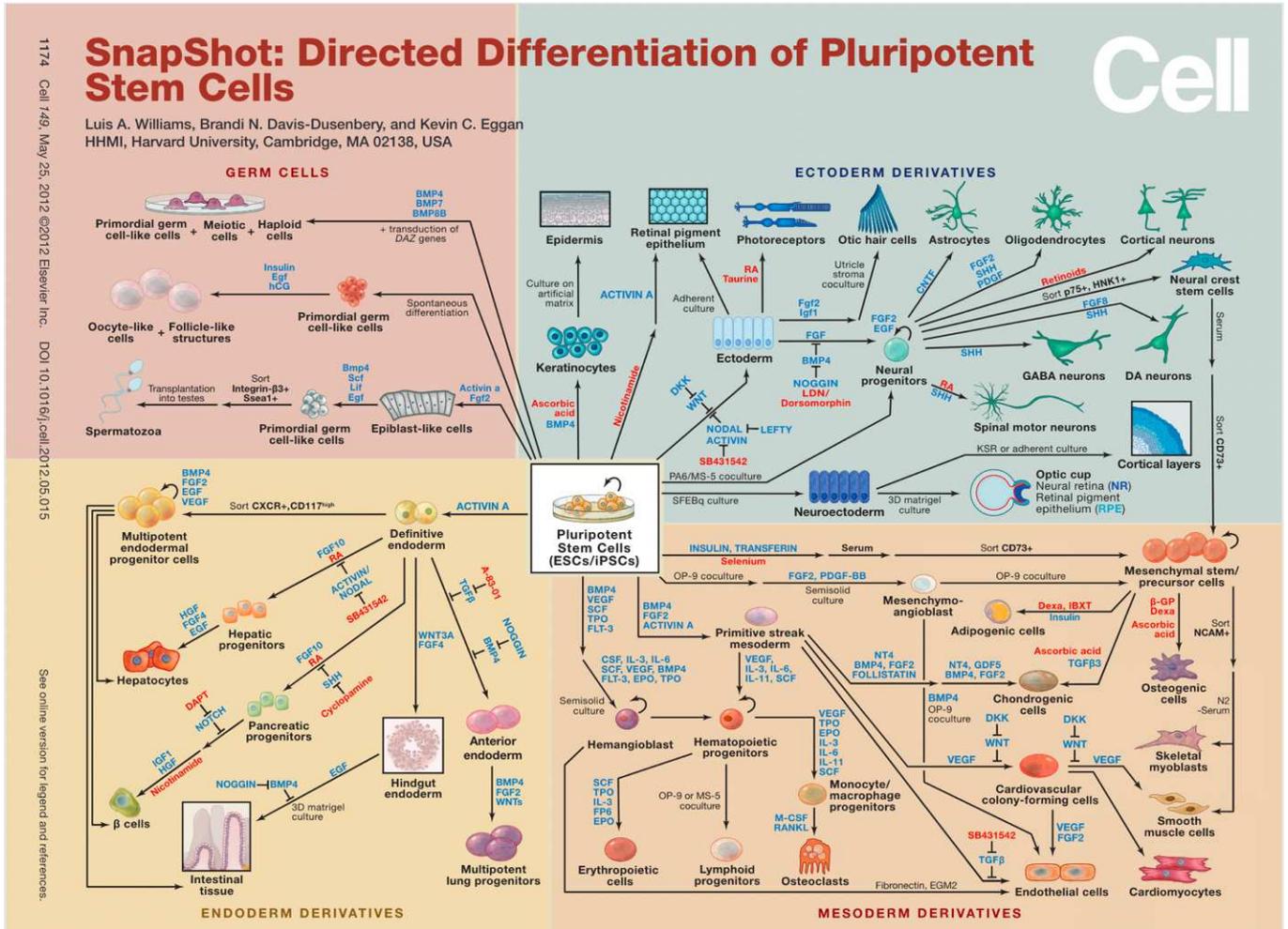


Figure 53 : Différenciation des cellules souches pluripotentes

(Williams et al., 2012)

Les CSP peuvent être différenciées dans différents types cellulaires issus des trois feuillets embryonnaires (ectoderme, endoderme et mésoderme). Les dérivés neuraux sont issus du feuillet ectodermique.

Le développement de ces protocoles de différenciation s'appuie sur les nombreuses connaissances acquises en embryologie et biologie du développement. Celles-ci ont permis d'identifier les signaux spatio-temporels (facteurs de transcriptions, morphogènes...) ainsi que les nombreuses et diverses étapes du développement d'un organisme. Il est ainsi possible grâce à l'utilisation de petites molécules activatrices ou inhibitrices de voies de signalisation spécifiques d'induire au choix la différenciation des CSP vers les trois feuillets embryonnaires. Par exemple, l'utilisation de molécules telles que l'activine A, activateur de la voie TGF-β (D'Amour et al., 2005) ou encore la combinaison d'activine, FGF2, BMP4 et LY294004 (Touboul et al., 2010) permet d'induire la différenciation des CSP vers la voie endodermique. La voie mésodermique peut quant à elle être induite par des molécules telles que l'activine A

et WNT3A (Oldershaw et al., 2010). Concernant la voie ectodermique, à l'origine entre autres du système nerveux, je développerai dans le paragraphe suivant plus précisément les étapes de son induction.

Il est également possible d'induire une différenciation directement en réalisant une surexpression de facteurs de transcription afin d'activer des mécanismes spécifiques à un type cellulaire. Pour cela, l'apport d'un ou plusieurs facteurs de transcription est nécessaire. De nombreux protocoles sont publiés à ce jour avec des stratégies de délivrance, des facteurs de transcription, des temps d'obtention et des efficacités de différenciation très variables. Cette stratégie de différenciation s'est révélée efficace dans un large panel de cellules telles que des cellules  $\beta$ -pancréatiques, des cellules musculaires cardiaques et squelettiques ainsi que des hépatocytes (Oh and Jang, 2019). Il en est de même pour la différenciation en cellules neuronales (Flitsch et al., 2020). Ces protocoles possèdent l'avantage d'être rapides et efficaces dans l'obtention des cellules d'intérêt. Cependant, ils soulèvent la question de la temporalité car le temps de différenciation n'est pas « comparable » au processus physiologique, cela met donc en lumière un potentiel impact sur les cellules obtenues. De plus, les cellules obtenues subissent des transferts d'informations génétiques supplémentaires contrairement à la stratégie basée sur l'utilisation de petites molécules.

Ainsi, de nombreux protocoles de différenciation des CSP, notamment en vue d'obtenir diverses populations neuronales ont été développés en « mimant » le développement physiologique d'un organisme.

### **III) Cellules souches pluripotentes et dérivés neuraux**

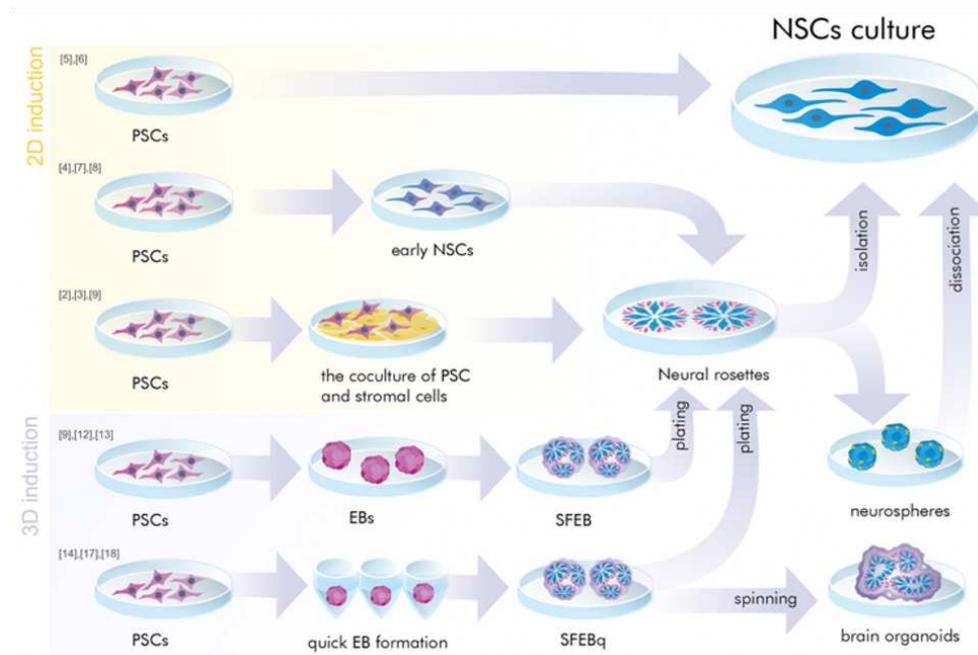
#### **A) Différenciation en progéniteurs neuraux**

De par la fascination de l'Homme autour du cerveau et de sa compréhension, mais aussi par le nombre de pathologies associées à cet organe, les chercheurs se sont très vite attelés au développement de protocoles de différenciation en cellules cérébrales. Ainsi, de nombreux protocoles de différenciation des CSP en cellules neuronales ont été développés et il est actuellement possible de générer de nombreux

types cellulaires cérébraux. Les protocoles élaborés diffèrent sur de nombreux critères : la durée de différenciation, les caractéristiques des cellules obtenues, la pureté de la population obtenue, etc. Un grand nombre de protocoles publiés ont ainsi décrit la possibilité d'obtenir des sous types neuronaux particuliers tels que des neurones corticaux (Shi et al., 2012 ; Boissart et al., 2013 ; Busskamp et al., 2014), des neurones glutamatergiques du prosencéphale (Zeng et al., 2010), mais aussi des astrocytes (Krencik and Zhang, 2011 ; Caiazzo et al., 2015), des oligodendrocytes (Wang et al., 2013 ; Douvaras et al., 2014, García-León et al., 2020) et des cellules microgliales (Etemad et al., 2012 ; Chen et al., 2021).

Certains de ces protocoles de différenciation possèdent un stade intermédiaire de cellules souches neurales (NSC, Neural Stem Cell), population multipotente auto-renouvelable capable de générer à la fois des neurones, des astrocytes et des oligodendrocytes. Elles sont présentes dans le SNC de l'Homme en développement et de l'adulte (Temple, 2001; Chojnacki et al., 2009). *In vivo*, ces cellules sont présentes dans des niches qui favorisent l'auto-renouvellement et régulent l'équilibre entre l'auto-renouvellement symétrique et la division asymétrique (Conti and Cattaneo, 2010). L'obtention de ce stade intermédiaire, très prolifératif et qu'il est possible de congeler, est un réel atout.

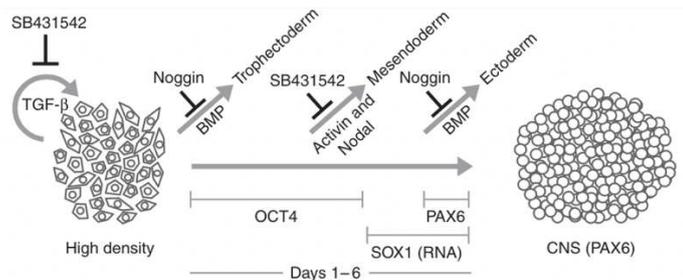
L'induction neurale vers le stade de NSC est possible par différentes techniques allant de culture en deux dimensions (2D) à des systèmes en trois dimensions (3D) (Figure 54) (Galiakberova and Dashinimaev, 2020). Globalement, la plupart de ces protocoles nécessitent de passer par un stade de rosettes neurales. Ce stade intermédiaire est caractérisé par l'expression de marqueurs neuraux très précoces tels que SOX2 (*sex determining region Y-box 2*), PAX6 (*Paired box protein 6*) et SOX1 (*SRY-Box Transcription Factor 1*) et possède la capacité de générer de nombreux types cellulaires neuraux (Federova et al., 2019).



**Figure 54 : Principe de l'induction neurale**  
(Galiakberova and Dashinimaev, 2020)

L'induction neurale peut être réalisée par différentes approches : dans des conditions 2D (monocouche ou co-culture) ou des conditions 3D (corps embryonnaires). Par la suite, l'obtention des NSC peut se faire en monoculture ou co-culture 2D, ou en culture 3D (neurosphères, organoïdes). PSCs: Pluripotent Stem Cells; NSCs: Neural Stem Cells; SFEB (q): (quick) Serum Free Culture of Embryoid Bodies.

Développés initialement sur les CSE murines (Kawasaki et al., 2000 ; Tropepe et al., 2001), les premiers protocoles utilisant des cellules humaines se sont largement inspirés des résultats obtenus sur les cellules murines. Cela a permis le développement de protocoles de différenciation via l'inhibition de deux voies de signalisation : la voie BMP (*Bone Morphogenic Proteins*) et la voie TGF $\beta$  / Activine / Nodal. (Chambers et al., 2009). Également appelée « *Dual-SMAD inhibition* », cette approche est basée sur l'utilisation du Noggin dans le but d'inhiber la voie BMP, bloquant ainsi la différenciation vers le trophoctoderme et l'endoderme ainsi que l'utilisation du SB431542 dans le but d'inhiber la voie Actin/Nodal permettant de bloquer la différenciation vers le feuillet mésodermique (Figure 55). La différenciation cellulaire est ainsi guidée vers le neuroectoderme (Smith et al., 2008). Cette approche permet d'obtenir une population de progéniteurs neuraux exprimant PAX6 à près de 80% après seulement quelques jours d'exposition (Chambers et al., 2009).



**Figure 55 : Dual SMAD inhibition**  
(Chambers et al., 2009)

La double inhibition des SMAD avec le SB431542 et le Noggin module les interactions des voies TGF- $\beta$  et BMP dans le but de stimuler la différenciation des CSP en NSC.

L'importance du Noggin dans le système nerveux avait préalablement été montrée (Smith and Hardan, 1992 ; Valenzuela et al., 1995), de même que la nécessité de son utilisation pour la différenciation neurale (Lee et al., 2007 ; Elkabetz et al., 2008). D'autre part, l'action du SB431542 dans le maintien de la pluripotence avait été décrite quelques années plus tôt (Vallier et al., 2005). Enfin, l'ajout de l'acide rétinoïque au protocole de *dual-SMAD inhibition* permet une amélioration considérable de l'efficacité d'obtention de NSC à partir de CSP humaines (Shi et al., 2012).

Enfin, une autre approche de différenciation est basée sur un stade intermédiaire d'EB. Ces agrégats en 3D obtenus à partir des CSP possèdent le potentiel de se différencier dans les 3 feuillets embryonnaires. Après une phase de culture en condition non adhérente, les EB sont cultivés en condition adhérente dans un milieu comportant des facteurs pro-neuroectodermiques tels que le FGF. Ces conditions avantageuses favorisent l'apparition de rosettes neurales exprimant les facteurs tels que PAX6 et SOX1 (marqueurs du neuroectoderme), des marqueurs du neuroépithélium tels que les N-Cadhérines ainsi que des marqueurs des précurseurs neuronaux tels que Nestin (Elkabetz et al., 2008). Suite à l'obtention de ces rosettes, différents morphogènes sont appliqués afin de différencier les rosettes neurales en NSC, stade davantage avancé dans la différenciation pour ensuite générer les différents types de cellules gliales et les neurones (Perrier et al., 2004 ; Elkabetz et al., 2008 ; Koch et al., 2009). Le potentiel d'obtention de précurseurs neuronaux *in vitro* par cette approche, à partir de CSE humaines, a été montré dès 2001. En effet, une équipe américaine a mis en évidence qu'il était possible d'obtenir des neurones, des astrocytes et des oligodendrocytes à

partir d'une étape d'EB induite en présence de FGF2 (Zhang et al., 2001).

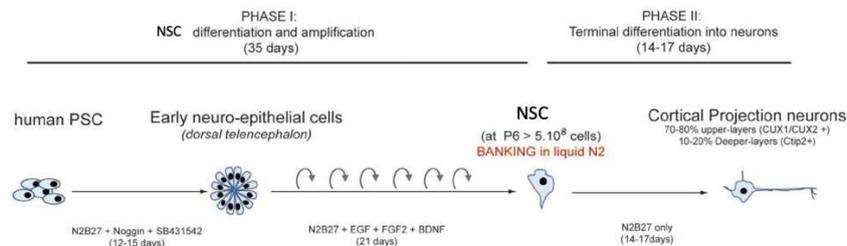
## B) Différenciation en neurones corticaux

Depuis une dizaine d'années, un certain nombre de protocoles de différenciation en neurones corticaux à partir de CSPi ont émergé. Ces protocoles diffèrent sur un bon nombre d'éléments : les approches pour obtenir des progéniteurs neuronaux (2D ou 3D), les facteurs utilisés afin d'effectuer l'induction neurale, le temps de différenciation ainsi que les efficacités de différenciation varient (Tableau 1). A titre d'exemple, le protocole publié par Boissart et al. en 2013 permet, après l'obtention d'une population homogène de NSC par un système en 2D, la différenciation de ces cellules en neurones corticaux en une quinzaine de jours après retrait du FGF2 et de l'EGF du milieu (Figure 56). La majorité d'entre eux sont des neurones glutamatergiques (caractérisés par l'expression des protéines vésiculaires vGlut-1 et v-Glut-2) des couches superficielles du cortex (couches II-IV). Un petit pourcentage de neurones GABAergiques est généralement également produit. Les neurones ainsi générés développent un réseau neuritique complexe. Leur caractérisation est possible par le biais de marqueurs neuronaux tels que la  $\beta$ -III tubuline (également connu sous Tuj-1 pour *Neuron-specific class III beta-tubulin*), le facteur d'épissage HuC/D ou encore MAP-2 (*Microtubule-Associated Protein 2*). Le phénotype cortical peut également être identifié grâce à l'analyse de marqueurs tels que CUX2 (Cut Like Homeobox 2), BRN2 (POU3F2), TBR1 (T-box Brain 1), NeuN (Fox-3, Rbfox3, Hexaribonucleotide Binding Protein-3) mais aussi CTIP2 (*chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor-interacting protein 2*, connu également sous BCL11b [*B-cell lymphoma/leukemia 11b*]). Ces différentes couches corticales expriment des marqueurs différents. Ainsi, il est possible de distinguer les populations corticales en fonction de ceux-ci.

Référence	Approche	Facteurs utilisés	Efficacité
Mariani et al, 2012	SFEBq	FGF2, DKK1, NEAA, SB431542, BMPR1A, Glutamine	80% GLUT / 10% GABA
Shi et al, 2012	Rosettes	FGF2, Noggin, SB431542, Dorsomorphine, Glutamine	GLUT
Boissart et al, 2013	Rosettes	FGF2, EGF, BDNF, GDNF	70% GLUT / 10% GABA
Espuny-Camacho et al, 2013, 2017	EB	Noggin et Glutamine	60% GLUT / 10% GABA
Mehta et al, 2018	Rosettes	FGF2, SB431542, LDN193189, Insuline, Glutamine	30% neurones corticaux
Hyvärinen et al, 2019	EB	FGF2, RA, SB431542, LDN193189, BDNF, GDNF, AMPc, AA, Insuline	70% GLUT / 10% GABA
Gribaudo et al, 2019	Rosettes	FGF2, SB431542, LDN193189, BDNF, XAV939, BDNF, AMPc, EGF, VPA, DAPT	70% GLUT / 20% GABA
Hedegaard et al, 2020	Rosettes	FGF2, SB431542, Insuline, Glutamine, Dorsomorphine	70% Astrocytes/ 10% neurones corticaux

**Tableau 1 : Exemples de protocoles d'induction de neurones corticaux à partir de CSPi**

AA : Acide Ascorbique ; AMPc : Adénosine Monophosphate cyclique ; BDNF : Brain Derived Neurotrophic Factor ; BMPR1A : Bone Morphogenic Protein Receptor 1A ; DKK1 : Dickkopf-related protein 1 ; EB : Embryoid Body ; EGF : Epidermal Growth Factor ; FGF2 : Fibroblast Growth Factor 2 ; GABA : neurones GABAergiques ; GDNF : Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor ; GLUT : neurones glutamatergiques ; NEAA : Non-Essential Amino Acid ; RA : Retinoic Acid ; SFEBq : quick Serum Free Culture of Embryoid Bodies ; VPA : acide valproïque



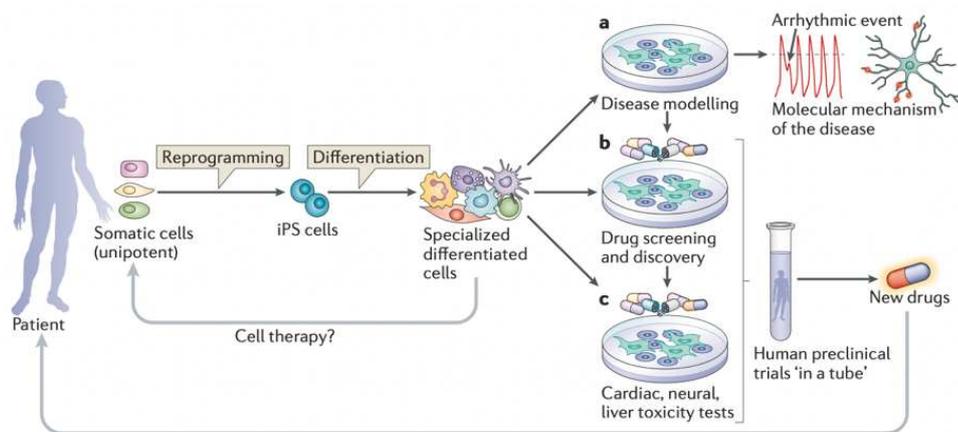
**Figure 56 : Protocole de différenciation en neurones corticaux**  
(Modifié d'après Boissart et al., 2013)

Le protocole utilisé ici permet d'avoir accès à un stade de progéniteurs (NSC : *Neural Stem Cells*) à partir de CSP, qui peuvent être amplifiés et congelés, avant de se différencier en neurones corticaux matures après retrait des cytokines.

#### IV) Médecine et recherche, quelle place pour les CSP ?

Les cellules souches pluripotentes possèdent ainsi deux propriétés particulièrement intéressantes pour la recherche. Leur propriété d'auto-renouvellement permet ainsi d'avoir un nombre important de cellules et leur propriété de différenciation en fait un outil précieux pour la bio-ingénierie tissulaire, la modélisation pathologique et la

recherche de molécules thérapeutiques (Figure 57). Leurs différentes exploitations sont abordées dans ce paragraphe.



**Figure 57 : Différentes applications des CSpH**  
(Bellin et al., 2012)

A ce jour, les applications des CSpH ne se limite plus à la modélisation pathologique. De nombreux types cellulaires peuvent être générés et ces cellules sont des outils précieux dans le cadre de la recherche médicale et le criblage de molécules.

### A) Modélisation pathologique et maladies neurologiques

Initialement réalisée par le biais de modèles animaux, l'élaboration de modèles pathologiques a permis d'identifier des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués à différents stades de nombreuses pathologies. Cependant, ces modèles ont des inconvénients : leur coût d'obtention, la nécessité d'avoir une animalerie, le coût des expériences, la nécessité d'autorisations et les questions éthiques soulevées sont autant d'éléments rendant l'utilisation de ces modèles lourde et compliquée. De plus, les chercheurs se heurtent parfois à un autre problème : les différences inter-espèces. Par exemple, dans le cadre de la modélisation de l'amyotrophie spinale infantile (SMA), maladie neuromusculaire génétique liée au gène *SMN1*, les souris ne possèdent qu'un seul gène SMN, contrairement à l'Homme. La suppression de ce gène est létale au stade embryonnaire chez la souris, complexifiant grandement la modélisation de la pathologie.

Concernant l'élaboration de lignées CSEh à partir de la MCI au stade blastocyste, celle-ci induit nécessairement la destruction de l'embryon donneur. Obtenus dans le cadre d'un projet parental de fécondation *in vitro*, il est possible, avec l'autorisation

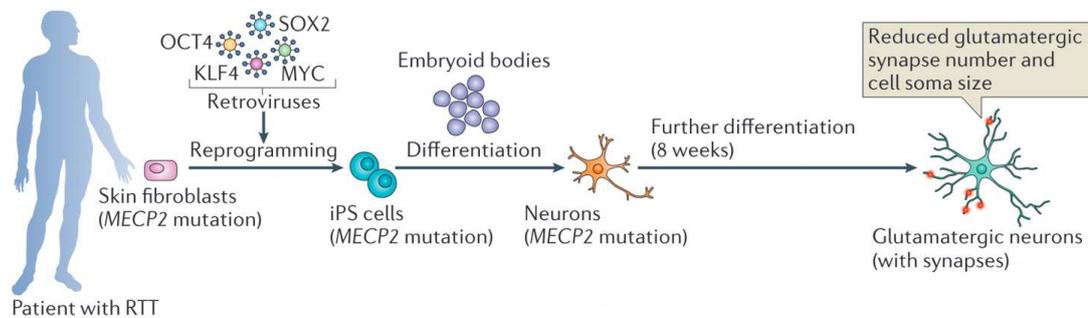
éclairée des parents, de prélever ces cellules sur des embryons surnuméraires. Il est ainsi possible d'obtenir des lignées porteuses de mutations causales de maladies génétiques. Ces lignées sont générées à partir d'embryons écartés d'un projet parental à la suite d'un diagnostic pré-implantatoire (DPI) (Article L2131-4 du code civil). A titre d'exemple, parmi les nombreux modèles pathologiques obtenus à partir de CSEh, on dénombre 12 lignées porteuses de mutations liées à la maladie de Huntington, 12 à la mucoviscidose, 11 à la maladie de Charcot-Marie-Tooth (Ilic and Ogilvie, 2017). Le nombre de lignées de CSE pathologiques est faible et ne permet de modéliser qu'une faible proportion des maladies génétiques, en raison des limites de leur obtention.

Face à ce constat, les CSPi humaines dérivées à partir de cellules de patients semblent une ressource très pertinente pour la modélisation pathologique. Leurs deux propriétés cardinales s'ajoutent à l'argument puissant de la possession du génome causal de la maladie. Ainsi, à partir de cellules porteuses de mutations obtenues directement à partir de patients, il est possible de les reprogrammer en CSPi et de les différencier dans le type cellulaire d'intérêt.

De plus, l'élaboration de nombreux protocoles de différenciation reproduisant au plus près le développement physiologique permet ainsi d'avoir accès à des stades cellulaires très précoces et de potentiellement identifier des biomarqueurs de la maladie très prématurément mais également de modéliser des phénotypes qui ne se manifesteront que tardivement chez le patient (Mertens et al., 2018). Ainsi, depuis leur découverte, de nombreuses équipes ont développé des modèles pathologiques à partir de CSPi dérivées de patients (Sterneckert et al., 2014). L'exploitation des CSPi rend la modélisation possible pour des maladies variées comme des maladies hépatiques, hématopoïétiques, cardiovasculaires, épidermiques, neurologiques et bien d'autres (Tiscotnia et al., 2011 ; Ebert et al., 2012).

Les maladies neurologiques n'ont pas échappé à ces avancées et de nombreux modèles existent pour des maladies génétiques neurodégénératives mais aussi neurodéveloppementales. On peut citer par exemple les modèles de la maladie de l'X fragile (Urbach et al., 2010 ; Sheridan et al., 2011), le syndrome de Down (Weick et al.,

2013), la maladie de Parkinson (Soldner et al., 2009 ; Byers et al., 2012), la maladie d'Alzheimer (Kondo et al., 2013), la sclérose latérale amyotrophique (ALS) (Dimos et al., 2008), des maladies telles que la schizophrénie (Brennand et al., 2011) et bien d'autres (Robinton et al., 2011 ; Sternecker et al., 2014). Le développement de ces modèles s'est révélé particulièrement pertinent pour les maladies neurodéveloppementales. Il a par exemple permis d'identifier de nombreux défauts (moins de synapses, une densité d'épines réduite, une taille de soma plus faible, une signalisation calcique altérée ainsi que des défauts électrophysiologiques) dans des neurones dérivés de CSPi porteuses de mutation responsable du syndrome de Rett (Figure 58) (Marchetto et al., 2013).



**Figure 58 : Modélisation du syndrome de Rett à partir de fibroblastes de patients**  
(Bellin et al., 2012)

Suite à l'obtention de cellules somatiques de patients, les cellules ont été reprogrammées puis différenciées en type cellulaire d'intérêt à savoir en neurones et des analyses morphologiques et fonctionnelles ont été réalisées.

La modélisation pathologique à partir de CSP humaines fait cependant face à différents obstacles avec notamment le maintien d'une partie de l'identité embryonnaire ou fœtale des cellules obtenues (Baxter et al., 2015) ainsi qu'une grande variation d'expression génique au sein des CSPi humaines (DeBovoer et al., 2017). Face à ces limites augmentant les risques de ne pas modéliser les symptômes tardifs d'une maladie, différentes stratégies ont été élaborées. Certaines équipes se sont dirigées vers des temps de différenciation très longs allant parfois à plus d'une année. Au-delà des difficultés techniques (fragilité des cellules, risques de contamination...), des analyses réalisées sur des neurones de plus de 2 mois ont montré que les cellules présentent toujours des marqueurs développementaux (Dolmetsch and Geschwind,

2011 ; Mariani et al., 2012). Des résultats similaires ont été observés dans des modèles plus complexes d'organoïdes, car bien que le maintien en culture soit plus long, la croissance des organoïdes s'arrête au bout de plusieurs semaines.

Depuis 2015, divers groupes ont utilisé des approches basées sur le single-cell RNA-sequencing (sc-RNA seq) dans le but de comparer divers protocoles de génération d'organoïdes cérébraux entre eux ainsi qu'avec des tissus cérébraux fœtaux humains (Atamian et al., 2021). La première étude de sc-RNA seq réalisée est parvenue à comparer 226 transcriptomes de néocortex humains âgés de 12 et 13 semaines post-conception (*wpc, week post conception*) à 333 transcriptomes de cinq organoïdes cérébraux allant de 33 à 65 jours de différenciation. De manière intéressante, les profils d'expression génique étaient similaires pour plus de 80% des gènes, mettant en évidence que les cellules constituant les organoïdes utilisent les mêmes gènes que les cellules fœtales afin de réaliser les différents processus corticaux tels que la prolifération, la migration, l'adhésion... (Camp et al., 2015). Les technologies d'analyses transcriptomiques ont beaucoup évolué et se sont largement améliorées, ainsi en 2020 une étude basée sur la technologie 10X Genomics a analysé 8 protocoles d'organoïdes en comparaison de 190 022 cellules humaines âgées de 8 à 26 wpc. Bien que cette étude ait montré que les organoïdes possèdent des types cellulaires aussi variés que dans le cerveau humain, des marqueurs de maturité tels que ceux exprimés lors de la myélinisation ne sont pas observés (Tanaka et al., 2020).

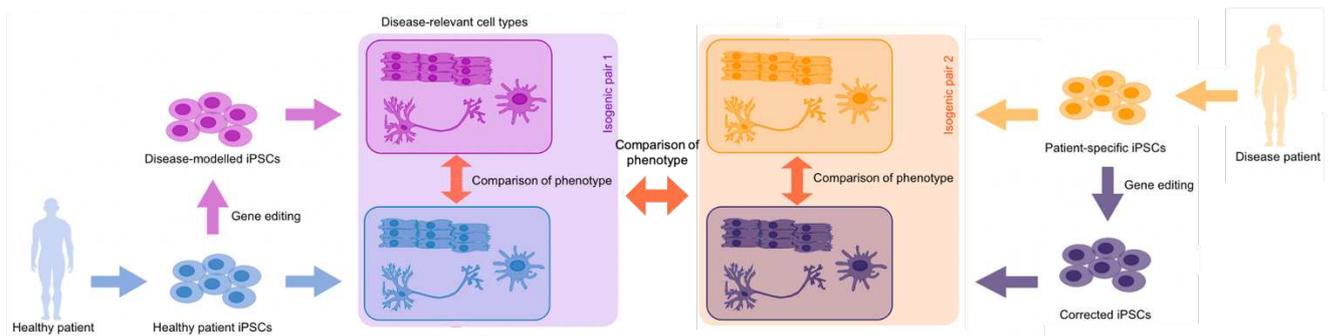
Une seconde approche s'appuie sur l'accélération des processus pathologiques ou le vieillissement des cellules grâce au potentiel de la progérine (Mahmoudi and Brunet, 2012 ; Miller et al., 2013), mais aussi par l'induction d'un stress oxydatif ou de stress mitochondrial induisant un vieillissement accéléré des cellules (Srikanth and Young-Pearse, 2014; Dong et al., 2014 ; Vera and Studer, 2015).

## **B) Élaboration de lignées isogéniques et rescues**

Comme mentionné précédemment, l'élaboration de modèles de maladies monogéniques est actuellement possible par différentes approches : obtention de CSE

à partir du stade blastocystes après un DPI ou par génération de CSPi par reprogrammation de cellules de patients. Cependant, il est parfois difficile d'obtenir des cellules de patients atteints de pathologies rares et complexes, certaines modélisations nécessitent alors une autre approche : la réalisation de mutation du gène responsable de la maladie dans une cellule saine (Avior et al., 2016).

De plus, les approches de modélisation pathologique nécessitent une attention particulière quant à la nature des phénotypes observés. En effet, l'une des craintes perpétuelles est que les défauts observés *in vitro* ne soient pas spécifiques de la mutation causale mais une conséquence de variations inter-individuelles ou de variations environnementales (conditions de culture, de conservation...). Il a été montré que des variations phénotypiques significatives étaient observées dans des cultures neuronales issues de différents clones ou lignées de CSPi. Ces variations peuvent s'expliquer par des différences de fond génétique, de marques épigénétiques, de capacité de différenciation des cellules, de dérivation ou d'adaptation lors de la culture cellulaire (Sandoe et Eggan, 2013). Ainsi, lors d'un projet de modélisation pathologique à partir de CSP, dans le but de s'assurer que les phénotypes observés sont bien liés aux mutations du gène causal de la pathologie, il est devenu indispensable de générer des lignées isogéniques ou rescues par des approches de perte ou de gain de fonction (McTague et al., 2021). Ces lignées correspondent soit à une lignée mutée au sein de laquelle la mutation est corrigée ou au contraire une lignée saine au sein de laquelle une mutation est introduite (Figure 59) (Bassett, 2017). L'atout de ces lignées générées est qu'elles possèdent le même fond génétique ainsi que les mêmes marques épigénétiques que les cellules dont elles sont issues. Cependant, la génération d'une lignée rescue diffère de celle d'une lignée isogénique de par l'approche utilisée. En effet, une lignée rescue est générée par l'apport du cDNA codant le gène défectueux dans un locus « *safe-harbour* » tel que le locus AAVS1 (*Adeno-Associated Virus Integration Site 1*) (Oceguera-Yanez et al., 2015). La génération de lignée isogénique quant à elle consiste à une modification directe du gène d'intérêt (Khurana et al., 2015).



**Figure 59 : Approche d'élaboration de lignées isogéniques dans le cadre de la modélisation pathologique**

(Modifié d'après Basset, 2017)

Les CSPi de personnes saines (bleu) et malades (orange) sont différenciées en un type cellulaire d'intérêt. Les phénotypes cellulaires et moléculaires peuvent ainsi être analysés. Afin de minimiser la variabilité due au fond génétique, des approches d'édition du génome peuvent être utilisées dans le but de corriger les cellules dérivées de patients (mauve), ou pour introduire des lésions causales putatives dans des cellules dérivées d'individus sains (rose). On obtient ainsi des paires de lignées cellulaires isogéniques (boîte rose ou boîte orange) qui permettent d'identifier le véritable impact de la modification génétique sur le phénotype cellulaire.

Le développement de ces lignées est rendu possible par des approches d'édition du génome. Les premiers outils à avoir été développés sont les ZFN (*Zinc Finger Nucleases*) et les TALEN (*Transcription Activator-Like Effector Nucleases*). Mais le domaine des technologies d'ingénierie génomique a été bouleversé en 2013 par la découverte d'une nouvelle technologie de modification précise du génome : la technologie CRISPR-Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – CRISPR-associated protéine 9*) (Gaj et al., 2013 ; Gupta and Musunuru, 2014). La découverte de cette technologie par la française Emmanuelle Charpentier et l'américaine Jennifer Doudna a été récompensée par l'attribution du prix Nobel de Chimie en 2020.

La découverte et surtout le perfectionnement de cette technologie ont permis l'élaboration de nombreuses lignées de CSPi pour des maladies génétiques. Les maladies neurologiques en font partie dont la maladie de Huntington (Xu et al., 2017), le syndrome du X fragile (Xie et al., 2016), la maladie d'Alzheimer (Paquet et al., 2016) et la maladie de Parkinson (Oksanen et al., 2017). Ces nouvelles lignées sont des outils précieux car elles permettent de faire le lien entre la mutation causale et les phénotypes observés. L'étude réalisée par Xu et al., sur la maladie de Huntington a montré que la correction du gène via la technologie CRISPR-Cas9 avait permis de corriger les défauts

de formation de rosettes neurales, les défauts de respiration mitochondriale, ainsi qu'une absence de sensibilité accrue au retrait de facteurs de croissance, tel que cela était observé précédemment (Xu et al., 2017). Cette technologie s'est tellement perfectionnée qu'à l'heure actuelle, il est possible de corriger une seule base du gène, n'induisant pas la nécessité de réparation de la coupure double brin initialement indispensable. Cette technologie, appelée édition de base (BE, *Base Editing*), s'est déjà montrée très précise et efficace (Qi et al., 2020).

Dans le cadre du syndrome de Wolfram, cette technologie a permis à une équipe de générer 3 lignées isogéniques rapidement (environ un mois) et sur des mutations homozygotes et hétérozygote (Nami et al., 2021). De plus, la correction du gène *WFS1* a permis une restauration de l'expression de la wolframine dans les cellules prouvant la robustesse de cette approche.

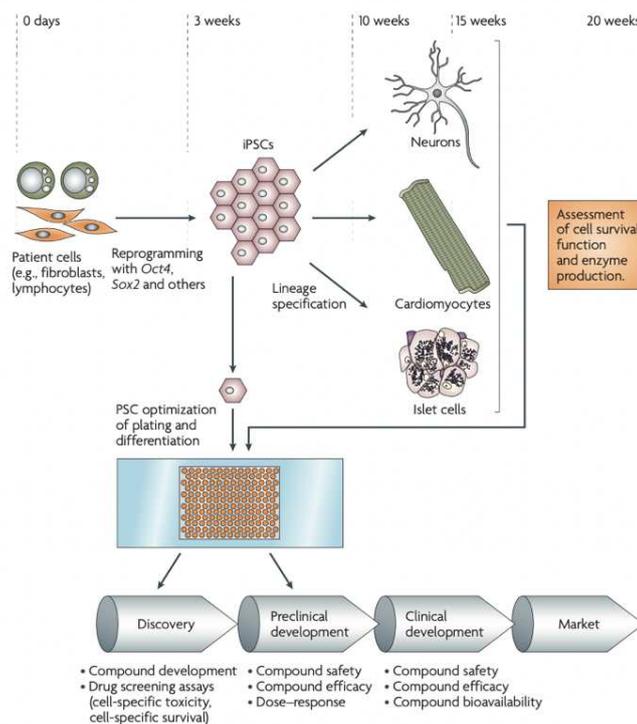
Outre son utilisation dans le cadre de la génération de lignées isogéniques et rescues pour la modélisation pathologique, la technologie CRISPR-Cas9 est particulièrement intéressante car elle rend accessible la découverte de médicament ainsi que le criblage de molécules. Mais la technologie est aussi exploitée, de par sa précision, dans le cadre de la thérapie génique et dans le renforcement de la stratégie de réponse immunitaire (De Masi et al., 2020 ; Kampmann, 2020).

### **C) Le développement de médicaments**

L'élaboration de tous ces nouveaux modèles pathologiques affectant de nombreux organes a permis d'appréhender la recherche pharmacologique d'une autre manière. Il est maintenant possible de mesurer l'efficacité ainsi que la toxicité de nombreuses molécules dans des modèles cellulaires plus proches de ce qui se passe chez les patients. Ainsi, des tests de criblage de médicaments peuvent être réalisés sur des modèles cellulaires dérivés de CSP humaines pertinents pour la pathologie.

De manière générale, un criblage de molécules au potentiel thérapeutique se base sur l'identification de « hits », c'est-à-dire des composés actifs sur un phénotype pathologique préalablement identifié et compatible avec une quantification

automatisable. Mais dû aux différences physiologiques, métaboliques, morphologiques, structurelles ou encore de tolérance entre les espèces, on peut constater un manque de concordance entre les procédures actuelles de tests et les résultats des essais cliniques. Ainsi, les modèles cellulaires dérivés de CSPi de patients rendent l'identification des mécanismes et de cibles pertinentes dans un contexte complexe et plus proche des conditions physiologiques de l'Homme. Ces cellules offrent donc une plateforme unique et illimitée pouvant reproduire différents aspects des maladies, des phénotypes associés et ainsi réaliser des essais physiologiquement pertinents pouvant mener à l'identification préclinique de molécules au potentiel thérapeutique (Figure 60) (Engle and Puppala, 2013).



**Figure 60 : Approche de criblage à haut débit à partir de CSP**  
(Ebert and Svendsen, 2010)

Le potentiel de différenciation des CSP peut être exploité dans le cadre de la découverte de médicaments afin d'identifier de nouveaux composés mais aussi évaluer leur sécurité et leur efficacité dans des types cellulaires spécifiques.

Il existe plusieurs stratégies afin de réaliser un criblage de molécules en exploitant le potentiel des CSP. La première consiste, suite à la mise en place du modèle cellulaire, à tester un nombre limité de molécules afin de corriger le phénotype dans le modèle cellulaire de la maladie. Cette approche permet de tester par exemple une

molécule déjà identifiée et très prometteuse, de tester des molécules possédant des mécanismes moléculaires proches ou encore d'identifier une voie de signalisation impliquée dans le phénotype pathologique et donc dans la maladie. Les molécules sont généralement testées sur la base de la prédiction de cibles pertinentes pour la maladie, on parle d'**approche de médicament-candidat**.

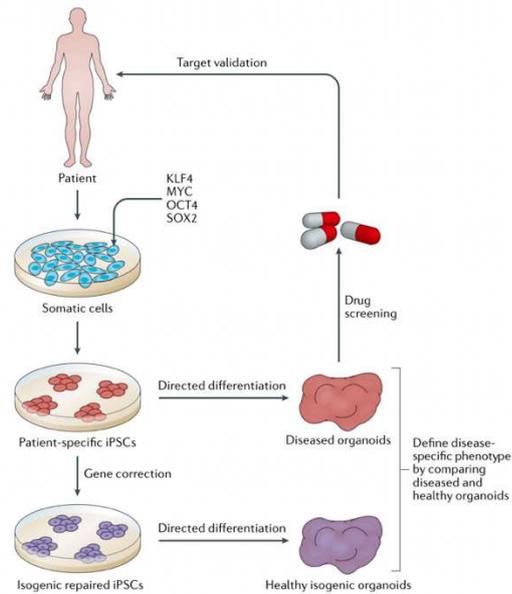
La seconde approche appelée **criblage à haut débit** (HTS, *High Throughput Screening*) consiste cette fois à tester l'effet de chimiothèques afin d'identifier de nouvelles molécules pouvant corriger le ou les phénotypes pathologiques du modèle. Cette approche est particulièrement adéquate dans le cadre des maladies pour lesquelles les mécanismes moléculaires physiopathologiques sont peu ou mal connus. Un autre avantage de cette approche, est qu'il est possible d'identifier des effets bénéfiques de molécules déjà présentes sur le marché (et donc ayant passé les différentes phases de tests avant leur mise sur le marché) et FDA-approved (*Food and Drug Administration*- approuvé) sur d'autres pathologies. Les profils pharmacocinétiques et toxicologiques étant déjà connus et validés, les coûts de recherche et de développement sont ainsi réduits. On parle alors de repositionnement de molécules. Pour illustrer cette approche, on peut prendre l'exemple d'une étude réalisée au sein du laboratoire I-STEM. Dans le cadre de la dystrophie myotonique de type 1 (DM1), une équipe du laboratoire a identifié, via une approche HTS, l'effet de la metformine sur des dérégulations de l'épissage alternatif connues et retrouvées dans le modèle dérivé de CSPi issues de cellules de patients élaboré par l'équipe. Ces effets bénéfiques de la molécule se sont également avérés compatibles avec des doses thérapeutiques administrées dans une étude clinique impliquant des personnes souffrant de diabète. Grâce à cette étude, le potentiel de la metformine pour d'autres maladies impliquant un épissage alternatif défectueux a été possible (Laustriat et al., 2015). Un certain effet bénéfique de cette molécule sur la mobilité des patients myotoniques a été démontré au cours d'un essai clinique (Bassez et al., 2018).

Plus récemment, une autre équipe de l'institut a procédé à un criblage à haut débit de plus de 3 000 molécules sur un modèle de neurones dérivés de CSPi humaines.

Réalisé dans le cadre de la modélisation de la maladie de Lesh-Nyhan, l'équipe est parvenue, grâce à ce criblage, à identifier des molécules capables de corriger l'expression de l'HGPRT (Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase), enzyme déficiente chez les patients (Ruillier et al., 2020). A ce jour, plusieurs criblages de petites chimiothèques ont été réalisés sur des CSE humaines (Charbord et al., 2013 ; Thorne et al., 2016) mais aussi sur des CSPi (Grskovic et al., 2011 ; Rao et al., 2022) notamment dans le contexte des maladies neurologiques telles que la SMA (Ebert et al., 2009) et l'ALS (Burkhardt et al., 2013) mais aussi dans le cadre de maladies neurodéveloppementales et neurodégénératives (Marchetto et al., 2010 ; Benchoua et al., 2021).

L'exploitation des CSPi humaines joue un rôle crucial dans la découverte et l'amélioration du développement de médicaments, de par leur accessibilité, leur reproductibilité, leur pertinence dans le cadre de la modélisation pathologique ainsi que leur coût financier raisonnable. Ces cellules ont fait leurs preuves pour le criblage et l'étude de la toxicité des molécules en cours de développement ainsi que l'étude des mécanismes physiopathologiques (Csöbönyeiová et al., 2016). De plus, les CSPi possèdent la capacité de pouvoir se différencier dans des formats miniaturisés compatibles avec du criblage de molécules à haut débit, argument supplémentaire à la pertinence de ces cellules pour le criblage de molécules.

Cependant, bien que ces approches aient démontré leur importance dans la découverte de molécules au potentiel thérapeutique, l'une des perspectives actuelles du criblage est de complexifier les modèles dérivés de CSP humaines. En effet, malgré des résultats encourageants pendant le criblage, 90% des molécules testées par la suite dans le cadre d'un essai clinique mènent à des résultats négatifs dont 60% présentent une efficacité faible et 30% nécessitent un arrêt précoce de l'essai suite à l'apparition d'effets secondaires allant jusqu'à la toxicité (Tagle, 2019). Face à ce constat, de nombreuses équipes travaillent sur la complexification des modèles dans le cadre du criblage à haut débit, notamment avec des approches organ-on-chip (Ishida, 2018), ou encore des organoïdes (Figure 61) (Rowe and Daley, 2019).



**Figure 61 : Approche de criblage à haut débit sur organoïdes**

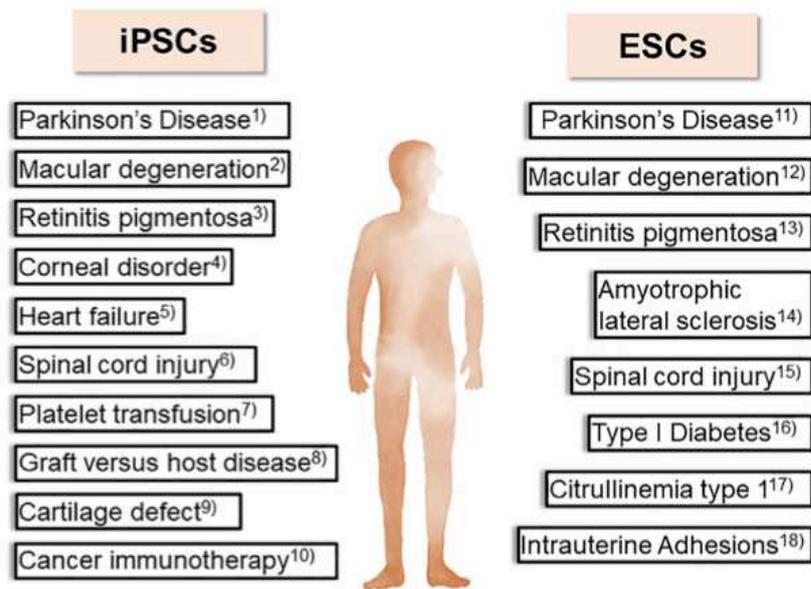
(Rowe and Daley, 2019)

Les progrès importants réalisés dans la différenciation à partir de CSP permet d'envisager l'étude de molécules sur des structures de plus en plus complexes que sont les organoïdes.

#### D) La thérapie cellulaire

Dès leur découverte, les CSP humaines ont été porteuses de beaucoup d'espoir dans les approches thérapeutiques par thérapie cellulaire pour des maladies dégénératives pour lesquelles il n'existait pas de thérapeutique (Kiskinis and Egan, 2010 ; Hirschi et al., 2014).

La thérapie cellulaire a pour principe l'apport de cellules générées *in vitro* dans le but de remplacer des cellules non fonctionnelles, absentes ou perdues dans le cadre de pathologies. En 2020, on dénombrait une dizaine d'essais cliniques de thérapie cellulaires à partir de CSP humaines, pour des pathologies variées : la dégénérescence maculaire liée à l'âge, la rétinite pigmentaire, les lésions de la moelle épinière mais aussi la maladie de Parkinson (Figure 62) (Yamanaka, 2020).



**Figure 62 : Essais cliniques de thérapie cellulaires basés sur l'utilisation de CSP humaines**

(Yamanaka, 2020)

Le potentiel de différenciation des CSPi et CSE humaines a permis de développer un nombre important d'essais cliniques dans le contexte de la thérapie cellulaire à partir de celles-ci, sur des pathologies variées.

Aujourd'hui, l'utilisation des CSPi en thérapie cellulaire pour la maladie de Parkinson est un enjeu majeur et la première par opposition à un modèle induit chimiquement. Initiée en 2018, l'approche a consisté à transplanter dans la substance noire des progéniteurs de neurones dopaminergiques dérivés à partir de CSPi humaines (Takahashi 2019 ; 2020). Dans le cadre de cette étude, sept patients atteints de la maladie de Parkinson sous sa forme modérée ont été sélectionnés. A l'heure actuelle, aucun résultat d'efficacité n'a été présenté, mais cela n'est pas surprenant puisqu'il peut s'écouler de six mois à deux ans avant que les cellules transplantées ne s'intègrent complètement et produisent suffisamment de dopamine pour induire une différence notable (Gravitz, 2021).

Les CSPi sont également porteuses d'espoir dans le cadre de la médecine personnalisée par le biais de l'utilisation des cellules somatiques du patient. Les cellules peuvent être prélevées, reprogrammées en CSPi à l'aide de méthodes sans intégration et produites à grande échelle en condition de grade clinique. Le premier essai clinique de ce type a été réalisé en 2014 pour soigner la dégénérescence maculaire (Mandai et al., 2017). Pour cela, des cellules d'épithélium pigmentaire rétinien (RPE) dérivées de

CSPi ont été transplantées directement dans l'œil des patients. Bien que la vue des patients se soit améliorée un an après, l'essai a dû être stoppé après la détection de mutations dans le génome des CSPi exploitées pour générer le greffon du deuxième patient.

## **E) Conclusion**

Pour conclure sur ce chapitre, la place et l'importance des CSPi dans le cadre de la médecine et de la recherche n'a cessé de prendre de l'ampleur depuis leur découverte. Et pour cause, ces cellules possèdent de nombreuses qualités indiscutables dans le cadre de projets de recherche et l'élaboration de traitement de maladies génétiques. La levée des questions éthiques liées à leur utilisation a permis de détrôner sans difficulté l'utilisation des CSE dans de nombreux domaines. Dans l'ensemble des études évoquées précédemment, les CSPi humaines ont prouvé leur pertinence dans la thérapie cellulaire, la modélisation pathologique mais également dans le cadre de criblages à haut débit pour identifier de nouvelles thérapeutiques pour des maladies génétiques pour lesquelles aucun traitement n'est actuellement possible.

L'ensemble de ces qualités font des CSPi un outil précieux de la recherche et complémentaire aux modèles animaux pour la modélisation de maladies génétiques rares neurodéveloppementales comme le syndrome de Wolfram de type 1. Dans le but de modéliser les atteintes précoces du syndrome ainsi que les mécanismes qui leurs sont associées, l'exploitation des CSPi humaines est apparue comme indispensable par l'équipe au sein de laquelle j'ai réalisé mon projet doctoral. L'objectif ultime de l'équipe est d'identifier des thérapeutiques pour les patients.

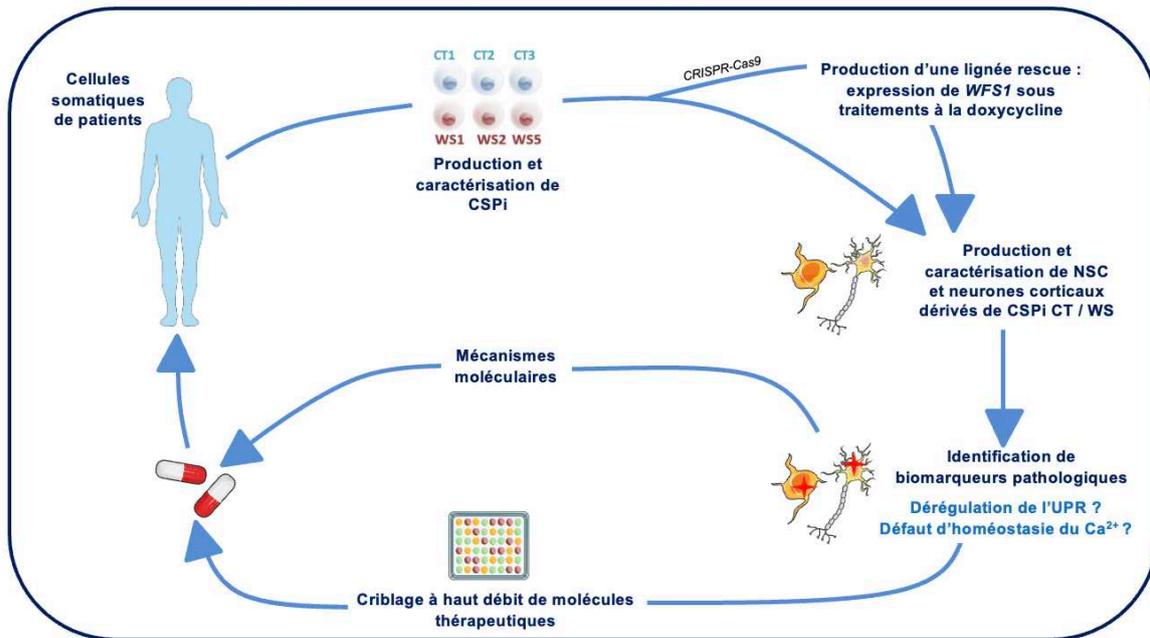


# **PROBLEMATIQUE ET DEMARCHE EXPERIMENTALE**



Depuis le début des années 2000, la compréhension du syndrome de Wolfram de type 1 n'a cessé d'évoluer. L'identification des mécanismes physiopathologiques touchant notamment les cellules  $\beta$ -pancréatiques, le diagnostic clinique ainsi que la prise en charge des patients se sont grandement améliorés. Tous ces efforts ont largement contribué à la découverte de plusieurs molécules actuellement en essai clinique. Cependant, malgré ces avancées majeures, les mécanismes neurodégénératifs à l'origine du décès précoce des patients restent mal connus et peu étudiés. L'identification récente par IRM d'atteintes neurodéveloppementales chez les patients renforce la nécessité d'identifier les mécanismes physiopathologiques touchant les populations cellulaires du système nerveux central. De par la difficulté extrême d'accéder aux cellules d'intérêt chez les patients atteints du SW1, le développement de nouveaux modèles cellulaires humains est indispensable afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pertinentes. Ce besoin est d'autant plus fort que, dans les différents modèles cellulaires et animaux développés de la pathologie, la modélisation de ces atteintes reste très limitée.

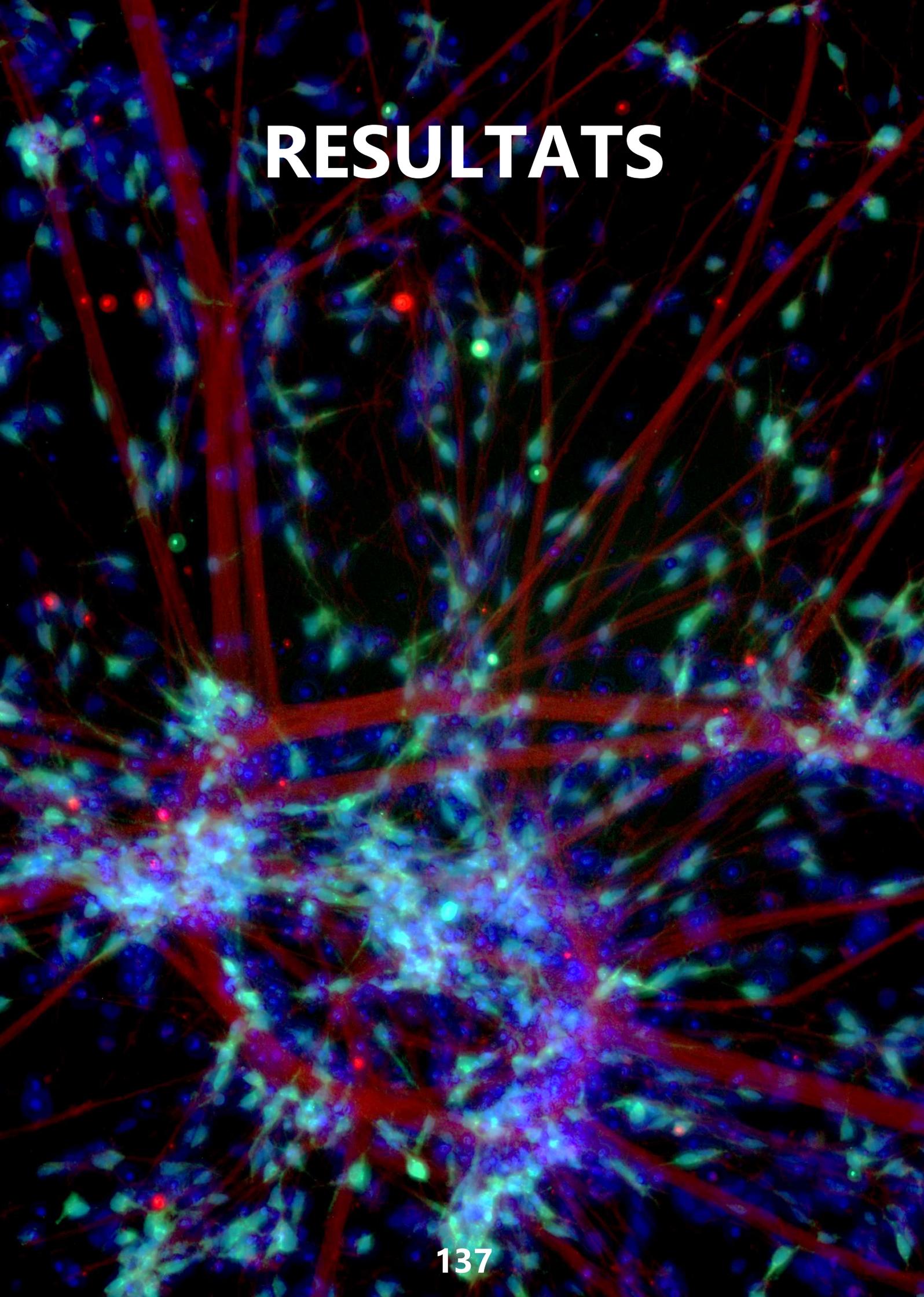
Face à l'ensemble de ces limites, l'objectif général de ma thèse a consisté à développer un nouveau modèle cellulaire humain afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans les atteintes neurologiques du SW1 et identifier de possibles cibles thérapeutiques. Pour ce faire, nous nous sommes appuyés sur le potentiel des cellules souches pluripotentes induites (CSPi) humaines. Ce projet de modélisation pathologique s'est articulé autour d'une stratégie qui a fait ses preuves à l'I-STEM et qui consiste tout d'abord à générer les types cellulaires d'intérêt, puis à identifier et valider des phénotypes pathologiques ainsi que les mécanismes associés pour *in fine* identifier des molécules agissant sur ces phénotypes (Figure 63).



**Figure 63 : Stratégie expérimentale de modélisation pathologique menée par l'équipe**

Cette stratégie réalisée au cours de ma thèse a permis d'investiguer différents objectifs dont (i) le développement d'un modèle de neurones corticaux dérivés de CSPI humaines à partir de fibroblastes de patients WS1 ; (ii) l'identification des phénotypes pathologiques dans ces neurones ainsi que les mécanismes impliqués ; (iii) l'étude de l'effet de molécules thérapeutiques sur ce nouveau modèle. CT : lignée contrôle ; WS : lignée Wolfram

# RESULTATS

A complex network visualization with a dense web of nodes and edges. The nodes are colored in red, blue, and green, and are scattered across the frame. The edges are thin, dark lines connecting the nodes, forming a complex, interconnected structure. The overall appearance is that of a large, multi-colored graph or network.



## Article de recherche :

La majeure partie des résultats obtenus au cours de ma thèse a fait l'objet d'une publication au sein du journal scientifique « *The American Journal of Human Genetics* » en novembre 2021 (cf p145). Les principaux résultats de cet article sont résumés ci-dessous ainsi que dans la figure 64.

### Human iPSC-derived neurons reveal early developmental alteration of neurite outgrowth in the late-occurring neurodegenerative Wolfram syndrome

Sandra Pourtoy-Brasselet,<sup>3,6</sup> Axel Sciauvaud,<sup>1,2,6</sup> Maria-Gabriela Boza-Moran,<sup>1,2</sup> Michel Cailleret,<sup>1,2</sup> Margot Jarrige,<sup>1,2,3</sup> Hélène Polvêche,<sup>3</sup> Jérôme Polentes,<sup>3</sup> Eric Chevret,<sup>4,5</sup> Cécile Martinat,<sup>1,2</sup> Marc Peschanski,<sup>1,2,3</sup> and Laetitia Aubry<sup>1,2</sup>

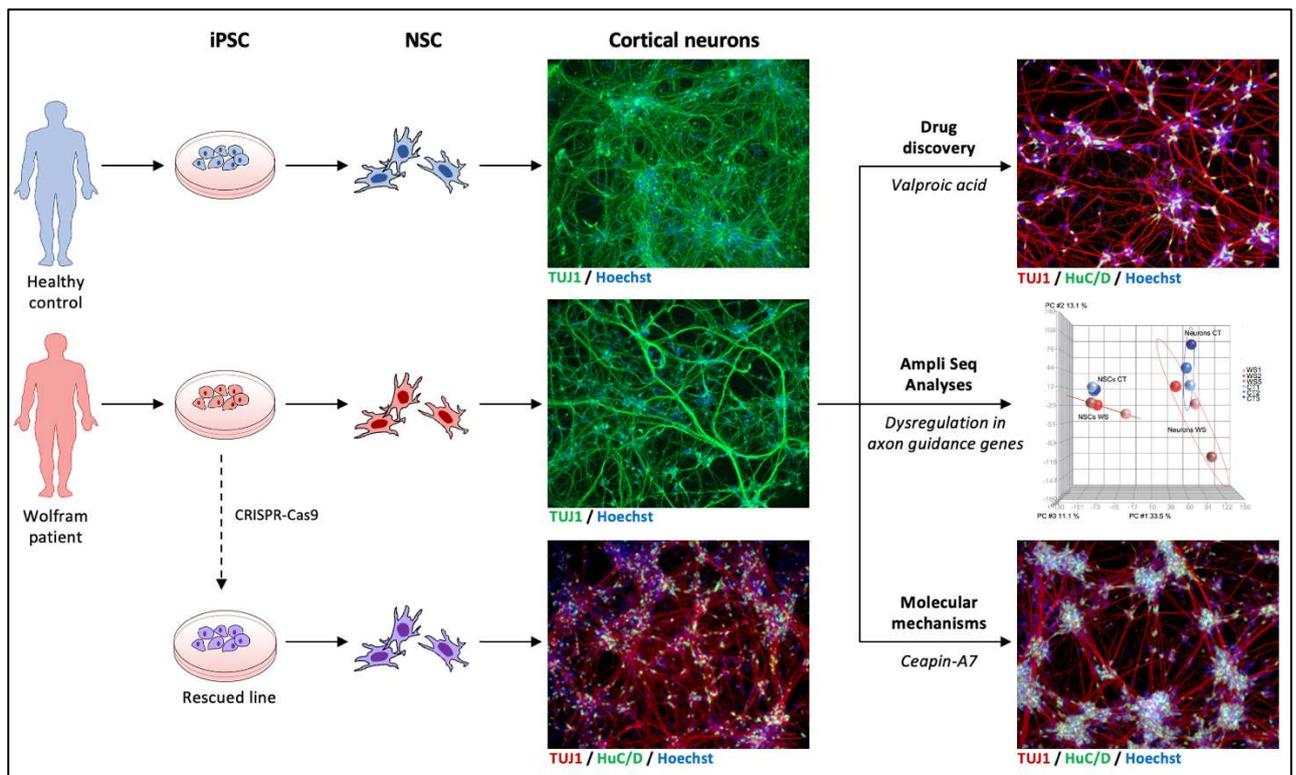


Figure 64 : Résumé graphique des travaux de recherche menés au cours de ma thèse  
*iPSC* : Cellules Souches Pluripotentes induites ; *NSC* : Cellules Souches Neurales

## *Génération d'un modèle de neurones corticaux dérivés de CSPi humaines du SW1*

La première étape de ce projet a consisté à générer les cellules d'intérêt à savoir des neurones corticaux. Pour cela, j'ai eu à ma disposition 3 lignées de CSPi contrôles (CT1, CT2 et CT3) et 3 lignées porteuses de mutations causales du SW1 (WS1, WS2 et WS5). La différenciation en neurones corticaux a été réalisée par le biais d'un protocole précédemment élaboré au sein du laboratoire (Boissart et al., 2013). La première étape de ce protocole a permis de différencier les CSPi en progéniteurs neuraux appelés cellules souches neurales (NSC). Ces cellules sont prolifératives et peuvent être congelées, ce qui présente l'avantage considérable de pouvoir repartir de ce stade, et non des CSPi, à chaque fois que nous voulons générer des neurones corticaux. Ainsi, une banque de NSC a pu être créée pour chaque lignée. A cette première étape du protocole de différenciation, les cellules ne présentaient pas de différence en termes de morphologie et d'expression de marqueurs caractéristiques du stade NSC tels que Nestin (*neuroepithelial stem cell protein*), Ki67 et Sox2 (*SRY-Box Transcription Factor 2*), malgré l'absence d'expression de WFS1 dans les cellules mutées. La deuxième étape du protocole nous a ensuite permis de différencier ces NSC en neurones corticaux. Ces neurones ont été caractérisés par l'expression des marqueurs Tuj1 (*Class III  $\beta$ -Tubulin*), HuC/D (*Hu protein C/D*) ainsi que le marqueur cortical CUX2 (*Cut like Homeobox 2*). La quantification de l'expression de ces marqueurs a permis de montrer que les NSC CT et WS étaient capables de générer un pourcentage similaire de neurones corticaux. L'absence de la wolframine a également été confirmée dans les cellules mutées. De plus, les mutations dans les cellules WS ne semblent pas impacter le potentiel des CSPi à se différencier en NSC et neurones corticaux. Ainsi, par le biais des CSPi et l'exploitation d'un protocole de différenciation établi au sein du laboratoire, nous sommes parvenus à générer un nouveau modèle cellulaire du SW1 : des neurones corticaux (contrôles et porteurs de mutations causales du SW1).

### *Identification de phénotypes physiopathologiques*

Suite à l'obtention de notre modèle, et puisque celui-ci se prête particulièrement à l'étude du développement neuronal, nous nous sommes intéressés dans un premier temps aux atteintes neurodéveloppementales récemment décrites. Notre approche expérimentale a ainsi permis d'identifier un phénotype non décrit jusqu'à présent. Au cours de la différenciation en neurones corticaux, un défaut majeur de mise en place du réseau neuronal est observé dans les neurones mutés. En effet, le réseau neuronal des cellules CT est dense et majoritairement composé de fibres fines contrairement à celui des cellules mutées dont la densité est moins importante et qui présente un phénotype anormal. Ce phénotype est caractérisé par un défaut de pousse neuritique qui s'illustre par la présence de larges structures correspondant à des fasciculations. Ce mécanisme se traduit par l'association de plusieurs neurites se regroupant et formant des faisceaux particulièrement épais. L'apparition de ce phénotype débute très tôt au cours de la différenciation neuronale mettant ainsi en évidence un défaut neurodéveloppemental. De plus, ces observations ont été renforcées par la réalisation d'analyses transcriptomiques qui ont montré qu'un certain nombre de gènes étaient dérégulés dans les cellules mutées aux stades NSC et neurones corticaux. Des analyses d'enrichissement ont mis en évidence que certains de ces gènes, tels que *SLIT3*, *EPHB1*, *SEMA4A* ou encore *UNC5D* étaient impliqués dans des mécanismes tels que la neurogenèse, le développement du système nerveux central ainsi que le guidage axonal.

Par ailleurs, au vu des données de la littérature ayant établi un lien entre WFS1 et l'UPR, nous avons également analysé l'expression des acteurs de ses voies à la suite d'un stress du RE provoqué par un traitement à la thapsigargine, molécule inhibitrice de la sortie du calcium du RE, ainsi qu'en condition non traitée (niveau basal). De manière intéressante, aucune augmentation significative de l'expression des marqueurs des voies de l'UPR n'a été détectée dans les cellules mutées par rapport aux contrôles à un niveau basal, aux stades NSC et neurones corticaux. Cependant, à la

suite de l'induction d'un stress des cellules après 8h de traitement à la thapsigargine, les NSC mutées présentent un niveau d'expression de la forme épissée de XBP1 (XBP1s) plus élevé que les cellules contrôles. Ceci révèle ainsi une activation de l'UPR plus importante dans les cellules mutées en condition de stress. Ces résultats mettent en évidence que les cellules mutées ne semblent pas parvenir à moduler leur réponse à un stress du RE de manière semblable aux contrôles. En revanche, en l'absence de stress, les cellules mutées possèdent un niveau d'activation de la voie UPR similaire aux cellules contrôles.

### ***Génération d'une lignée rescue***

Afin de s'assurer que le défaut de pousse neuritique était lié à l'absence de la wolframine, une lignée rescue (WS5R) a été produite. Cet outil a été généré par l'insertion au locus AAVS1 du cDNA *WFS1* dans la lignée mutée WS5, par le biais de la technologie CRISPR-Cas9. L'expression du cDNA a été placée sous le contrôle d'un promoteur inductible à la doxycycline (dox) permettant ainsi de moduler l'expression de la wolframine dans le temps. La synthèse de wolframine dans les cellules WS5R aux stades NSC et neurones corticaux après traitements à la dox a été confirmée par western-blot. De plus, lors de la différenciation de cette lignée en neurones corticaux, nous avons observé que le traitement à la dox, induisant l'expression de la wolframine, prévenait l'apparition du phénotype. En effet, le réseau neuronal des cellules WS5R traitées à la dox était similaire aux réseaux des lignées contrôles, contrairement à celui de la lignée WS5R non traitée et donc en l'absence de wolframine. L'élaboration de cette lignée nous a donc permis de nous assurer que le défaut de pousse neuritique observé était bien corrigé lorsque la wolframine était exprimée, et ainsi de corrélérer ce phénotype à l'absence d'expression de WFS1.

## *Etude des mécanismes moléculaires impliqués dans le défaut de pousse neuritique*

L'identification ainsi que la compréhension des mécanismes à l'origine de ces défauts neurodéveloppementaux ont été un objectif majeur de ma thèse. Naturellement, puisque le lien entre la wolframine et l'UPR a été décrit dans de nombreuses études, nous avons exploré l'implication de celle-ci dans le phénotype de défaut de pousse neuritique. Notre stratégie a consisté en une approche d'inhibition indépendante et spécifique de chacune des voies de l'UPR par le biais de molécules. De ce fait, nous avons identifié que seule la Ceapin-A7, un inhibiteur de la voie ATF6 $\alpha$ , permettait de prévenir l'apparition du phénotype et d'obtenir un réseau neuronal d'aspect similaire à celui des neurones CT. Ces résultats renforcent la relation précédemment décrite entre la wolframine et ATF6 $\alpha$ .

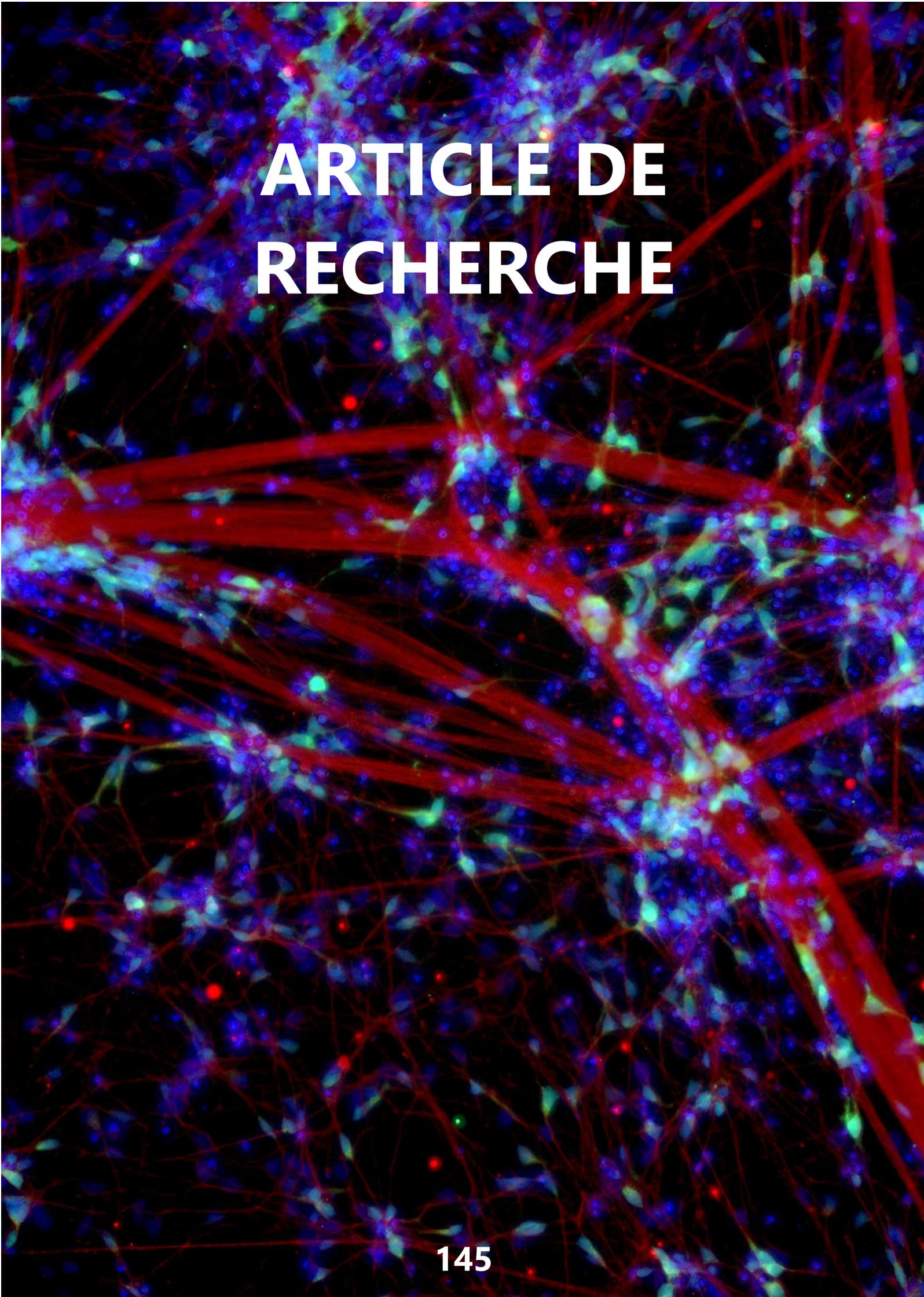
### *Approche pharmacologique*

La dernière partie de mon projet de thèse a consisté à étudier l'effet de composés chimiques sur le défaut neurodéveloppemental observé dans notre modèle de neurones corticaux. Pour cela, les neurones ont été traités, au cours de la différenciation neuronale, par plusieurs molécules dont le potentiel thérapeutique avait précédemment été identifié. Nous avons notamment testé l'effet de trois molécules actuellement en essai clinique dans le cadre du SW1 : le dantrolène, le liraglutide et l'acide valproïque (VPA). Le potentiel d'une autre molécule a également été analysé : l'acide 4-phenylbutyrique (4-PBA). Ces composés possèdent des mécanismes différents et ont donc des cibles différentes. En effet, le dantrolène est un stabilisateur de calcium du RE, le liraglutide est un agoniste du GLP1, le VPA est un inhibiteur non spécifique de l'histone désacétylase et enfin, le 4-PBA est une chaperonne chimique à activité antioxydante. Parmi ces composés chimiques, seul le VPA a montré un effet

préventif sur le développement du défaut de pousse neuritique observé dans les neurones issus de CSPi mutées. De plus, ces traitements permettent de corriger les défauts d'expression des gènes *SLIT3*, *TNC* et *EPHB1* identifiés comme dérégulés. Le VPA est actuellement en évaluation dans un essai clinique nommé *TreatWolfram* porté par le Pr Barrett (identifiant clinicaltrial.gov : NCT03717909). Nos résultats ont renforcé la pertinence de tester l'effet du VPA chez les patients SW1 et ont contribué au lancement d'un autre essai clinique appelé *AudioWolf* (identifiant clinicaltrial.gov : NCT04940572), basé également sur l'étude de l'effet du VPA.

### ***Conclusions***

Dans le cadre de notre approche de modélisation pathologique du syndrome de Wolfram de type 1, nous sommes parvenus à générer un nouveau modèle cellulaire dérivé de CSPi humaines dans le but de modéliser les atteintes neurologiques du syndrome. Cette approche a permis d'identifier un nouveau phénotype au cours de la différenciation en neurones corticaux : un défaut majeur de mise en place du réseau neuronal. L'élaboration d'une lignée rescue a permis de corrélérer l'absence d'expression de la wolframine dans les cellules mutées à ce nouveau phénotype. Des analyses transcriptomiques ont également mis en évidence des dérégulations de gènes impliqués dans différents mécanismes de la neurogenèse et du guidage axonal dans les cellules mutées. L'ensemble de ces résultats renforcent ainsi les observations neurodéveloppementales récemment décrites chez les patients. Par ailleurs, nous avons également démontré une activation de l'UPR plus importante dans les cellules mutées par rapport aux cellules contrôles à la suite d'un stress du RE. De plus, l'implication de la voie ATF6 $\alpha$  de l'UPR dans le défaut de pousse neuritique a été mise en évidence par le biais du traitement avec la Ceapin-A7, renforçant ainsi le lien entre WFS1 et cette voie. Enfin, l'effet préventif du VPA sur l'apparition du phénotype pathologique a été mis en évidence dans notre modèle, consolidant ainsi le potentiel thérapeutique de cette molécule et contribuant au lancement d'un nouvel essai clinique.

A complex network graph visualization with red, blue, and green nodes and edges. The nodes are small circles, and the edges are thin lines connecting them. The overall structure is dense and interconnected, with some larger, more prominent nodes and edges. The colors are vibrant and contrast sharply against a dark background.

# ARTICLE DE RECHERCHE

# Human iPSC-derived neurons reveal early developmental alteration of neurite outgrowth in the late-occurring neurodegenerative Wolfram syndrome

Sandra Pourtoy-Brasselet,<sup>3,6</sup> Axel Sciauvaud,<sup>1,2,6</sup> Maria-Gabriela Boza-Moran,<sup>1,2</sup> Michel Cailleret,<sup>1,2</sup> Margot Jarrige,<sup>1,2,3</sup> H el ene Polv eche,<sup>3</sup> J er ome Polentes,<sup>3</sup> Eric Chevet,<sup>4,5</sup> C ecile Martinat,<sup>1,2</sup> Marc Peschanski,<sup>1,2,3</sup> and Laetitia Aubry<sup>1,2,\*</sup>

## Summary

Recent studies indicate that neurodegenerative processes that appear during childhood and adolescence in individuals with Wolfram syndrome (WS) occur in addition to early brain development alteration, which is clinically silent. Underlying pathological mechanisms are still unknown. We have used induced pluripotent stem cell-derived neural cells from individuals affected by WS in order to reveal their phenotypic and molecular correlates. We have observed that a subpopulation of Wolfram neurons displayed aberrant neurite outgrowth associated with altered expression of axon guidance genes. Selective inhibition of the ATF6 $\alpha$  arm of the unfolded protein response prevented the altered phenotype, although acute endoplasmic reticulum stress response—which is activated in late Wolfram degenerative processes—was not detected. Among the drugs currently tried in individuals with WS, valproic acid was the one that prevented the pathological phenotypes. These results suggest that early defects in axon guidance may contribute to the loss of neurons in individuals with WS.

## Introduction

Wolfram syndrome (WS [MIM: 222300]) is a rare multi-systemic monogenic disease that is characterized by a panel of symptoms appearing during childhood and adolescence.<sup>1</sup> Focal neurodegenerative processes then occur, affecting neurosensory systems and the brainstem. Recent results of magnetic resonance imaging studies have revealed, however, that individuals affected by Wolfram syndrome display in addition a statistically significant overall reduction of brain volume. The origin of the brain volume reduction has been ascribed to yet unknown neurodevelopmental defects<sup>2–4</sup> because it is present as early as the authors looked for it and remains stable, in contrast to the later-appearing neurodegenerative processes that progress over time. This finding could be read in conjunction with older analyses of brains from WS-affected persons that had pointed-out widespread axonopathy<sup>5</sup> or diffuse leukoencephalopathy<sup>6</sup> in the absence of clinical correlates.

The molecular mechanisms that underlie WS, which results from mutations in *WFS1* (MIM: 606201) and consequently with the loss of wolframin protein, have been mainly ascribed to a defect in the stress response of the endoplasmic reticulum (ER).<sup>7,8</sup> This is supported by the localization of wolframin at the ER membrane<sup>9</sup> and its role as an inhibitor of the ATF6 $\alpha$  branch of the unfolded protein response<sup>10</sup> (UPR). Accordingly, its absence in pancreatic  $\beta$  cells from individuals affected by WS has been associated

with a defective control of the UPR leading to cell dysfunction and death<sup>11</sup> and diabetes. Defects in the ER stress response have also been proposed as the main pathological mechanism that leads to the progressive neurodegenerative processes that affect retinal ganglionic neurons and, by extension, sensory neurons of the ear and brainstem that also display strong losses over time.<sup>12</sup> Such phenomena were, however, difficult to reconcile with the spatial and temporal features of the overall reduction in brain volume.

In the present study, we sought to investigate the cellular and molecular mechanisms associated with the neurodevelopmental pathology in WS. We hypothesized that neurons differentiated from induced pluripotent stem cells (iPSCs) would provide us with a directly relevant experimental model in order to compare early neurodevelopmental phenomena from healthy and Wolfram donors. Protocols for the differentiation of pluripotent stem cells based upon the dual inhibition of both the activin/nodal and bone morphogenetic protein (BMP) pathways, the two canonical Smad-dependent pathways, have been shown to recapitulate nicely the progression of cells along the neural lineage.<sup>13,14</sup> In particular, glutamatergic cortical neurons can be specifically differentiated.<sup>15</sup> This has thus allowed us to compare similar neuronal populations from healthy and Wolfram donors at discrete early stages of neural development and reveal pathological abnormalities that provide clues to understand the mechanisms that lead to the defects in brain volume identified in individuals with WS.

<sup>1</sup>INSERM UMR 861, I-STEM, AFM, Corbeil-Essonnes 91100, France; <sup>2</sup>Universit e Paris-Saclay, INSERM, Univ Evry, Institut des Cellules Souches pour le Traitement et l'étude des Maladies Monog eniques, Corbeil-Essonnes 91100, France; <sup>3</sup>CECS/AFM, I-STEM, Corbeil-Essonnes 91100, France; <sup>4</sup>INSERM U1242, Universit e Rennes 1, Rennes 35000, France; <sup>5</sup>Centre de Lutte Contre le Cancer Eugène Marquis, Rennes 35000, France

<sup>6</sup>These authors contributed equally

\*Correspondence: [laubry@istem.fr](mailto:laubry@istem.fr)

<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2021.10.001>

  2021 American Society of Human Genetics.

## Material and methods

### Fibroblast reprogramming and pluripotent stem cell culture

The CT1 and CT3 control iPSC lines have been reprogrammed at I-Stem and already published<sup>15,16</sup> (CT1 corresponding to line 1869 and CT3 to line PB12). The CT2 iPSC line was reprogrammed from IMR-90 lung fibroblast cell (ATCC CCL-186). WS1 and WS2 iPSC lines were kindly given by the New York Stem Cell Foundation and have already been published.<sup>17</sup> The W55 iPSC line was derived from fibroblasts provided by Dr. Cécile Delettre and the late Professor Christian Hamel, isolated from one individual affected by WS biopsy after approval of the local ethical committee (NCT03853252, Institute for Neurosciences in Montpellier, France). All the cell lines used for this study as well as the experimental processes have been performed according to the French legal policy. Consequently, informed consent was obtained from all participants or their legal representatives.

Fibroblasts were grown in fibroblast culture medium consisting of DMEM high glucose (Invitrogen), GlutaMAX supplement (Invitrogen), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma-Aldrich), 1% non-essential amino acids (Invitrogen), and 1 mM sodium pyruvate (Invitrogen). CT2 and W55 iPSC lines were obtained and characterized as described by Yu et al.<sup>18</sup> with Addgene plasmid 20925, 20926, and 20927. iPSCs were grown on murine embryonic fibroblasts (MEFs) in human embryonic stem cells (hESCs) culture medium consisting of DMEM with 20% Knockout Serum Replacement (KSR), 1% non-essential amino acids, 1% GlutaMAX, 0.1%  $\beta$ -mercaptoethanol, and 0.1% penicillin/streptomycin (all from Thermo Fisher Scientific) and supplemented with 10 ng/mL FGF-2 (Peprotech) with manual passaging once a week and daily medium change during the characterization steps. They were then adapted for feeder-free culture and grown on vitronectin-coated dishes (Thermo Fisher Scientific) in StemMACS iPS-Brew XF (Miltenyi Biotec). Cultures were fed every 2 days and passaged every 5–7 days.

### Pluripotent stem cell differentiation

For embryoid bodies (EBs) differentiation, iPSC colonies growing on MEFs were detached with 1 mg/mL collagenase (Thermo Fisher Scientific) during 10 min at 37°C, resuspended in hESCs medium without FGF-2, and cultured in low attachment 6-well plates for 7 days at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. The EBs were then plated on 0.1% gelatin-coated (Sigma-Aldrich) plates and maintained for another 7 days prior immunostaining.

Neural stem cells (NSCs) differentiation was performed as described previously.<sup>15</sup> At this stage of differentiation, cells can be frozen in a 90% FBS/10% dimethylsulfoxide  $\geq$ 99.5% (DMSO, 0.005%, VWR) solution. After thawing, cells were seeded on a poly-L-ornithin/laminin (PO/LAM)-coated support in N2B27 medium consisting of DMEM/F12, neurobasal, N2 and B27 supplements, 0.1%  $\beta$ -mercaptoethanol, and 0.1% penicillin/streptomycin (all from Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10 ng/mL of FGF-2 and epidermal growth factor (EGF) (Peprotech) and 10  $\mu$ M of Y-27632 (StemCell Technologies). Medium was changed the next day without Y-27632 and then changed every 2 days. NSCs were passaged twice a week with Trypsin-EDTA 0.05% (Thermo Fisher Scientific) and seeded on PO/LAM-coated support at a density of 50,000 cells/cm<sup>2</sup> for amplification.

Neuronal differentiation was induced by plating the NSCs at low density (50,000 cells/cm<sup>2</sup>) in PO/LAM-coated culture plates in

N2B27 medium without FGF-2 and EGF. At day 4, we added 10  $\mu$ M DAPT (R&D Systems) to the medium to stop cell proliferation. The medium was changed every 4 days and neurons were obtained after 18–21 days of *in vitro* (DIV) differentiation.

### Drug treatments

For drug treatments experiments, NSCs were differentiated into neurons as previously described. The neurons were treated twice at DIV 10 and DIV 14 with the following molecules and concentrations:<sup>19</sup> 10  $\mu$ M ceapin-A7 (Sigma-Aldrich); 2.5  $\mu$ M MKC-8866 (MedinnoVata); 10  $\mu$ M salubrinal (Sigma-Aldrich); 100 nM liraglutide (Bio-Techne); 10  $\mu$ M dantrolene (Sigma-Aldrich); 1 mM 4-phenyl butyric acid (4PBA, Merck); 0.5 mM or 1.5 mM valproic acid (VPA, Sigma-Aldrich). Ceapin-A7, MKC-8866, salubrinal, liraglutide, and dantrolene were resuspended in DMSO. For further analyses, cultures were stopped at DIV 18. We used neuraminidase (NM) at 10 mU (Sigma-Aldrich) as a technical control to prevent the fasciculation as this enzyme removes specifically sialic acid residues and consequently reduces non-specifically adhesion between neurites.<sup>20</sup>

### Ion AmpliSeq Transcriptome Human Gene Expression Kit

For each of the 12 samples, we reverse transcribed 50 ng of total RNA with the Ion AmpliSeq Transcriptome Human Gene Expression Kit by following the protocol of the manufacturer (Thermo Fisher Scientific).<sup>21</sup> The cDNA libraries were amplified and bar-coded with Ion AmpliSeq Transcriptome Human Gene Expression core panel and Ion Xpress Barcode Adaptor (Thermo Fisher Scientific). The amplicons were quantified with the Agilent High Sensitivity DNA kit before the samples were pooled in sets of eight. Emulsion PCR and enrichment was performed on the Ion OT2 system Instrument with the Ion PI Hi-Q OT2 200 kit (Thermo Fisher Scientific). Samples were loaded on an Ion PI v.3 Chip and sequenced on the Ion Proton System with Ion PI Hi-Q sequencing 200 kit chemistry (200 bp read length; Thermo Fisher Scientific). The Ion Proton reads (FASTQ files) were imported into the RNA sequencing (RNA-seq) pipeline of Partek Flow software (v.6 Partek) with hg19 as a reference genome. The number of reads per sample ranged from 7.1 million to 10 million reads. To determine genes that are differentially expressed between groups, we quantified mapped reads by using Partek E/M algorithm after normalization by the total count/sample (the resulting counts represent the gene expression levels on reads/millions for over 20,800 different genes present in the AmpliSeq Human Gene Expression panel). Differentially expressed genes were identified via Partek gene-specific analysis (GSA) algorithm. Gene lists were filtered at p value  $\leq$  1%; |fold change|  $\geq$  1.5 minReads100. The use of p value instead of adjusted p value is justified by biological meaning and experimental validations (Figure S4C).<sup>22</sup> Biological interpretations of the list of differentially expressed genes were performed with dedicated software (Partek Genomics Suite [v.6.6] and the web-based gene list enrichment analysis tool EnrichR<sup>23,24</sup>). EnrichR analyses were performed on KEGG2016 database and GO biological process 2017b. AmpliSeq data produced in this study have been deposited on NCBI GEO under the accession number GEO: GSE156911.

### Time-lapse imaging of neuronal differentiation

We seeded NSCs at 50,000 cells/cm<sup>2</sup> in PO/LAM-coated 384-well culture plates in N2B27 medium to induce neuronal differentiation. The plates were incubated in an IncuCyte Zoom Live Cell

Imaging System (Essen Bioscience), and phase contrast images were automatically taken under 10× microscopic magnification every 4 h for the first 2 weeks of differentiation and then every 12 h for the next 2 weeks. We extracted and piled up pictures by using the IncuCyte Zoom Software to create the movies.

### W55 rescued (W55R) iPSC line generation

We generated the W55R line by CRISPR-Cas9-mediated knockin to introduce *WFS1* cDNA, under a doxycycline inducible promoter, at the AAVS1 locus.

The homology-directed repair (HDR) donor plasmid was designed on the basis of the plasmid pAAVS1-PDi-CRISPRn (Addgene #73500). The Cas9 cassette was replaced with *WFS1* cDNA of the *WFS1*-pcDNA3 plasmid (Addgene #13011) via Gibson Assembly. The HDR donor plasmid includes homology arms at the 5' and 3' regions immediately flanking the DNA sequence of the AAVS1 locus to specifically direct integration of the vector into the AAVS1 locus. This plasmid is mainly composed of rTA under pCAG promoter, PuroR under control of T2A peptide, and inducible TR3G promoter that allows the expression of *WFS1* with doxycycline treatment.

Prior to transfection, we performed the RNP complex formation by combining SpCas9 protein with the T2 guide RNA sequence 5'-GGGGCCACTAGGGACAGGAT-3' that targets AAVS1 locus (ratio 1/1.2) (Integrated DNA Technologies, IDT).

W55 iPSCs were first transfected with the linearized HDR donor plasmid with Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific). Cells were transfected a second time with the *in vitro* preformed RNP complex with Lipofectamine CRISPRMAX (Thermo Fisher Scientific). The dual transfection has been realized following the manufacturer protocols. After transfection, the iPSCs were collected and plated in StemMACS iPS-Brew XF (Miltenyi Biotec) medium and 200 ng/mL puromycin (Thermo Fisher Scientific). The clones were selected after 1 week of culture.

W55R iPSCs were differentiated into NSCs and neurons. In order to induce the production of wolframin, we treated NSCs with 50 ng/mL doxycycline (Sigma-Aldrich) at each medium change during 10 days. The 50 ng/mL doxycycline treatment was then maintained all along the differentiation into neurons.

### Immunocytochemistry

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde (Electron Microscopy Sciences) for 15 minutes at room temperature. Cells were then placed in a blocking buffer (phosphate-buffered saline, 2% bovine serum albumin, and 0.1% Triton X-100). Primary antibodies were diluted in blocking buffer and applied overnight at 4°C. Secondary antibodies conjugated to Alexa fluorophores (Thermo Fisher Scientific) were diluted at 1:1,000 in blocking buffer and applied for 1 h at room temperature in the dark. We applied Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) diluted at 1:3,000 in the same time to visualize the cell bodies. The cells were visualized on a Zeiss inverted fluorescence microscope and image acquisition was performed with the Zen blue software (Zeiss). When higher resolution was necessary, confocal imaging was performed with a Zeiss LSM880-Airyscan Confocal Microscope driven by the Zeiss Zen black software. The antibodies used are described in [Table S2](#).

### Immunostaining quantifications

Three biologically independent differentiations for each condition were investigated and five images at 20× magnification per each differentiation were quantified. Due to the high number of fibers

on each image, the neurites thickness quantification was approached with a method of unbiased random sampling in ImageJ/FIJI. The method was based on the use of a grid (area per point: 8,000  $\mu\text{m}^2$ ) apposed automatically on the image by the software. A random third of the squares composing the grid were quantified for each image. On each counted square of the grid, neurite thickness was measured manually via the selection tool of imageJ for delimitation of the diameter of each fiber. ImageJ was then asked to measure the corresponding line length (i.e., the fiber thickness). The results for each image were then compiled on a global table to be classified in three arbitrary thickness intervals (0–3  $\mu\text{m}$ , 3–6  $\mu\text{m}$ , >6  $\mu\text{m}$ ). The same data were used for analysis of the mean thickness of the neuronal network for each condition.

To quantify the proportions/percentages of positive cells for each labeling, we used the CellInsight CX7 High-Content Screening (HCS) Platform and the HSC Studio software (Thermo Fisher Scientific). Based on the CX7-Colocalization Bioapplication and the acquisition of images at 10× magnification, a homemade algorithm had allowed the individual detection and quantification of nuclei (Hoechst), HuC/D (green) and CUX2 (red), and finally the calculation of the proportion of each labeling to the total number of cells, as quantitative readouts.

### mRNA extraction and reverse-transcription (RT) PCR

Total RNA samples were isolated with the RNeasy Mini or Micro Plus extraction kit and QIAcube instrument (QIAGEN) according to the manufacturer's protocol. RNA quantification and quality were assessed with the NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) and the ND V33.7.1 software. The cDNA samples were synthesized from 500 ng of RNA with SuperScript III reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific) with a mix of 500 ng/ $\mu\text{L}$  random primers (Thermo Fisher Scientific) and 500 ng/ $\mu\text{L}$  Oligo(dT) (Thermo Fisher Scientific).

### Quantitative PCR (qPCR)

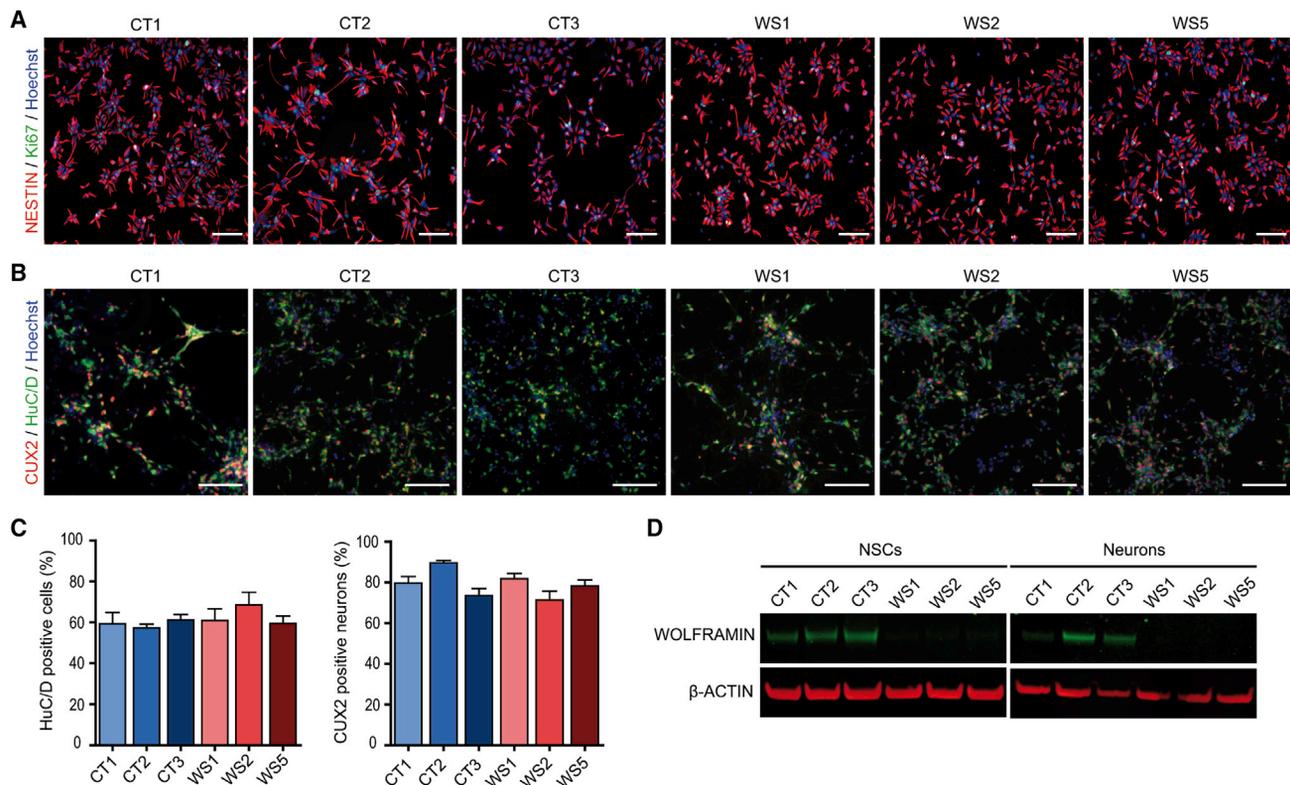
qPCR assays were performed with Luminaris HiGreen qPCR Master Mix, low ROX (Thermo Fisher Scientific) with the QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) with hold stage (50°C for 2 min and 95°C for 10 min) followed by 40 cycles of denaturation (95°C for 15 s) and annealing (60°C for 1 min). Quantification of gene expression was based on the 2- $\Delta\Delta\text{Ct}$  method and normalized to *18S* expression. Primers listed in [Table S3](#) were used for gene expression.

### Thapsigargin treatment

NSCs were seeded at 75,000 cells/ $\text{cm}^2$  on PO/LAM-coated 6-well plates in N2B27 medium supplemented with 10 ng/mL of EGF and FGF-2 and incubated at 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  overnight. The next day, cells were treated with 50 nM of the non-competitive inhibitor of the sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (SERCA) thapsigargin (TG, Sigma-Aldrich). The cells were collected with RLT+ lysis buffer (QIAGEN) after 4 h, 6 h, and 8 h of treatment. For each time point, the control condition of DMSO was collected.

### *XBPI* gel analysis

RNA extraction and RT were performed as described above. For the *XBPI* splicing analysis, a PCR amplification was carried out with 0.05 U/ $\mu\text{L}$  recombinant Taq DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific) and the primers listed in [Table S3](#). The amplification was performed with a first step at 95°C for 5 min followed by 30 cycles of



**Figure 1. WS and CT iPSCs both efficiently generate homogeneous populations of neural stem cells and neurons**

(A) Immunofluorescence microscopy for NESTIN (NSCs marker) and Ki67 (proliferation marker) in NSCs derived from the three control (CT1, CT2, and CT3) and the three WS (WS1, WS2, and WS5) iPSC lines. Scale bars, 100  $\mu$ m.

(B) HuC/D- and CUX2-immunoreactive cortical neurons at days of *in vitro* (DIV) differentiation 14 from NSC stage. Scale bars, 100  $\mu$ m.

(C) Proportion of HuC/D<sup>+</sup>- and CUX2<sup>+</sup>-immunoreactive neurons in cell culture at DIV 14 from NSC stage. Data are presented as mean  $\pm$  SEM (n = 3 biologically independent differentiations. No statistical difference was observed via one-way ANOVA with Dunnett's post hoc test).

(D) Immunoblot of wolframlin in NSCs and neurons at DIV 21.

denaturation (60 s at 95°C), followed by annealing step (30 s at 59°C) and finished by elongation step (30 s at 72°C) in the Eppendorf Mastercycler. The PCR products (spliced *XBPI* [*XBPI*s] and unspliced *XBPI* [*XBPI*u] at 193 pb and 223 pb, respectively) were quantified with the BioAnalyzer 2100 and the Agilent DNA 1000 kit (Agilent) according to the manufacturer's protocol. Spliced *XBPI* expression was normalized to total *XBPI* (*XBPI*s + *XBPI*u).

### Western immunoblotting

Proteins samples were isolated from cell-lysates with radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (Sigma-Aldrich) supplemented with 1% protease inhibitors cocktail (Sigma-Aldrich) and 10% phosphatase inhibitor (Roche). Samples quantification was performed with Pierce BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific) with CLARIOstar Plus instrument (BMG Labtech). The samples were prepared at a concentration of 30  $\mu$ g of proteins and were placed 10 min at 70°C. Proteins were loaded on 4%–12% NuPAGE Bis-Tris gels (Thermo Fisher Scientific) with the Chameleon Duo Pre-stained Protein Ladder (Li-Cor) and migrated during 10 min at 50 mA and 40 min at 100 mA. The gels were then transferred onto nitrocellulose membranes (Thermo Fisher Scientific) via the iBlot 2 Dry Blotting System (Thermo Fisher Scientific). Blots were blocked for 1 h at room temperature in Odyssey Blocking Buffer (Li-Cor) and then incubated with primary antibody in the blocking buffer with 0.2% TWEEN 20 (Sigma-Aldrich) overnight at 4°C. Blots were then incubated with fluorescent second-

ary antibodies (1:10,000, Li-Cor) in the blocking buffer with 0.2% TWEEN 20 (Sigma-Aldrich) in the dark at room temperature for 1 h. The blots were revealed with Odyssey CLx Imaging System (Li-Cor). The antibodies used are described in Table S2.

### Statistical analysis

All data were graphed and analyzed via GraphPad Prism 5 (GraphPad Software). Data shown are the mean  $\pm$  SEM. Student's t tests were used for comparison between two groups. Group differences were analyzed with one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's multiple comparisons test.

### Results

Six human iPSC lines were used in this study: three derived from healthy controls (CT1, CT2, and CT3) and three derived from individuals affected by WS with genetically and clinically identified Wolfram syndrome (WS1, WS2, and WS5). Information on CT and WS iPSCs are summarized in Table S1. All cell lines were validated with classical assays for stemness, pluripotency, and genomic integrity (Figures S1A–S1C). WS-proliferating neural stem cells (NSCs) and post-mitotic neurons showed an absence of wolframlin protein unlike all CT cells (Figure 1 and Figure S1E).

### WS neurons display impaired neurite outgrowth

When CT and WS cell lines were differentiated along the neural lineage, no difference in terms of detection of the NSCs markers, *NESTIN* and *SOX2*, and that of the cortical neurons markers, *HuC/D* and *CUX2*, as well as the total number of cells, was observed between both types of lines (Figures 1A–1C and Figure S1D). In contrast, TUJ1 immunostaining in neurites revealed a striking morphological difference between CT and WS cells. Indeed, CT neurons formed a typical stellate array of thin branching fibers, whereas WS cells exhibited long and large processes (up to several millimeters in length) without apparent branching (Figure 2A and Figures S2A and S2D). Using confocal microscopy, these large processes appeared to be formed by the aggregation of parallel neurites bundled together (Figure 2B). Live-cell imaging revealed that those abnormal neurite figures appeared between days 10 and 14 of neuronal differentiation *in vitro* (DIV), depending on the cell line (Videos S1, S2, S3, and S4). In WS neuronal cultures, neuritic bundles built up progressively while neurites were growing straight through the culture without apparent interaction with cell clusters. Processes grew longer and larger over about a week, after which the neuritic networks remained stable. In addition, the growing tips of some of the neuritic bundles formed unusual U-turns and even full circles (Figure S2B).

As a way to quantify the phenomenon, we measured the thickness of isolated and bundled neurites in CT and WS cultures. Although most of the above-mentioned structures were below 3  $\mu\text{m}$  in size in both CT and WS cells, WS cells exhibited a smaller number of those thin processes than CT. Conversely, the number of neurites bundles were both more abundant and larger in WS cells, reaching up to 58  $\mu\text{m}$  in width while CT neuritic structures did not exceed 12  $\mu\text{m}$ . Consequently, the mean thickness of neuritic structures was higher in WS neurons than in the CT (Figure 2C). To further compare WS and CT cells, we defined three thickness intervals (0–3  $\mu\text{m}$ , 3–6  $\mu\text{m}$ , and >6  $\mu\text{m}$ ) and observed that >90% of the CT neuritic structures ranged in the 0–3  $\mu\text{m}$  interval while this proportion was significantly reduced to about 80% in WS cells (Figure 2D and Figure S2C). Conversely, there was less than 1% neuritic structures per  $\text{mm}^2$  with a thickness >6  $\mu\text{m}$  in CT, whereas this number was up to 10% in WS cells (Figures 2D and 2E and Figure S2C). These results indicate that the absence of wolframín leads to aberrant neurite outgrowth, which in turn could impact on neural functionality.

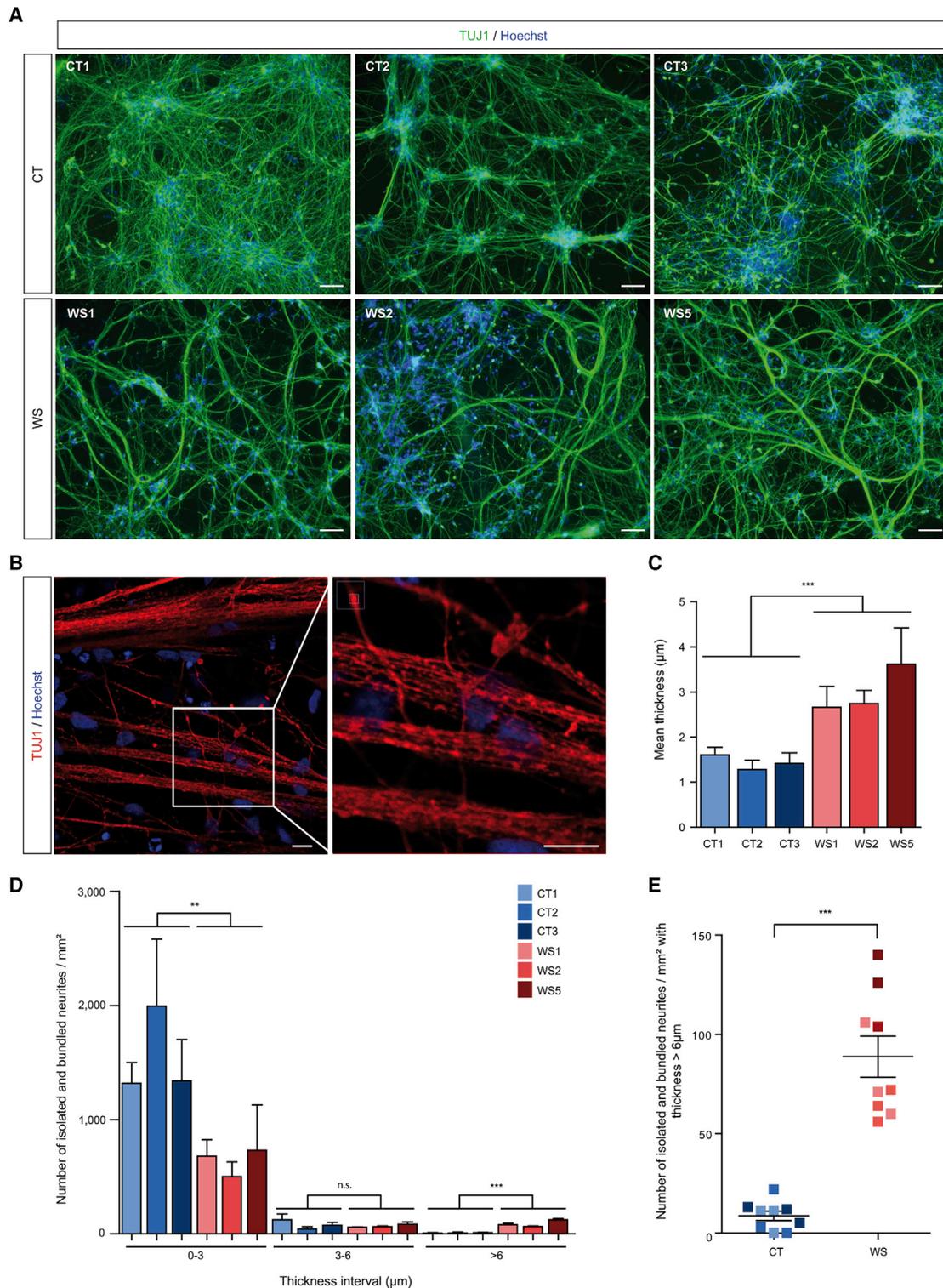
### Restoration of wolframín normalizes neurite outgrowth in WS neurons

To confirm that the absence of wolframín was involved in the neuritic phenotype, we generated a *WFS1*-rescued WS iPSC line by using CRISPR-Cas9 gene-editing to introduce the *WFS1* cDNA under a doxycycline-inducible promoter at the *AAVS1* locus (the WS5 line was used; Figure 3A). Pluripotent characteristics and normal karyotype were

maintained in the rescued iPSC line (WS5R) (Figures S3A and S3B). Successful gene editing was confirmed after 50 ng/mL doxycycline (Dox) treatment as wolframín synthesis was detected in NSCs and neurons (Figure 3B). WS5R cells differentiated similarly to the parental WS5 line into NSCs (Figure S3C). Moreover, expression of *WFS1* upon treatment with 50 ng/mL Dox did not alter the percentage of *HuC/D*<sup>+</sup> and *CUX2*<sup>+</sup> neurons (Figures 3C and 3D), thus indicating that the initial properties of the cell line were not altered by the expression of the transgene. In sharp contrast, Dox-mediated induction of *WFS1* expression changed the neuritic network (Figure 3E), restoring it to what was observed in CT cells. Typical stellate arrays of thin neurites extending between clusters of cells were observed in the Dox-treated cultures. Quantification of isolated and bundled neurites per  $\text{mm}^2$  showed a normalization of the profile that closely resembled CT cultures (Figures 3G and 3H and Figure S3D). We observed similar results for the mean thickness (Figure 3F). As a control, doxycycline treatment in non-engineered WS5 neurons did not affect markers of differentiation and was also ineffective on neuritic outgrowth (Figures S3E–S3G), demonstrating that the normalization of the neuritic network by doxycycline treatment required the presence of the *WFS1* construct.

### WS cells exhibit defects in the expression of genes involved in neurodevelopment and axon guidance

Global gene expression was compared between CT and WS NSCs and neurons. In a principal-component analysis (PCA), the samples clustered on the basis of their phenotype (CT NSCs, WS NSCs, CT neurons, and WS neurons) (Figure 4A). In contrast, the two groups, CT and WS, differed in the number of differentially expressed genes (DEGs) ( $p$  value  $\leq 1\%$ ; fold change  $\geq 1.5$ ; minReads100). There were 493 DEGs for WS compared to CT NSCs (249 upregulated and 244 downregulated) and 254 DEGs for WS neurons in comparison to CT neurons (87 upregulated and 167 downregulated). Among these DEGs, 29 were commonly dysregulated in WS NSCs and neurons (Figure S4A). When DEGs in neurons were mapped to Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways, the most significantly enriched pathway was “axon guidance” (Figure 4B). Functional annotation revealed that the top three significantly enriched gene ontology categories were “neurogenesis,” “nervous system development,” and “axon guidance” (Figure 4B). In WS cells, axon growth and guidance-related genes were either upregulated, such as roundabout-1 (*ROBO1* [MIM: 602430]), or downregulated, such as slit guidance ligand 3 (*SLIT3* [MIM: 603745]), semaphorin 4A (*SEMA4A* [MIM: 607292]), tenascin C (*TNC* [MIM: 187380]), and several ephrins (*EPHs*). DEGs associated with those categories were also downregulated at the NSC state, such as Unc-5 netrin receptor D (*UNC5D* [MIM: 616466]), growth-associated protein 43 (*GAP43* [MIM: 162060]), the ephrin type-B receptor 1 (*EPHB1* [MIM: 600600]), or *TNC* (Figure S4B). Results



### Figure 2. WS neurons display abnormal neurite outgrowth

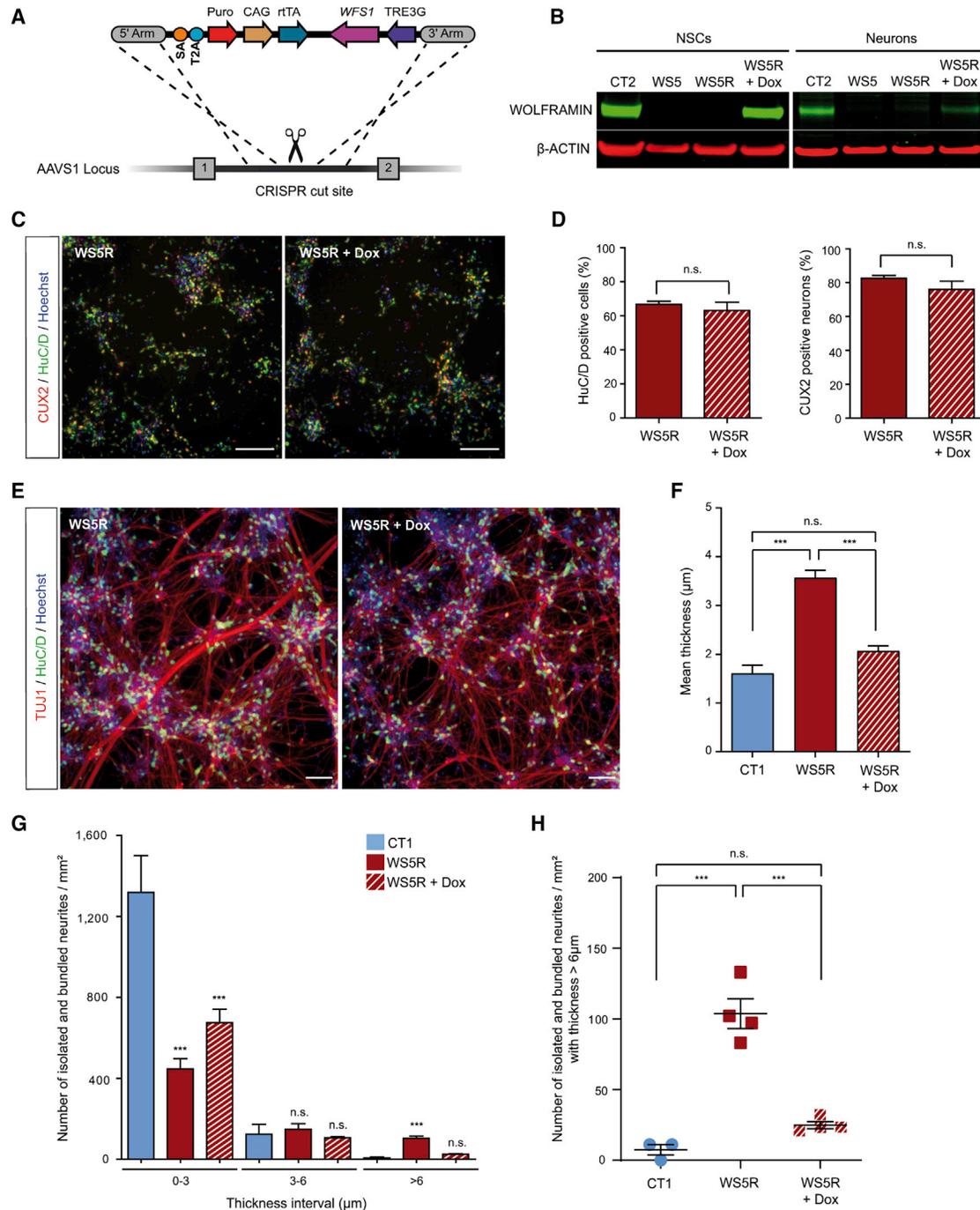
(A) TUJ1-immunoreactive CT and WS neurons at DIV 21. Scale bars, 100  $\mu\text{m}$ .

(B) Confocal analysis of TUJ1-immunoreactive WS5 neurons at DIV 21. Scale bars, 10  $\mu\text{m}$ .

(C) Quantification of the mean thickness of isolated and bundled neurites in CT and WS neurons.

(D) Quantification of the number of isolated and bundled neurites per  $\text{mm}^2$  over three thickness intervals (0–3, 3–6, and >6  $\mu\text{m}$ ) for CT and WS neurons (see [material and methods](#)).

(E) Quantification of the mean number of isolated and bundled neurites for CT and WS neurons in the >6  $\mu\text{m}$  interval of thickness. The color code indicating the different cell lines is common to (C), (D), and (E). All the data are presented as mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$  biologically independent differentiations; \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; Student's  $t$  test).



**Figure 3. *WFS1* cDNA knockin rescues phenotype in WS neurons at DIV 21**

(A) Gene editing strategy with CRISPR-Cas9 technology for insertion at the AAVS1 locus of *WFS1* cDNA under a doxycycline inducible promoter in WS5 iPSC line.

(B) Immunoblot detection of wolfram in rescued WS5 (WS5R) NSCs and neurons with or without doxycycline (Dox) treatment and in CT2.

(C) HuC/D and CUX2 immunostaining of WS5R neurons treated or not with Dox. Scale bars, 100  $\mu$ m.

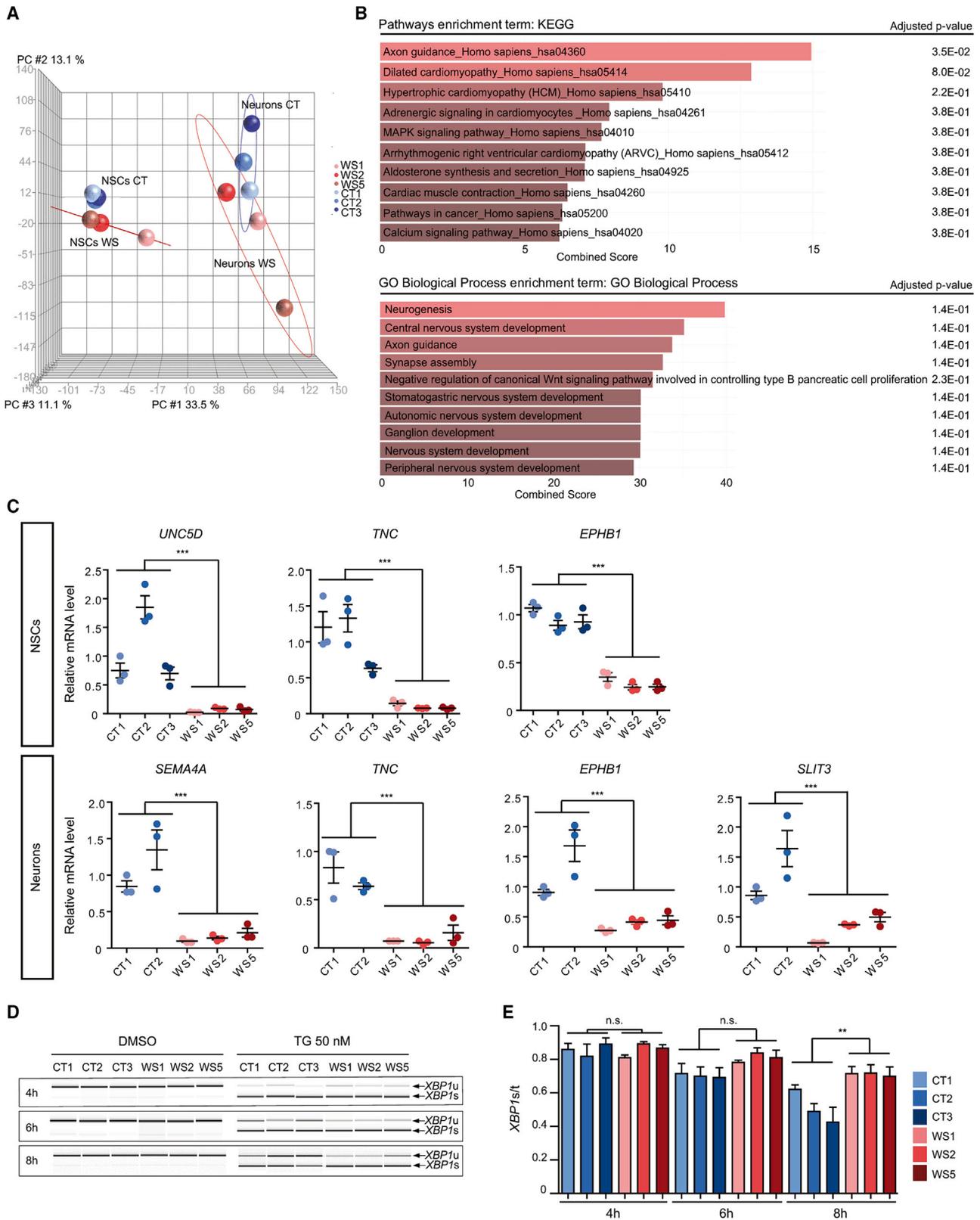
(D) Proportion of HuC/D<sup>+</sup> and CUX2<sup>+</sup>-immunoreactive cells in WS5R neurons treated or not with Dox. Data are presented as mean  $\pm$  SEM (n = 3 biologically independent differentiations; Student's t test).

(E) TUJ1- and HuC/D-immunoreactive WS5R neurons treated or not with Dox. Scale bars, 100  $\mu$ m.

(F) Quantification of the mean thickness of isolated and bundled neurites for WS5R neurons treated or not with Dox compared to CT1.

(G) Quantification of the number of isolated and bundled neurites per  $\text{mm}^2$  for three thickness intervals (0–3, 3–6, and >6  $\mu$ m) in neurons.

(H) Analysis of the number of isolated and bundled neurites per  $\text{mm}^2$  for the >6  $\mu$ m interval in WS5R neurons treated or not with Dox compared to CT1. For (F), (G), and (H), data are expressed relative to that of CT1 cells and presented as mean  $\pm$  SEM (n = 3 for CT1 and n = 4 for WS5R and WS5R + Dox biologically independent differentiations; \*\*\*p < 0.001; one-way ANOVA with Dunnett's post hoc test, data are compared to CT1 cells).



**Figure 4. Global gene expression comparison between CT and WS NCSs and neurons**

(A and B) Transcriptome analysis with AmpliSeq. (A) Principal-component analysis (PCA) between CT and WS NCSs and neurons. (B) KEGG pathways (upper panel) and gene ontology (lower panel) enrichment analysis in neurons via Enrichr tool.

(C) Quantitative RT-PCR analysis of DEGs mRNA levels in CT and WS NCSs and neurons. Data are expressed relative to that of CT1 cells and normalized to *18S* rRNA expression. Data are presented as mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$  biologically independent differentiations; \*\*\* $p < 0.001$ ; Student's *t* test).

(legend continued on next page)

were confirmed for a set of genes by qRT-PCR (Figure 4C). Altogether, these data suggest that a neurite outgrowth program is deregulated in WS neurons.

Taking into account the literature that associates degeneration processes in Wolfram with the activation of the unfolded protein response (UPR),<sup>11</sup> we specifically analyzed the expression of selected UPR target genes. Under basal (and vehicle) condition, no difference between CT and WS NSCs was detected (Figures S4C and S4D). In contrast, activation of the ER stress response by treating the cells with 50 nM thapsigargin (TG) revealed a slower return to baseline of the splicing of X-box-binding protein 1 (*XBP1* [MIM: 194355]) mRNA in WS than in CT, indicating that WS cells could be more sensitive to ER stress (Figures 4D and 4E). These results suggest that UPR signaling might be affected in WS cells and may lead to chronic and low intensity signaling alterations resulting in turn into pathological phenotypes.

### Pharmacological rescue of WS neurons and potential mechanisms of action

To test the latter hypothesis, we sought to investigate how the three branches of the UPR could contribute to the identified neuritic phenotype by using selective pharmacological inhibitors. With this approach, neither IRE1 $\alpha$  inhibition (via MKC-8866) nor alteration of the integrated stress response (ISR, via salubrinal) elicited any change of the abnormal neuritic network of WS cells (Figures 5A–5F and Figures S5A–S5G). In contrast, inhibition of the ATF6 $\alpha$  branch of the UPR with 10  $\mu$ M ceapin-A7 rescued neurite formation by WS cells during neuronal differentiation. Ceapin-A7-treated WS cell cultures showed neuritic networks that closely resembled CT cultures in terms both of the number of neuritic structures in the interval superior to 6  $\mu$ m of thickness (Figures 5G–5I and Figures S5H–S5J) and of the mean thickness ( $2.162 \pm 0.256 \mu$ m for NT versus  $1.265 \pm 0.177 \mu$ m for ceapin-A7). These results suggest the existence of non-conventional (non-acute) signaling ATF6 mechanisms in WS cells that may lead to aberrant neuritic structures and that are blunted by ceapin-A7.

### Valproic acid treatment has positive effects on neurite outgrowth and axon guidance genes in WS neurons

In the same line of thought, the effects of various drugs that are currently being tested in individuals with WS or under preclinical study, namely the calcium modulator dantrolene, the GLP1 agonist liraglutide, and the HDAC inhibitors 4-phenylbutyric acid (4PBA) and valproic acid (VPA, also described as an ER stress signaling attenuator), were evaluated on the pathological neurite outgrowth phenotype. Neuraminidase (NM) was used as a control because this enzyme reduces non-specific adhesion between neu-

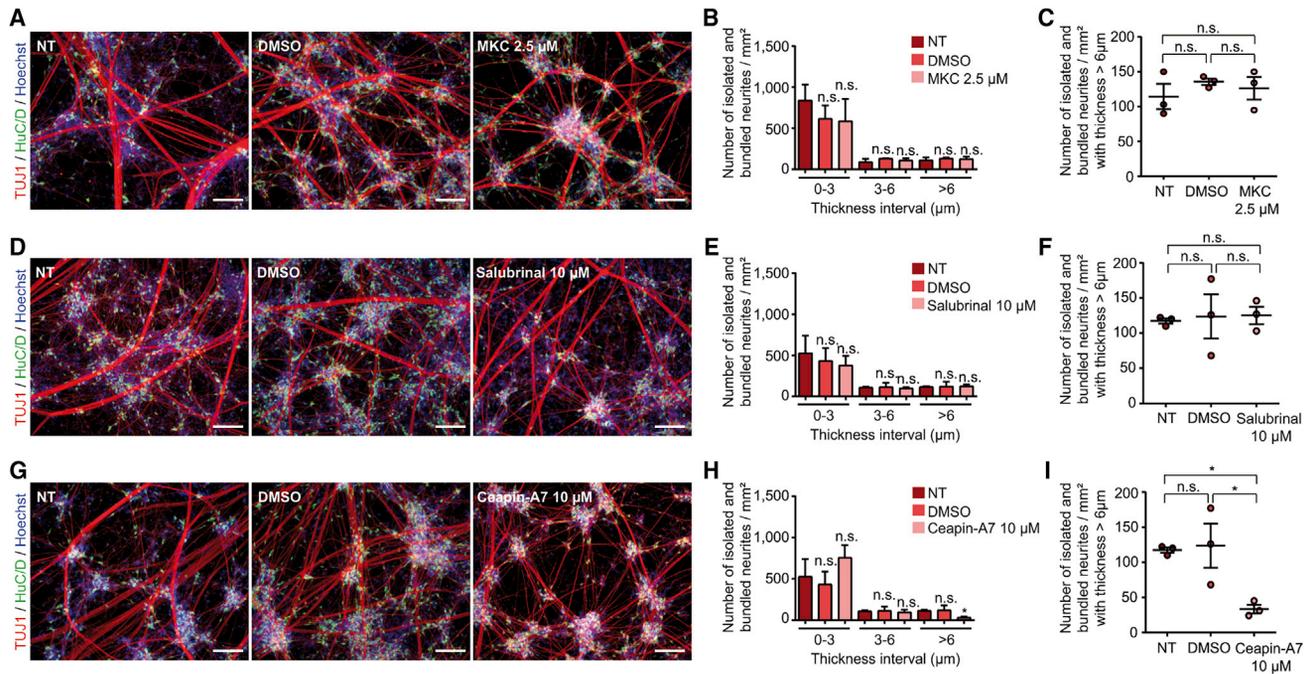
rites. Accordingly, 10 mU NM prevented the formation of fascicles in WS neurons when applied at the beginning of the post-mitotic neuronal differentiation (Figure 6A). NM had no effect on global genes expression. There was no difference in neurite outgrowth defects between treated and non-treated WS cell cultures when using either 100 nM liraglutide, 1 mM 4PBA, or 10  $\mu$ M dantrolene (Figure S6A). In contrast, 1.5 mM VPA-treated WS cells demonstrated a change in the abnormal neuritic phenotype, displaying a profile comparable to those of NM-treated WS neurons (Figure 6A). WS neurons treated with that dose showed a neuritic network similar to CT neurons in terms both of isolated and bundled fibers (Figures 6B–6D and Figure S6B). In parallel, VPA increased the expression of *SLIT3*, *TNC*, and *EPHB1*, three of the axon guidance genes that are downregulated in WS cells (Figure 6E). VPA had no impact on either the number of cells or the proportion of HuC/D<sup>+</sup> neurons in the cultures, precluding a toxic effect (Figures S6C and S6D). In contrast, attempts at correcting the pathological phenotype after it was installed by starting the VPA treatment at DIV 18 were ineffective. As a search for additional clues concerning molecular mechanisms, VPA was tested for a protective effect on the prolonged thapsigargin-induced ER stress response observed in WS NSCs. There was no protection elicited by this drug. Valproic acid thus demonstrated a preventive effect on the neurite outgrowth abnormality observed in WS neurons, the mechanism of which is unrelated to a protection against an abnormal ER stress response.

### Discussion

The main result of the present study is the demonstration that human iPSC-derived neurons with Wolfram syndrome-associated mutations display phenotypic and molecular neurodevelopmental defects. This reveals as an alteration of the neuritic outgrowth and axonal pathfinding, together with abnormally extensive fasciculation in culture. Changes in gene expression concerned a set of genes involved in neurodevelopment and axonal pathfinding. It may be speculated that these pathological alterations participate to the reduction of brain volume in individuals affected by WS. Although the expression of genes encoding proteins involved in the acute response to UPR was not altered, WS cells appeared more sensitive to ER stress. Among the currently explored therapeutic candidates, only valproic acid demonstrated an ability to alleviate some of the observed neurodevelopmental defects in WS neurons.

The results of our study shed some light on a series of clinical results that appeared up to now paradoxical. Indeed, progressive neurodegenerative alterations pertaining to Wolfram syndrome, which affect several neurosensory

(D and E) ER stress induction in CT and WS NSCs after 4, 6, and 8 h of 50 nM thapsigargin (TG) treatment. (D) Analysis of the expression of spliced (*XBP1s*) and unspliced (*XBP1u*) *XBP1*. (E) Quantification of *XBP1s* expression normalized to total *XBP1* (*XBP1t*). Data are presented as mean  $\pm$  SEM (n = 3 biologically independent experiments; \*p < 0.05; one-way ANOVA with Dunnett's post hoc test).

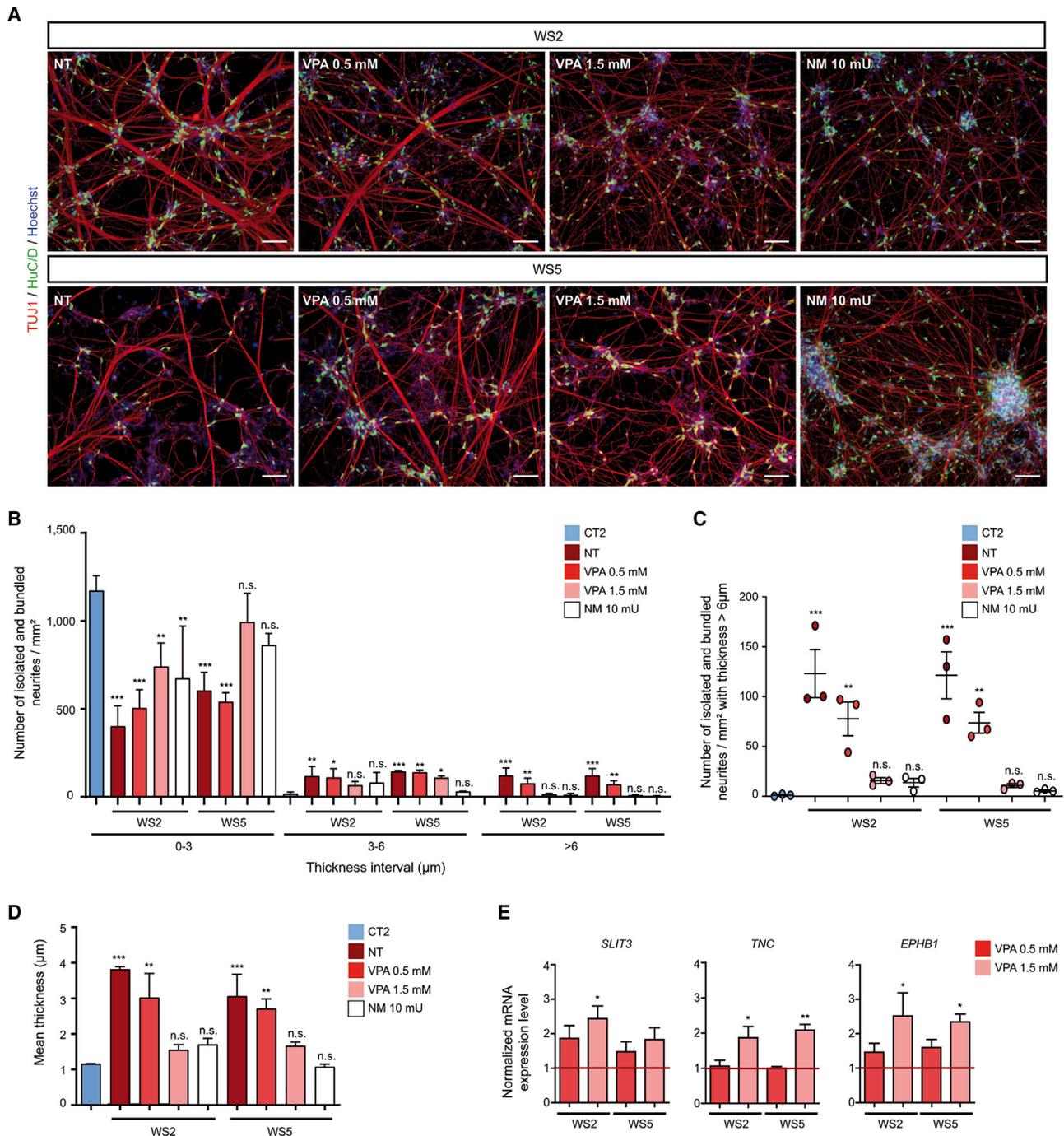


**Figure 5. Effect of the inhibition of each of the three branches of UPR pathways on the neurite outgrowth defect in W55 neurons** (A, B, and C) Inhibition of IRE1 $\alpha$  pathway with 2.5  $\mu$ M MKC-8866 (MKC). (A) TUJ1 and HuC/D immunostaining of W55 neurons at DIV 18 after MKC or control DMSO treatments. Scale bars, 100  $\mu$ m. (B) Quantification of the number of isolated and bundled neurites per mm<sup>2</sup> for three thickness intervals (0–3, 3–6, and >6  $\mu$ m) in W55 neurons treated or not with MKC or control DMSO. (C) Quantification of the number of isolated and bundled neurites for the >6  $\mu$ m interval in W55 neurons treated or not with MKC or control DMSO. (D, E, and F) Same representation for the inhibition of integrated stress response with 10  $\mu$ M salubrinal. (G, H, and I) Same representation for the inhibition of ATF6 pathway with 10  $\mu$ M ceapin-A7. For all analyses, data are presented as mean  $\pm$  SEM (n = 3 biologically independent differentiations; \*p < 0.05; one-way ANOVA with Dunnett’s post hoc test, data are compared to non-treated cells [NTs]).

pathways,<sup>2,7,25</sup> the brainstem, and cerebellum,<sup>5,26</sup> appear only several years after birth (in childhood and adolescence) and progress over time. However, these phenomena, which have dramatic clinical correlates, are preceded by an overall decrease in brain volume, both in gray and white matters, as recently demonstrated by a series of MRI studies.<sup>3,4</sup> These alterations were observed very early on in life and did not evolve with age, suggesting a neurodevelopmental defect previously ignored because it is clinically silent.<sup>12</sup> Consistent with that observation, neurodevelopmental brain alterations were also observed in animal models of the disease.<sup>27–29</sup> Our *in vitro* cell culture results may well provide a mechanistic basis for those early neurodevelopmental alterations. Indeed, a proportion of WS neurons exhibited neurite outgrowth abnormalities that may make them unsuitable for elaborating normal sets of connections, ultimately being consequential for neuronal survival.<sup>30</sup> Thick bundled neurites displayed trajectories that were not similar to those observed in CT cell cultures, extending over very long distances without apparent attraction toward cell bodies and forming curves or even full loops. Time-lapse imaging revealed a concomitant alteration of guiding cues at the tip of the bundled neurites. These phenotypic changes were coherently associated with a prevalent dysregulation of a set of genes that belong to the “axon guidance” subset. Among the most dysregulated genes were *SLIT3*, *SEMA4A*,

*UNC5D5*, *TNC*, *GAP43*, *ROBO1*, and several *EPHRINS* that all encode proteins that are necessary for axonal pathfinding and whose defect is associated with major neurodevelopmental abnormalities.<sup>31,32</sup> Different studies have described a potential link between axonal pathfinding defects and reduced brain volume both in murine models and in persons.<sup>33–36</sup> The precise mechanisms by which the dysregulation of the expression of those genes may lead to reduced brain volumes in individuals with Wolfram syndrome remain however to be fully established.

Most of the dysregulated genes that are referred to above are encoding proteins either located at the plasma membrane or exerting their functions extracellularly. As such, they require functional biogenesis pathways, which encompass the secretory pathway. Interestingly, wolframin has been shown to act as a regulator of the ER homeostasis master regulator, namely the unfolded protein response, and pathological mechanisms associated to Wolfram syndrome have been largely ascribed to a defective control of those processes due to the loss of wolframin.<sup>10</sup> In our model, there was no difference between the expression at baseline of any of the acute ER stress markers in neural cells derived from either CT or WS iPSC lines, in contrast to what has been reported for pancreatic  $\beta$  cells.<sup>17,37</sup> It is only when ER stress was elicited by thapsigargin that WS NSCs demonstrated a prolonged



**Figure 6. Valproic acid (VPA) treatment prevents abnormal neurite outgrowth in WS neurons**

(A) TUJ1 and HuC/D immunostaining of WS2 and WS5 neurons at DIV 18 without (NT) or after 0.5 or 1.5 mM VPA or 10 mU neuraminidase (NM) treatment. Scale bars, 100  $\mu$ m.

(B) Quantification of the number of isolated and bundled neurites per  $\text{mm}^2$  for three thickness intervals (0–3, 3–6, and >6  $\mu$ m) in WS2 and WS5 neurons treated or not with 0.5 or 1.5 mM VPA or 10 mU NM.

(C) Quantification of the number of isolated and bundled neurites for the >6  $\mu$ m interval in WS2 and WS5 neurons treated or not with 0.5 or 1.5 mM VPA or 10 mU NM.

(D) Quantification of the mean thickness of isolated and bundled neurites for WS2 and WS5 neurons treated or not with 0.5 or 1.5 mM VPA or 10 mU NM. For (B), (C), and (D), data are expressed relative to that of CT2 cells.

(E) Quantitative RT-PCR analysis of *SLIT3*, *TNC*, and *EPHB1* transcript levels in WS2 and WS5 neurons treated with 0.5 or 1.5 mM VPA. Data are expressed relative to that of non-treated cells (NTs) and normalized to *18S* rRNA expression. For all analyses, data are presented as mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$  biologically independent differentiations; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ; one-way ANOVA with Dunnett's post hoc test, data are compared to CT2 cells).

activation of *XBPI* mRNA splicing as compared to CT, thus indicative of a reduced ability of those cells to cope with prolonged ER stress. These results suggest that, even though under basal conditions canonical ER stress markers are not detected, ER homeostasis appears to be affected in WS neural cells. This hypothesis was confirmed when the WS-associated phenotype was blunted upon treatment with ceapin-A7, an ATF6 inhibitor.<sup>38</sup> Since wolframin was shown to inhibit ATF6 activation,<sup>10</sup> our results suggest that neurite development may be impacted on by a constitutive/chronic activation of ATF6 in WS cells that may lead to an alteration of both ER homeostasis and capacity to handle stress in those cells.

The observation of a clear pathological phenotype associated to altered gene expression markers in neural cells *in vitro* prompted us to analyze the potential therapeutic effects of drugs that are currently under preclinical or clinical study. The landscape of assayed treatments for Wolfram syndrome is, indeed, particularly rich, promoted by the observation of a number of potentially treatable functional defects.<sup>1,39</sup> The demonstrated loss of calcium cell homeostasis<sup>40,41</sup> has thus led to a clinical trial based upon the ER calcium stabilizer dantrolene (NCT02829268). In parallel, the nonselective histone deacetylase inhibitor valproic acid (VPA) is currently tested in clinical trial (NCT03717909) after being shown to reverse the defective production of P21<sup>ciP</sup> in *WFS1* knockout cells.<sup>42</sup> Other drugs under preclinical study include GLP1-agonists such as liraglutide, which showed neuroprotective in Wolfram cell models in addition to its expected effect on insulin secretion,<sup>43,44</sup> and the chemical chaperone with antioxidant activity 4-PBA.<sup>39</sup> In our model, only VPA demonstrated a dose-dependent preventive action on the aberrant neurite outgrowth, and this was associated with the normalization of the expression of genes encoding axon guidance proteins. VPA has been shown to reduce ER stress,<sup>45</sup> and this may participate to its positive effects on WS neurons. Alternatively, one may hypothesize a less-specific effect because VPA is a very potent non-specific histone deacetylase inhibitor that impacts well over one thousand genes in neural cells *in vitro*.<sup>46</sup> As a pleiotropic neuroactive drug, it is known to exert neuroprotective effects in a wide array of models of neurodegenerative diseases, including amyotrophic lateral sclerosis,<sup>47</sup> Parkinson disease,<sup>48</sup> or spinal cord injury.<sup>49</sup> Of particular interest for the interpretation of our data are the results of two studies that explored the promotion of neurite outgrowth by VPA in two models of neural defects due to different CMT mutations, Rab7 in CMT2B<sup>50</sup> and AARS in CMT2N.<sup>51</sup> The fact that VPA appeared to promote neurite outgrowth in similar fashion in pathological models based on different gene mutations strongly suggests that those drug effects were not specific to a discrete pathological mechanism. Nevertheless, our data support the hypothesis that VPA may help alleviate some symptoms in individuals with Wolfram syndrome, which is currently tried in the clinic.

Whether the identified neurodevelopmental defects in axonal pathfinding may be associated after years with the observed neurodegenerative phenomena or whether neurodevelopmental and neurodegenerative processes are due to independent pathological mechanisms is at this stage but a matter of speculation. It is worth mentioning, however, that a link between such differentially timed defects has been hypothesized by several authors over the past 10 years for other late-appearing neurodegenerative diseases. In a seminal review, Lin and co-workers<sup>52</sup> underlined the fact that genome-wide analyses for Parkinson disease revealed that single-nucleotide polymorphisms in axon-guidance genes were predictive of different Parkinson disease outcomes. This was further extended to other neurodegenerative diseases<sup>53</sup> and, in particular, impaired axonal sprouting was hypothetically associated to dysregulation of axon guidance proteins in amyotrophic lateral sclerosis. Axonal pathfinding is fundamental for the establishment of proper connectivity and functionality of neurons in the adult central nervous system. It has been proposed that dysregulation of developmental processes requiring axon guidance may be compensated to a certain point in time but later lead to degeneration.<sup>52–55</sup> Conversely, subtle defects in proteins that play a role not only during neurodevelopment but also in adult neuroplasticity may contribute to delayed neurodegeneration.

#### Data and code availability

The transcriptomic datasets generated during this study are available at NCBI GEO under the accession number GEO: GSE156911 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE156911>).

#### Supplemental information

Supplemental information can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2021.10.001>.

#### Acknowledgments

I-Stem is part of the Biotherapies Institute for Rare Diseases (BIRD) supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM-Téléthon). This project was also supported by grants from Association Syndrome de Wolfram, Association Nationale de la Recherche et de la Technologie, and Agence Nationale pour la Recherche: NeurATRIS ANR-11-INBS-0011 and Labex REVIVE ANR-10-LABX-73. M.-G.B.-M. was supported by the program “investissement d’avenir” INGESTEM. We thank Yolande Masson and Lina El Kassar for karyotyping the cell lines and Alexandre Carteron for the technical support with the AmpliSeq experiments. We thank Cécile Delettre and the late Christian Hamel (Institut des Neurosciences de Montpellier) for the gift of the WS5 fibroblasts and the New York Stem Cell Foundation for WS1 and WS2 iPSC lines. We thank Ole Isacson (Harvard Medical School) for advice and reading the manuscript and Nathalie Holic for advice with genome editing. We gratefully acknowledge support from the PSMN (Pôle Scientifique de Modélisation Numérique) of the ENS de Lyon for computing resources.

## Declaration of interests

The authors declare no competing interests.

Received: May 20, 2021

Accepted: September 30, 2021

Published: October 25, 2021

## Web resources

OMIM, <https://omim.org/>

## References

1. Pallotta, M.T., Tascini, G., Crispoldi, R., Orabona, C., Mondanelli, G., Grohmann, U., and Esposito, S. (2019). Wolfram syndrome, a rare neurodegenerative disease: from pathogenesis to future treatment perspectives. *J. Transl. Med.* *17*, 238.
2. Hershey, T., Lugar, H.M., Shimony, J.S., Rutlin, J., Koller, J.M., Perantie, D.C., Paciorkowski, A.R., Eisenstein, S.A., Permutt, M.A.; and Washington University Wolfram Study Group (2012). Early brain vulnerability in Wolfram syndrome. *PLoS ONE* *7*, e40604.
3. Lugar, H.M., Koller, J.M., Rutlin, J., Marshall, B.A., Kanekura, K., Urano, F., Bischoff, A.N., Shimony, J.S., Hershey, T.; and Washington University Wolfram Syndrome Research Study Group (2016). Neuroimaging evidence of deficient axon myelination in Wolfram syndrome. *Sci. Rep.* *6*, 21167.
4. Lugar, H.M., Koller, J.M., Rutlin, J., Eisenstein, S.A., Neyman, O., Narayanan, A., Chen, L., Shimony, J.S., and Hershey, T. (2019). Evidence for altered neurodevelopment and neurodegeneration in Wolfram syndrome using longitudinal morphometry. *Sci. Rep.* *9*, 6010.
5. Shannon, P., Becker, L., and Deck, J. (1999). Evidence of widespread axonal pathology in Wolfram syndrome. *Acta Neuropathol.* *98*, 304–308.
6. Chaussenot, A., Bannwarth, S., Rouzier, C., Vialettes, B., Mka-dem, S.A., Chabrol, B., Cano, A., Labauge, P., and Paquis-Flucklinger, V. (2011). Neurologic features and genotype-phenotype correlation in Wolfram syndrome. *Ann. Neurol.* *69*, 501–508.
7. Barrett, T.G., Bunday, S.E., and Macleod, A.F. (1995). Neurodegeneration and diabetes: UK nationwide study of Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *Lancet* *346*, 1458–1463.
8. Rohayem, J., Ehlers, C., Wiedemann, B., Holl, R., Oexle, K., Kordonouri, O., Salzano, G., Meissner, T., Burger, W., Schober, E., et al. (2011). Diabetes and neurodegeneration in Wolfram syndrome: a multicenter study of phenotype and genotype. *Diabetes Care* *34*, 1503–1510.
9. Takeda, K., Inoue, H., Tanizawa, Y., Matsuzaki, Y., Oba, J., Watanabe, Y., Shinoda, K., and Oka, Y. (2001). WFS1 (Wolfram syndrome 1) gene product: predominant subcellular localization to endoplasmic reticulum in cultured cells and neuronal expression in rat brain. *Hum. Mol. Genet.* *10*, 477–484.
10. Fonseca, S.G., Ishigaki, S., Osowski, C.M., Lu, S., Lipson, K.L., Ghosh, R., Hayashi, E., Ishihara, H., Oka, Y., Permutt, M.A., and Urano, F. (2010). Wolfram syndrome 1 gene negatively regulates ER stress signaling in rodent and human cells. *J. Clin. Invest.* *120*, 744–755.
11. Fonseca, S.G., Fukuma, M., Lipson, K.L., Nguyen, L.X., Allen, J.R., Oka, Y., and Urano, F. (2005). WFS1 is a novel component of the unfolded protein response and maintains homeostasis of the endoplasmic reticulum in pancreatic beta-cells. *J. Biol. Chem.* *280*, 39609–39615.
12. Samara, A., Rahn, R., Neyman, O., Park, K.Y., Samara, A., Marshall, B., Dougherty, J., and Hershey, T. (2019). Developmental hypomyelination in Wolfram syndrome: new insights from neuroimaging and gene expression analyses. *Orphanet J. Rare Dis.* *14*, 279.
13. Chambers, S.M., Fasano, C.A., Papapetrou, E.P., Tomishima, M., Sadelain, M., and Studer, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPSC cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat. Biotechnol.* *27*, 275–280.
14. Boissart, C., Nissan, X., Giraud-Triboulet, K., Peschanski, M., and Benchoua, A. (2012). miR-125 potentiates early neural specification of human embryonic stem cells. *Development* *139*, 1247–1257.
15. Boissart, C., Poulet, A., Georges, P., Darville, H., Julita, E., De-lorme, R., Bourgeron, T., Peschanski, M., and Benchoua, A. (2013). Differentiation from human pluripotent stem cells of cortical neurons of the superficial layers amenable to psychiatric disease modeling and high-throughput drug screening. *Transl. Psychiatry* *3*, e294.
16. Darville, H., Poulet, A., Rodet-Amsellem, F., Chatrousse, L., Pernelle, J., Boissart, C., Héron, D., Nava, C., Perrier, A., Jarrige, M., et al. (2016). Human Pluripotent Stem Cell-derived Cortical Neurons for High Throughput Medication Screening in Autism: A Proof of Concept Study in SHANK3 Haploinsufficiency Syndrome. *EBioMedicine* *9*, 293–305.
17. Shang, L., Hua, H., Foo, K., Martinez, H., Watanabe, K., Zimmer, M., Kahler, D.J., Freeby, M., Chung, W., LeDuc, C., et al. (2014).  $\beta$ -cell dysfunction due to increased ER stress in a stem cell model of Wolfram syndrome. *Diabetes* *63*, 923–933.
18. Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I.I., and Thomson, J.A. (2009). Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* *324*, 797–801.
19. Hetz, C., Axten, J.M., and Patterson, J.B. (2019). Pharmacological targeting of the unfolded protein response for disease intervention. *Nat. Chem. Biol.* *15*, 764–775.
20. Wakade, C.G., Mehta, S.H., Maeda, M., Webb, R.C., and Chiu, E.C. (2013). Axonal fasciculation and the role of polysialic acid-neural cell adhesion molecule in rat cortical neurons. *J. Neurosci. Res.* *91*, 1408–1418.
21. Li, W., Turner, A., Aggarwal, P., Matter, A., Storvick, E., Arnett, D.K., and Broeckel, U. (2015). Comprehensive evaluation of AmpliSeq transcriptome, a novel targeted whole transcriptome RNA sequencing methodology for global gene expression analysis. *BMC Genomics* *16*, 1069.
22. Amrhein, V., Greenland, S., and McShane, B. (2019). Scientists rise up against statistical significance. *Nature* *567*, 305–307.
23. Chen, E.Y., Tan, C.M., Kou, Y., Duan, Q., Wang, Z., Meirelles, G.V., Clark, N.R., and Ma'ayan, A. (2013). Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics* *14*, 128.
24. Kuleshov, M.V., Jones, M.R., Rouillard, A.D., Fernandez, N.F., Duan, Q., Wang, Z., Koplev, S., Jenkins, S.L., Jagodnik, K.M., Lachmann, A., et al. (2016). Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Res.* *44* (W1), W90–7.
25. Carson, M.J., Slager, U.T., and Steinberg, R.M. (1977). Simultaneous occurrence of diabetes mellitus, diabetes insipidus, and optic atrophy in a brother and sister. *Am. J. Dis. Child.* *131*, 1382–1385.

26. Scolding, N.J., Kellar-Wood, H.F., Shaw, C., Shneerson, J.M., and Antoun, N. (1996). Wolfram syndrome: hereditary diabetes mellitus with brainstem and optic atrophy. *Ann. Neurol.* *39*, 352–360.
27. Cagalinec, M., Liiv, M., Hodurova, Z., Hickey, M.A., Vaarmann, A., Mandel, M., Zeb, A., Choubey, V., Kuum, M., Safiulina, D., et al. (2016). Role of Mitochondrial Dynamics in Neuronal Development: Mechanism for Wolfram Syndrome. *PLoS Biol.* *14*, e1002511.
28. Plaas, M., Seppa, K., Reimets, R., Jagomäe, T., Toots, M., Koppel, T., Vallisoo, T., Nigul, M., Heinla, I., Meier, R., et al. (2017). *Wfs1*-deficient rats develop primary symptoms of Wolfram syndrome: insulin-dependent diabetes, optic nerve atrophy and medullary degeneration. *Sci. Rep.* *7*, 10220.
29. Sakakibara, Y., Sekiya, M., Fujisaki, N., Quan, X., and Iijima, K.M. (2018). Knockdown of *wfs1*, a fly homolog of Wolfram syndrome 1, in the nervous system increases susceptibility to age- and stress-induced neuronal dysfunction and degeneration in *Drosophila*. *PLoS Genet.* *14*, e1007196.
30. Zweifel, L.S., Kuruvilla, R., and Ginty, D.D. (2005). Functions and mechanisms of retrograde neurotrophin signalling. *Nat. Rev. Neurosci.* *6*, 615–625.
31. Wang, L., and Marquardt, T. (2013). What axons tell each other: axon-axon signaling in nerve and circuit assembly. *Curr. Opin. Neurobiol.* *23*, 974–982.
32. Roig-Puigros, S., Vigouroux, R.J., Beckman, D., Bocai, N.I., Chiou, B., Davimes, J., Gomez, G., Grassi, S., Hoque, A., Karikari, T.K., et al. (2020). Construction and reconstruction of brain circuits: normal and pathological axon guidance. *J. Neurochem.* *153*, 10–32.
33. Engle, E.C. (2010). Human genetic disorders of axon guidance. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *2*, a001784.
34. Hibar, D.P., Stein, J.L., Jahanshad, N., Kohannim, O., Hua, X., Toga, A.W., McMahon, K.L., de Zubicaray, G.I., Martin, N.G., Wright, M.J., et al. (2015). Genome-wide interaction analysis reveals replicated epistatic effects on brain structure. *Neurobiol. Aging* *36* (Suppl 1), S151–S158.
35. Vosberg, D.E., Zhang, Y., Menegaux, A., Chalupa, A., Manitt, C., Zehntner, S., Eng, C., DeDuck, K., Allard, D., Durand, F., et al. (2018). Mesocorticolimbic Connectivity and Volumetric Alterations in *DCC* Mutation Carriers. *J. Neurosci.* *38*, 4655–4665.
36. Deloulme, J.C., Gory-Fauré, S., Mauconduit, F., Chauvet, S., Jonckheere, J., Boulan, B., Mire, E., Xue, J., Jany, M., Maucler, C., et al. (2015). Microtubule-associated protein 6 mediates neuronal connectivity through Semaphorin 3E-dependent signalling for axonal growth. *Nat. Commun.* *6*, 7246.
37. Urano, F. (2014). Wolfram syndrome iPSC cells: the first human cell model of endoplasmic reticulum disease. *Diabetes* *63*, 844–846.
38. Gallagher, C.M., and Walter, P. (2016). Ceapins inhibit ATF6 $\alpha$  signaling by selectively preventing transport of ATF6 $\alpha$  to the Golgi apparatus during ER stress. *eLife* *5*, e11880.
39. Abreu, D., and Urano, F. (2019). Current Landscape of Treatments for Wolfram Syndrome. *Trends Pharmacol. Sci.* *40*, 711–714.
40. Lu, S., Kanekura, K., Hara, T., Mahadevan, J., Spears, L.D., Osowski, C.M., Martinez, R., Yamazaki-Inoue, M., Toyoda, M., Neilson, A., et al. (2014). A calcium-dependent protease as a potential therapeutic target for Wolfram syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *111*, E5292–E5301.
41. Cagalinec, M., Zahradníková, A., Zahradníková, A., Jr., Kováčová, D., Paulis, L., Kureková, S., Hot'ka, M., Pavelková, J., Plaas, M., Novotová, M., and Zahradník, I. (2019). Calcium Signaling and Contractility in Cardiac Myocyte of Wolframin Deficient Rats. *Front. Physiol.* *10*, 172.
42. Gharanei, S., Zatyka, M., Astuti, D., Fenton, J., Sik, A., Nagy, Z., and Barrett, T.G. (2013). Vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase V1A subunit is a molecular partner of Wolfram syndrome 1 (WFS1) protein, which regulates its expression and stability. *Hum. Mol. Genet.* *22*, 203–217.
43. Kondo, M., Tanabe, K., Amo-Shiinoki, K., Hatanaka, M., Morii, T., Takahashi, H., Seino, S., Yamada, Y., and Tanizawa, Y. (2018). Activation of GLP-1 receptor signalling alleviates cellular stresses and improves beta cell function in a mouse model of Wolfram syndrome. *Diabetologia* *61*, 2189–2201.
44. Seppa, K., Toots, M., Reimets, R., Jagomäe, T., Koppel, T., Palase, M., Hasselholt, S., Krogsbæk Mikkelsen, M., Randel Nyengaard, J., Vasar, E., et al. (2019). GLP-1 receptor agonist liraglutide has a neuroprotective effect on an aged rat model of Wolfram syndrome. *Sci. Rep.* *9*, 15742.
45. Li, Z., Wu, F., Zhang, X., Chai, Y., Chen, D., Yang, Y., Xu, K., Yin, J., Li, R., Shi, H., et al. (2017). Valproate Attenuates Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis in SH-SY5Y Cells via the AKT/GSK3 $\beta$  Signaling Pathway. *Int. J. Mol. Sci.* *18*, 315.
46. Fukuchi, M., Nii, T., Ishimaru, N., Minamino, A., Hara, D., Takasaki, I., Tabuchi, A., and Tsuda, M. (2009). Valproic acid induces up- or down-regulation of gene expression responsible for the neuronal excitation and inhibition in rat cortical neurons through its epigenetic actions. *Neurosci. Res.* *65*, 35–43.
47. Wang, X., Ma, M., Teng, J., Che, X., Zhang, W., Feng, S., Zhou, S., Zhang, Y., Wu, E., and Ding, X. (2015). Valproate Attenuates 25-kDa C-Terminal Fragment of TDP-43-Induced Neuronal Toxicity via Suppressing Endoplasmic Reticulum Stress and Activating Autophagy. *Int. J. Biol. Sci.* *11*, 752–761.
48. Harrison, I.F., Crum, W.R., Vernon, A.C., and Dexter, D.T. (2015). Neurorestoration induced by the HDAC inhibitor sodium valproate in the lactacystin model of Parkinson's is associated with histone acetylation and up-regulation of neurotrophic factors. *Br. J. Pharmacol.* *172*, 4200–4215.
49. Chu, T., Zhou, H., Lu, L., Kong, X., Wang, T., Pan, B., and Feng, S. (2015). Valproic acid-mediated neuroprotection and neurogenesis after spinal cord injury: from mechanism to clinical potential. *Regen. Med.* *10*, 193–209.
50. Yamauchi, J., Torii, T., Kusakawa, S., Sanbe, A., Nakamura, K., Takashima, S., Hamasaki, H., Kawaguchi, S., Miyamoto, Y., and Tanoue, A. (2010). The mood stabilizer valproic acid improves defective neurite formation caused by Charcot-Marie-Tooth disease-associated mutant Rab7 through the JNK signaling pathway. *J. Neurosci. Res.* *88*, 3189–3197.
51. Tatsumi, Y., Matsumoto, N., Iibe, N., Watanabe, N., Torii, T., Sango, K., Homma, K., Miyamoto, Y., Sakagami, H., and Yamauchi, J. (2019). CMT type 2N disease-associated AARS mutant inhibits neurite growth that can be reversed by valproic acid. *Neurosci. Res.* *139*, 69–78.
52. Lin, L., Lesnick, T.G., Maraganore, D.M., and Isacson, O. (2009). Axon guidance and synaptic maintenance: preclinical

- markers for neurodegenerative disease and therapeutics. *Trends Neurosci.* *32*, 142–149.
53. Van Battum, E.Y., Brignani, S., and Pasterkamp, R.J. (2015). Axon guidance proteins in neurological disorders. *Lancet Neurol.* *14*, 532–546.
54. Stoeckli, E. (2017). Where does axon guidance lead us? *F1000Res.* *6*, 78.
55. Schwamborn, J.C. (2018). Is Parkinson's Disease a Neurodevelopmental Disorder and Will Brain Organoids Help Us to Understand It? *Stem Cells Dev.* *27*, 968–975.

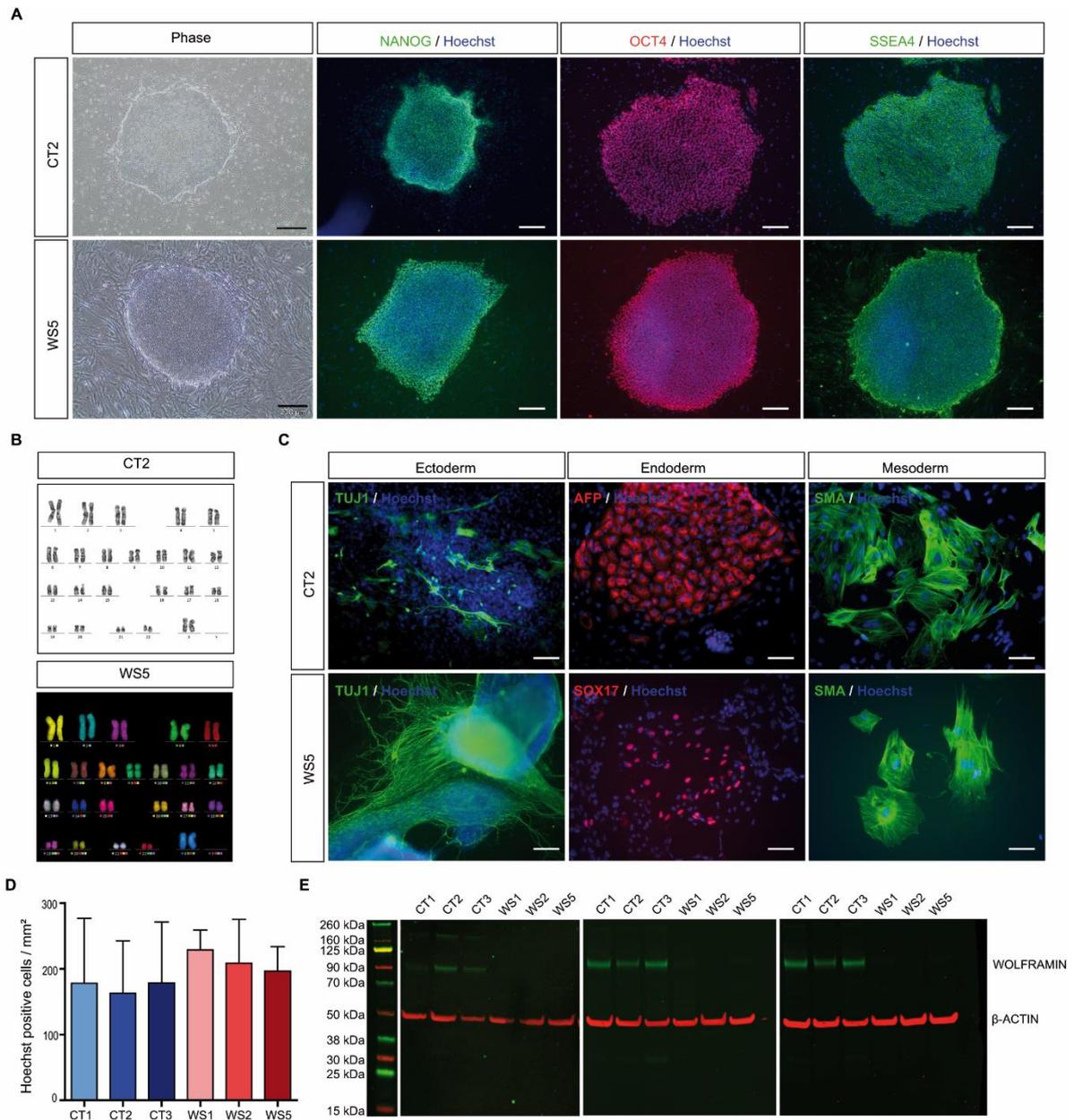
**The American Journal of Human Genetics, Volume 108**

**Supplemental information**

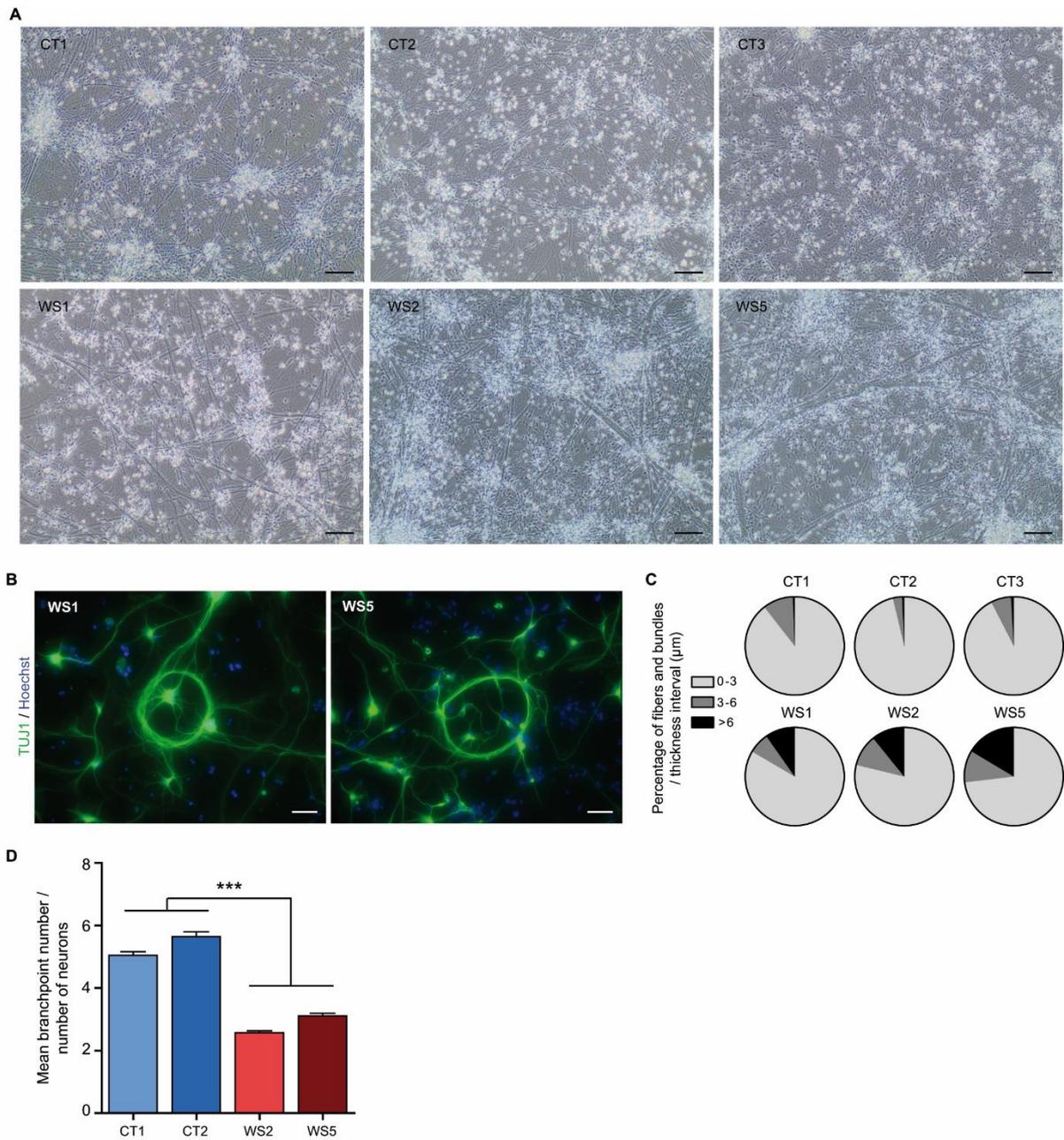
**Human iPSC-derived neurons reveal early  
developmental alteration of neurite outgrowth in the  
late-occurring neurodegenerative Wolfram syndrome**

**Sandra Pourtoy-Brasselet, Axel Sciauvaud, Maria-Gabriela Boza-Moran, Michel Cailleret, Margot Jarrige, Hélène Polvèche, Jérôme Polentes, Eric Chevet, Cécile Martinat, Marc Peschanski, and Laetitia Aubry**

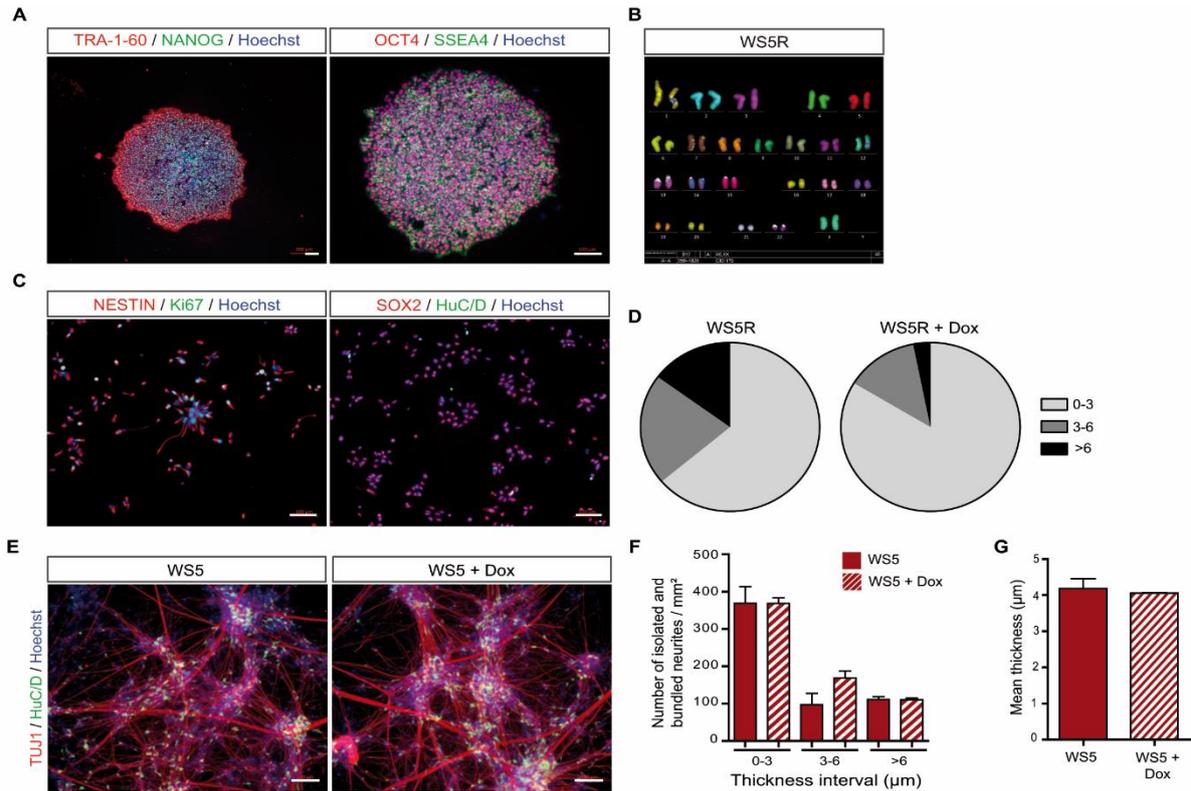
## **Supplemental Data**



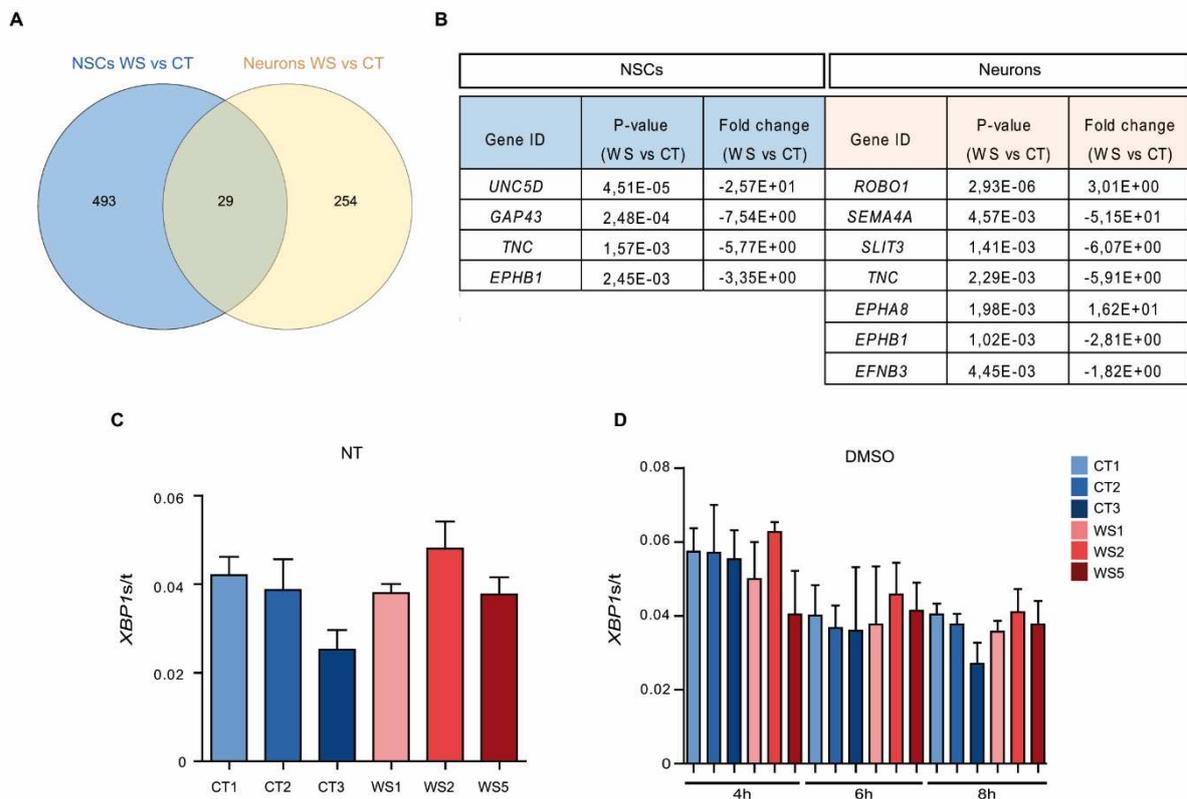
**Figure S1: Characterization of CT2 and WS5 iPSC lines and quantification of the number of cells in CT and WS neuronal culture. A.** Phase contrast images of CT2 and WS5 iPSCs and immunostaining of the pluripotency markers NANOG, OCT4 and SSEA4. Scale bars, 200  $\mu$ m. **B.** G-banding and mFISH (46, XX). **C.** Three germ layer differentiation in *in vitro* embryoid bodies. Scale bars, 200  $\mu$ m. **D.** Quantification of the number of cells (Hoechst) in CT and WS neuronal culture at DIV 14 from NSC stage. **E.** Western blot images of wolframin in CT and WS neurons at DIV 21 (related to Figure 1D for left panel; n = 3 biologically independent differentiations).



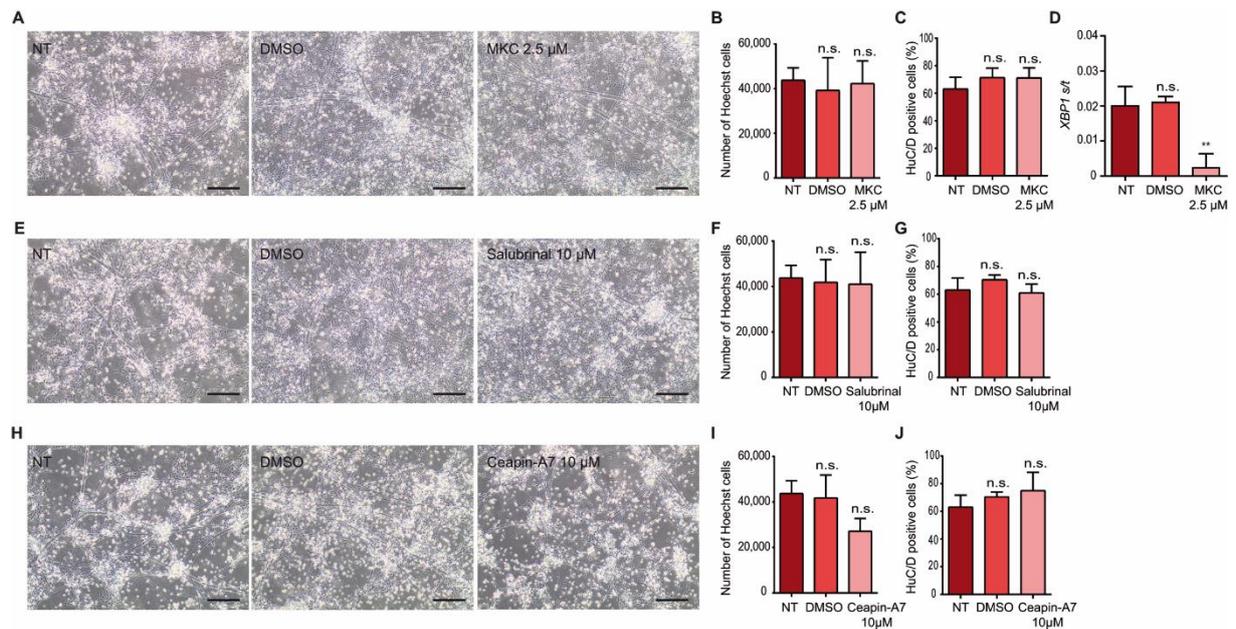
**Figure S2: Abnormal neurite outgrowth in WS neurons. A.** Phase contrast images of CT and WS neuronal network at DIV 14. Scale bars, 200  $\mu\text{m}$ . **B.** TUJ1 immunostained loop structures. Scale bars, 50  $\mu\text{m}$ . **C.** Proportion of isolated and bundled neurites for three thickness intervals (0 - 3; 3 - 6 and > 6  $\mu\text{m}$ ) in CT and WS neurons. **D.** Mean branchpoint number per number of neurons. Data are presented as mean  $\pm$  SEM ( $n = 1$  differentiation; 43 technical replicats; \*\*\* $p < 0.001$ ; Student's t-test).



**Figure S3: Characterization of WS5 rescue (WS5R) iPSCs, NSCs and neurons.** **A.** Characterization of WS5R iPSCs by immunostaining of the pluripotency markers TRA-1-60, NANOG, OCT4, SSEA4. Scale bars, 100  $\mu\text{m}$ . **B.** mFISH chromosome analysis of WS5R iPSC line showing a normal karyotype (46, XX). **C.** Immunostaining of the neural (NESTIN and SOX2), the neuronal (HuC/D) and the proliferation (Ki67) markers in WS5R-derived NSCs. Scale bars, 100  $\mu\text{m}$ . **D.** Proportion of isolated and bundled neurites per each thickness interval (0 - 3; 3 - 6 and > 6  $\mu\text{m}$ ) of WS5R neurons at DIV 21. **E.** TUJ1 and HuC/D immunostaining of the parental WS5 neurons at DIV 21 under doxycycline (Dox) treatments. Scale bars, 100  $\mu\text{m}$ . **F.** Quantification of the number of isolated and bundled neurites per  $\text{mm}^2$  for each thickness interval (0 - 3; 3 - 6 and > 6  $\mu\text{m}$ ) at DIV 21 in the parental WS5 neurons treated with doxycycline. Data are presented as mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$  biologically independent differentiations; No statistical difference was observed using one-way ANOVA with Dunnett's post hoc test). **G.** Mean thickness of the parental WS5 neurons at DIV 21 under doxycycline treatments. Data are presented as mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$  biologically independent differentiations; No statistical difference was observed using Student's t-test).

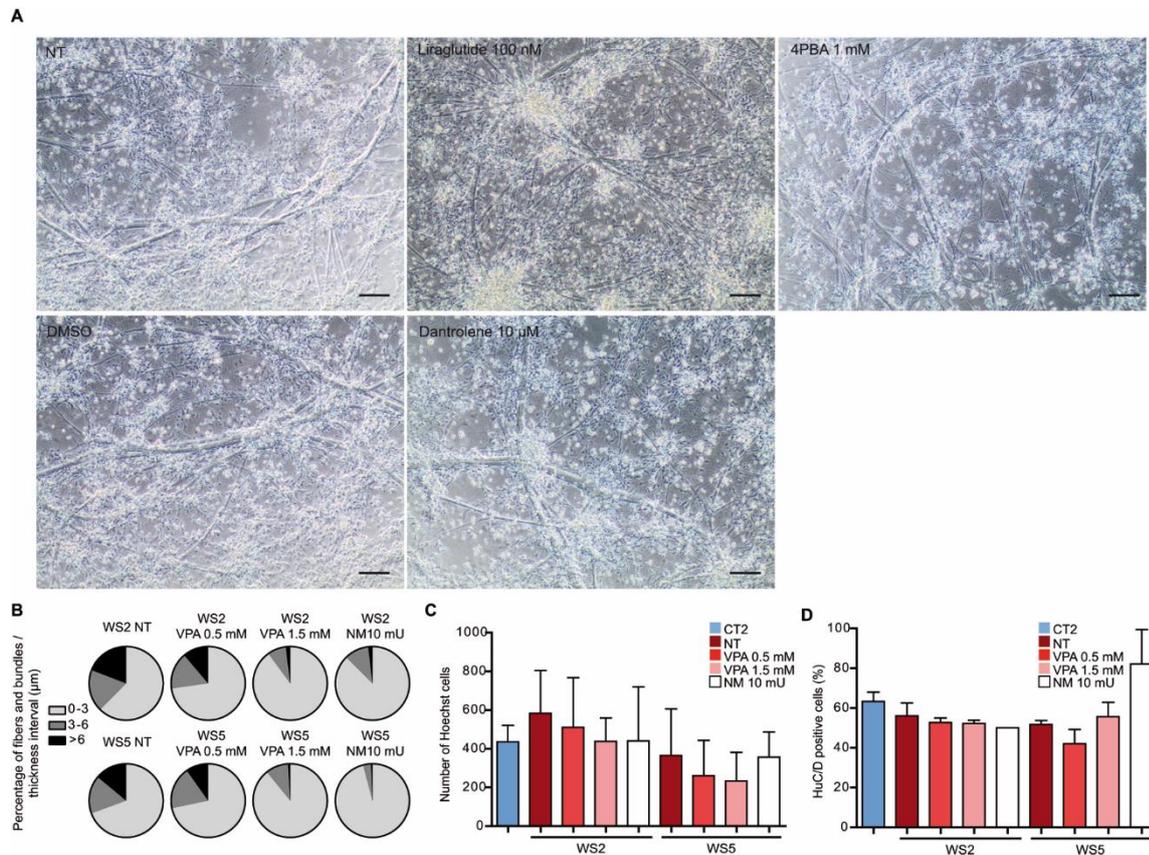


**Figure S4: Gene expression analysis between CT and WS NSCs and neurons.** **A.** Venn diagram summarizing the number of DEGs specific or common to NSCs and neurons. **B.** Table of axon guidance genes deregulated in WS NSCs and neurons. **C. and D.** Controls of thapsigargin (TG) treatments. Quantification of *XBP1s* expression normalized to total *XBP1* (*XBP1t*) in non-treated (**C**) and in DMSO treated (**D**) CT and WS NSCs after 4, 6 and 8 hours. Data are presented as mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$  biologically independent experiments;  $*p < 0.05$ ; No statistical difference was observed using one-way ANOVA with Dunnett's post hoc test).



**Figure S5: Effect of UPR pathways inhibition on the abnormal neurite outgrowth in WS5 neurons.**

**A.** Phase contrast images of WS5 neurons at DIV 18 treated or not with 2.5  $\mu$ M MKC-8866 (MKC) or control DMSO. Scale bars, 200  $\mu$ m. **B.** and **C.** Quantification of the number of cells (Hoechst) (**B**) and of the percentage of neurons (HuC/D) (**C**) after MKC treatment. **D.** Analysis of spliced *XBP1* (*XBP1s*) expression normalized to total *XBP1* (*XBP1t*) in WS5 neurons treated with 2.5  $\mu$ M MKC or control DMSO. **E.** Phase contrast images of WS5 neurons at DIV 18 treated or not with 10  $\mu$ M salubrinal or control DMSO. Scale bars, 200  $\mu$ m. **F.** and **G.** Quantification of the number of cells (Hoechst) (**F**) and of the percentage of neurons (HuC/D) (**G**) after salubrinal treatment. **H.** Phase contrast images of WS5 neurons at DIV 18 treated or not with 10  $\mu$ M ceapin-A7 or control DMSO. Scale bars, 200  $\mu$ m. **I.** and **J.** Quantification of the number of cells (Hoechst) (**I**) and of the percentage of neurons (HuC/D) (**J**) after ceapin-A7 treatment. For all analyses, data are presented as mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$  biologically independent differentiations; \*\* $p < 0.01$ ; one-way ANOVA with Dunnett's post hoc test).



**Figure S6: Effect of drugs treatments on the neurite outgrowth defect in WS5 neurons. A.** Phase contrast images of WS5 neurons at DIV 18 treated or not (NT) with 10  $\mu$ M dantrolene, 100 nM liraglutide or 1 mM 4-phenylbutyric acid (4PBA). Scale bars, 200  $\mu$ m. **B.** Repartition profile of the percentage of isolated and bundled neurites per thickness intervals after VPA treatments. **C.** and **D.** Quantification of the number of cells (Hoechst) (**C**) and of the percentage of neurons (HuC/D) (**D**) after VPA treatments. Data are presented as mean  $\pm$  SEM ( $n = 3$  biologically independent differentiations; \* $p < 0.05$ ; No statistical difference was observed using one-way ANOVA with Dunnett's post hoc test, data are compared to CT2 cells).

**Table S1: Information on iPSC cell lines.**

iPSC lines	Source of iPSC	Mutations in <i>WFS1</i> gene	Sex	Clinical features
WS1	New York Stem Cell Foundation	c.1230-1233delCTCT [p.Val412fs*440]; c.2171C>T [p.Pro724Leu]	Male	Diabetes mellitus; optic atrophy; cognitive disabilities
WS2	New York Stem Cell Foundation	c.1230-1233delCTCT [p.Val412fs*440]	Female	Diabetes mellitus; optic atrophy; cognitive disabilities; diabetes insipidus
WS5	I-Stem	c.1060-1062delTTC [p.Phe354del]; c.1676C>A [p.Ala559Asp]	Female	Diabetes mellitus; optic atrophy
CT1	I-Stem	None	Male	N/A
CT2	I-Stem	None	Female	N/A
CT3	I-Stem	None	Female	N/A

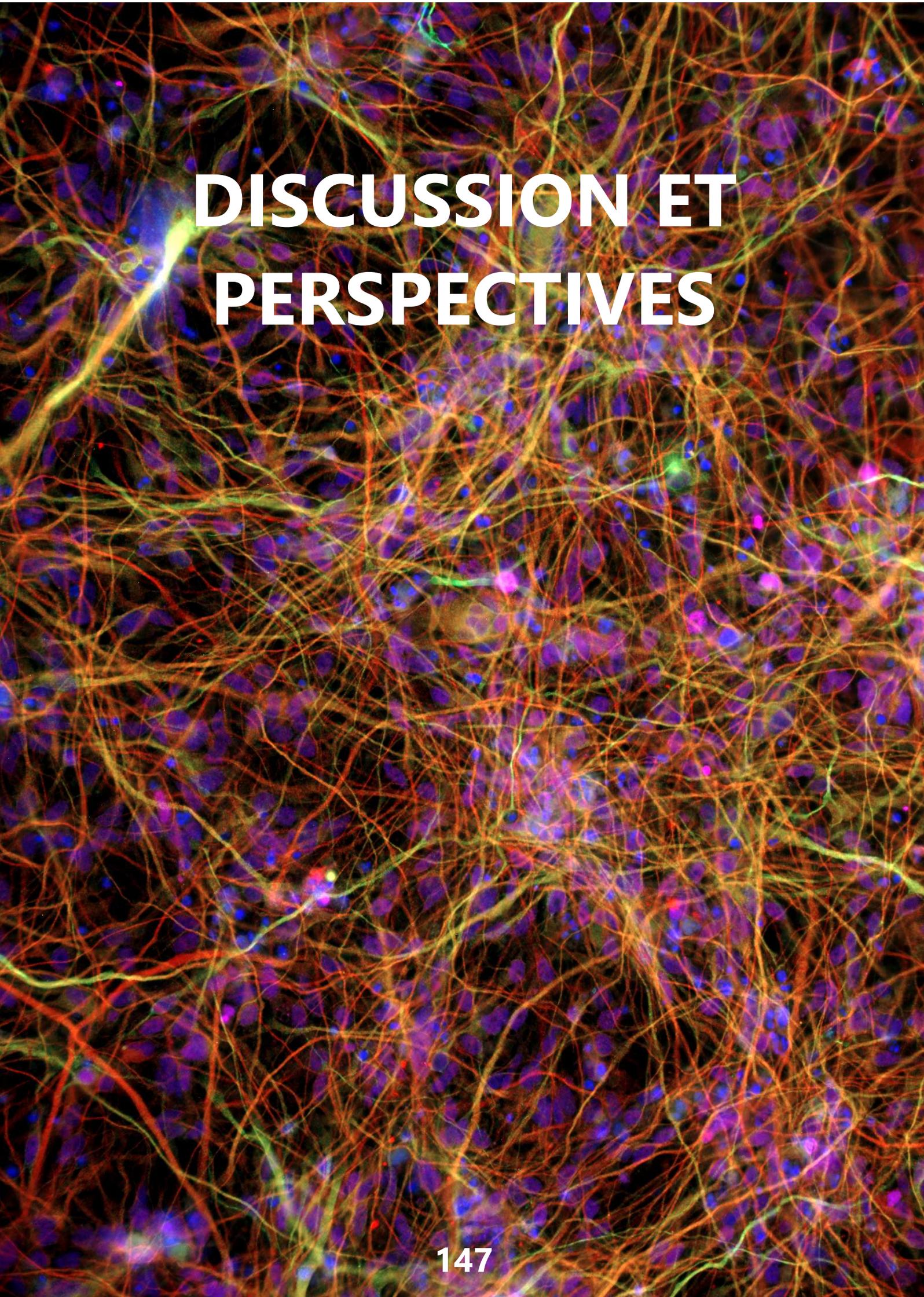
**Table S2: List of antibodies, hosts, providers and dilutions.**

Application	Antibody	Host	Provider	Dilution
<b>Immunostaining</b>	OCT4	Rabbit	Cell Signaling Technology	1/200
	TRA-1-60	Mouse	Cell Signaling Technology	1/1000
	NANOG	Rabbit	Cell Signaling Technology	1/800
	SSEA4	Mouse	Cell Signaling Technology	1/500
	TUJ1 (neuron-specific class III beta-tubulin)	Chicken	Millipore	1/1000
	SOX17	Goat	R&D systems	1/200
	SMA	Mouse	Agilent Dako	1/100
	AFP	Mouse	Cell Signaling Technology	1/100
	NESTIN	Rabbit	Millipore	1/500
	Ki67	Mouse	Agilent Dako	1/500
	HuC/D (Elav family members HuC, HuD)	Mouse	ThermoFisher Scientific	1/250
	CUX2 (Cut-Like Homeobox 2)	Rabbit	Abcam	1/500
	Alexa Fluor™ 555 Donkey anti-rabbit	Donkey	ThermoFisher Scientific	1/1000
	Alexa Fluor™ 555 Goat anti-chicken	Goat	ThermoFisher Scientific	1/1000
	Alexa Fluor™ 555 Goat anti-mouse	Goat	ThermoFisher Scientific	1/1000
	Alexa Fluor™ 488 Chiken anti-rabbit	Chicken	ThermoFisher Scientific	1/1000
Alexa Fluor™ 488 Goat anti-mouse	Goat	ThermoFisher Scientific	1/1000	
<b>Western-Blot</b>	WOLFRAMIN	Rabbit	Cell Signaling Technology	1/500
	β-ACTIN	Mouse	Li-Cor Biosciences	1/5000
	IRDye 800CW Donkey anti-rabbit	Donkey	Li-Cor Biosciences	1/10000
	IRDye 800CW Donkey anti-mouse	Donkey	Li-Cor Biosciences	1/10000

**Table S3: List of primers used for PCR and qPCR.**

Gene	Primer	5'-3' Sequence
<i>18S</i>	Forward	GAGGATGAGGTGGAACGTGT
	Reverse	TCTTCAGTCGCTCCAGGTCT
<i>XBP1</i>	Forward	GAAGCCAAGGGGAATGAAGT
	Reverse	GGGAAGGGCATTGAAGAAC
<i>UNC5D</i>	Forward	ATACCCAATGCCAAAGGC
	Reverse	TTCAAATGACAGCAGATGGGC
<i>SLIT3</i>	Forward	GCGATTTGGAGATCCTTACCCT
	Reverse	AGTCGCAGTACAGGTGGTTG
<i>TNC</i>	Forward	TCTGATGGGGTGGATGGAT
	Reverse	CTTCTCTGCGGTCCCAAAT
<i>EPHB1</i>	Forward	TCTTCGAGCCCAACCAGAAC
	Reverse	TCTGTGTAGATGCGATGGGC
<i>SEMA4A</i>	Forward	CTTGGTGGATGGGATGCTCTA
	Reverse	GGAGGAAGTTGTCGGTCTTG





# DISCUSSION ET PERSPECTIVES



L'élaboration de modèles cellulaires physiologiquement et génétiquement plus pertinents que les modèles développés jusqu'à présent (cellules immortalisées, cancéreuses ou les cultures primaires de neurones de rat) est un enjeu majeur de la modélisation des atteintes neurologiques du SW1 dans le but de développer des thérapies. La découverte des cellules souches pluripotentes (CSP) humaines et plus particulièrement des cellules souches pluripotentes induites (CSPi) humaines a permis d'apporter des perspectives innovantes et prometteuses dans ce cadre de la recherche. Les travaux que j'ai menés pendant ma thèse s'inscrivent au cœur de ce contexte. Pendant ces années de doctorat, j'ai ainsi mis au point un nouveau modèle cellulaire à partir de CSPi de patients, et plus précisément de leurs dérivés, à savoir des NSC et des neurones corticaux. Ces travaux ont permis de mettre en évidence un défaut développemental majeur de mise en place du réseau neuronal, relié à l'absence d'expression de la wolframine, et de montrer que, parmi les molécules actuellement en essai clinique, seul l'acide valproïque prévient l'apparition de ce défaut.

#### **A) CSPi et dérivés neuraux : élaboration d'un nouveau modèle cellulaire du SW1**

Les différents modèles *in vitro* du SW1 élaborés jusqu'à présent ont permis de mettre en évidence certains rôles physiologiques de la wolframine mais présentent certaines limites. Ainsi, la recherche d'une source cellulaire alternative à ceux-ci s'est naturellement orientée vers les CSPi. En effet, de par leurs propriétés uniques d'auto-renouvellement et de pluripotence, ces cellules permettent d'accéder à des cellules humaines de divers phénotypes d'intérêt, en quantité illimitée. C'est pourquoi nous avons fait le choix de développer un modèle de neurones corticaux à partir de ces cellules dans le but de modéliser les atteintes neurologiques du syndrome. A ce jour, très peu d'études rapportent l'utilisation des CSPi pour modéliser le SW1 et aucune ne fait mention de l'utilisation de ces cellules afin de les différencier en neurones. En effet, le potentiel des CSPi a notamment été exploité afin de modéliser les atteintes pancréatiques des patients par des protocoles de différenciation en cellules  $\beta$ -

pancréatiques (Shang et al., 2014 ; Maxwell et al., 2020). Par ailleurs, plusieurs lignées de CSPi ont été générées à partir de fibroblastes de patients, ainsi que des lignées isogéniques dans le but d'apporter un matériel cellulaire varié reflétant l'hétérogénéité génétique des patients (Grzela et al., 2020 ; Nami et al., 2021). Concernant la modélisation des atteintes neurologiques, seules deux études rapportent l'utilisation de CSPi issues de patients SW1 afin de générer des progéniteurs neuraux (Lu et al., 2014 ; Zmyslowska et al., 2021). Cependant, au sein de ces études, les NSC ne sont pas différenciées en neurones. Or, dans le but de modéliser au mieux les atteintes neurologiques, il est important de pousser la différenciation vers un stade cellulaire plus mature et fonctionnel que le stade intermédiaire des NSC. Dans ce contexte, nous avons donc généré le premier modèle de neurones corticaux issus de CSPi obtenues à partir de cellules de patients atteints du SW1. Après une caractérisation phénotypique par différentes techniques (FACS, immunomarquages), nous avons pu observer que l'absence de wolframine n'a pas eu d'impact sur la capacité des cellules mutées (WS) à générer un pourcentage de neurones corticaux équivalent aux cellules contrôles (CT).

## **B) Identification d'un nouveau phénotype**

Malgré la bonne capacité des cellules WS à se différencier en neurones corticaux, nous avons observé, au cours de la différenciation neuronale à partir des NSC, un nouveau phénotype. Ce dernier se traduit par un défaut majeur de pousse neuritique. En effet, le réseau neuronal des cellules mutées est moins dense et présente de larges faisceaux de neurites, caractéristique d'un mécanisme de fasciculation. Au sein de notre modèle, ce phénomène de fasciculation est observé dans les conditions contrôles et mutées. Mais il est important de relever que l'épaisseur de ces faisceaux est nettement supérieure dans les neurones mutés. En effet, les faisceaux mesurés dans les conditions contrôles n'excèdent pas 12  $\mu\text{m}$  d'épaisseur contrairement aux conditions mutées où les faisceaux peuvent atteindre jusqu'à 58  $\mu\text{m}$ . De plus, ce phénotype de fasciculation n'est pas réalisé par l'ensemble des neurones puisqu'on retrouve également une

proportion non négligeable de neurites isolés, similaire aux neurones contrôles, mettant en évidence que seule une population de neurones participe à ce phénomène. Les prémises de ce défaut apparaissent rapidement au cours de la différenciation, entre J10 et J14, traduisant un défaut développemental. Par ailleurs, ces faisceaux épais s'étendent sur de très longues distances, formant des courbes et parfois des boucles complètes, suggérant un défaut d'orientation des axones. Grâce à une lignée rescue (WS5R), nous avons pu démontrer que ce défaut était bien corrélé à l'absence d'expression de la wolframine.

Comme mentionné dans l'introduction de ce mémoire, la fasciculation est un mécanisme physiologique nécessaire dans la mise en place des connexions entre les différentes structures cérébrales qui nécessite l'implication de molécules de guidage axonal variées. Nos analyses transcriptomiques ont permis de corrélérer le défaut majeur de pousse neuritique à une dérégulation d'un ensemble de gènes impliqués dans le guidage axonal dont *SLIT3*, *SEM4A*, *UNC5D*, *ROBO1* et plusieurs Ephrines. Présentées dans l'introduction de ce mémoire, des dérégulations de ces gènes ainsi que des défauts de fasciculation ont été identifiés dans de nombreuses pathologies neurologiques (Roig-Puiggros et al., 2020 ; Moreland and Poulain, 2022). De plus, des analyses par IRM ont démontré que les patients atteints du SW1 présentent un volume cérébral réduit (Hershey et al., 2012 ; Lugar et al., 2016 ; 2019 ; La Morgia et al., 2020). Or un lien entre des défauts de guidage axonal et une réduction du volume cérébral a été décrit dans différentes études sur des modèles murins et chez des patients (Engle et al., 2010 ; McFadden and Minshew, 2013 ; Deloulme et al., 2015). C'est notamment le cas de mutations dans le récepteur de la protéine de guidage DCC qui sont à l'origine d'une réduction du volume du striatum (structure nerveuse subcorticale impliquée dans le contrôle du mouvement volontaire) chez l'Homme dès l'adolescence (Vosberg et al., 2018). De même, des défauts de fasciculation ont été rapportés dans des pathologies neurodégénératives dont l'HSP (HSP, *Hereditary spastic paraplegia*) (Slosarek et al., 2018). Bien que nos résultats obtenus *in vitro* mettent en évidence un défaut qui pourrait corrélérer avec les observations décrites chez les patients, les

mécanismes à l'origine d'une réduction du volume cérébral chez les patients du SW1 restent cependant à éclaircir.

Il est également intéressant de relever que ces molécules de guidage axonal jouent un rôle clé dans la structure et la fonction des cellules  $\beta$ -pancréatiques (Waters and Blum, 2022), mettant une fois de plus en évidence un lien entre ces deux types cellulaires particulièrement atteints chez les patients. En effet, un nombre croissant d'études rapporte que les molécules de guidage axonal codées par ces gènes dont les Ephrines, les Nétrines, les Sémaphorines ainsi que Slit-Robo influencent la migration cellulaire des progéniteurs endocriniens afin d'établir une architecture correcte au cours de la morphogenèse des îlots de Langerhans. L'analyse de l'expression de ces gènes dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques générées à partir de CSPi serait particulièrement appropriée.

Par ailleurs, ces molécules se situent au niveau de la membrane plasmique de la cellule où elles exercent des fonctions extracellulaires et dont certaines sont sécrétées. De ce fait, il serait particulièrement pertinent d'analyser la sécrétion de ces protéines car leur localisation nécessite un transport du RE (lieu où elles sont synthétisées) jusqu'à la membrane. De manière intéressante, l'implication de la wolframine dans la sécrétion protéique a été identifiée notamment dans les cellules  $\beta$ -pancréatiques de souris (Hatanaka et al., 2011). Plus récemment, les interactions entre WFS1 et différentes molécules du transport vésiculaire entre le RE et l'appareil de Golgi ont été décrites (Wang et al., 2021). Ces observations n'étant pas réalisées à ce jour dans des cellules neuronales du syndrome, il serait intéressant d'étudier l'impact de l'absence de la protéine sur la sécrétion vésiculaire. De plus, des défauts du trafic entre le RE et l'appareil de Golgi ont été identifiés dans différentes maladies neurologiques dont la maladie de Charcot-Marie-Tooth, la HSP ainsi que des microcéphalies (Wang et al., 2020).

### C) Implication de l'UPR

Suite à l'identification de ce nouveau phénotype et de sa corrélation avec l'absence d'expression de la wolframine, l'étape suivante a consisté à étudier les mécanismes moléculaires physiopathologiques à son origine. Nous avons ainsi souhaité étudier le rôle de l'UPR dans ce phénotype. Cela était fondé sur différents arguments : le fait qu'une augmentation des acteurs de l'UPR a été décrite dans de nombreux modèles cellulaires et animaux du SW1 mais aussi de par l'importance de l'UPR dans la neurogenèse (Vàsquez et al., 2022). L'étude de l'activation de l'UPR et de ses différents acteurs n'a pas révélé de différence significative d'expression à un niveau basal entre nos lignées contrôles et mutées, au stade de NSC et au stade de neurones corticaux. Bien que ces résultats ne soient pas en accord avec la plupart des études menées dans le cadre du SW1, des observations similaires ont été réalisées notamment dans le modèle drosophile du syndrome (Sakakibara et al., 2018). De plus, il est important de relever que l'augmentation de l'activation de l'UPR a majoritairement été rapportée dans des modèles des atteintes pancréatiques de la pathologie, on peut alors imaginer que l'implication de l'UPR soit tissu-spécifique. Enfin, nos observations ont été renforcées récemment par l'étude protéomique menée par Zmyslowska et al., qui n'observe pas d'augmentation de l'UPR à un niveau basal dans les NSC mutées issues de CSPi (Zmyslowska et al., 2021).

Malgré l'absence de modification de l'expression des gènes codant pour des protéines impliquées dans l'UPR, les NSC mutées sont apparues plus sensibles à un stress du RE. Comme observé dans d'autres études, suite à l'induction d'un stress par traitement à la thapsigargine, l'ensemble des lignées ont répondu par l'activation de l'UPR. Cependant, l'épissage de *XBP1* est resté à un niveau élevé plus longtemps dans les cellules mutées que dans les cellules contrôles, mettant en évidence une difficulté des cellules mutées à revenir à un niveau basal de l'UPR. Des résultats similaires ont été rapportés dans différentes études dont l'étude de Zmyslowska et al., mettant en évidence qu'un stress à la tunicamycine des NSC dérivées de CSPi induisait une

augmentation plus importante des protéines de l'UPR dans les cellules mutées par rapport aux contrôles (Zmyslowska et al., 2021).

L'implication de la protéostase du RE et plus particulièrement l'activation de l'UPR au cours des premières étapes du développement cérébral a été rapportée dans différentes études (Vàsquez et al., 2022). L'activation de celle-ci semble être primordiale pendant l'engagement neuronal, la détermination du destin cellulaire (Godin et al., 2016), l'expression et la maturation des protéines synaptiques (Sossin et Costa-Mattioli, 2019), mais aussi le placement et la fonction précise des neurones, des astrocytes et de la glie, impactant ainsi le développement du cerveau (Hetz, 2021). Malgré le fait que les rôles des voies PERK et IRE1 aient largement été rapportés dans la différenciation neuronale (Cho et al., 2009), la neurogenèse (Cho et al., 2009 ; Kawada et al., 2014) ainsi que leur activation dans le développement précoce (Laguesse et al., 2015), les liens entre la voie ATF6 et ces mécanismes physiologiques restent peu décrits.

Au vu de l'émergence de nombreuses études rapportant l'implication de l'UPR dans la corticogenèse, il serait particulièrement pertinent d'étudier l'implication de celle-ci, et notamment le rôle de la wolframine, au cours de la différenciation neuronale. De plus, il a été montré que l'UPR est un mécanisme dynamique clé dans la mise en place du cortex, on peut alors émettre l'hypothèse que la wolframine est impliquée dans ce processus développemental et contribue à son équilibre. Ainsi, l'absence de la protéine pourrait induire un déséquilibre de l'UPR, impactant les mécanismes de corticogenèse.

De par l'ensemble des éléments précédemment exposés, indiquant l'importance de l'UPR dans la neurogenèse, nous nous sommes interrogés sur son implication dans le phénotype neurodéveloppemental que nous observons. Ainsi, une approche d'inhibition des trois voies qui constituent l'UPR a été réalisée par le biais de molécules spécifiques (Hetz et al., 2019). De manière intéressante, l'inhibition des voies PERK et IRE1 n'a pas montré d'effet sur notre phénotype. Cependant, l'inhibition spécifique de la voie ATF6 $\alpha$  par la Ceapin-A7 a permis de prévenir l'apparition du défaut de pousse neuritique. Étant donné le rôle inhibiteur de la wolframine sur la voie ATF6

précédemment décrit, ces résultats suggèrent que le développement neuritique dans les cellules WS est impacté par une activation chronique de la voie ATF6. A ce jour, des mutations d'*ATF6* n'ont été identifiées que dans l'achromatopsie, maladie réduisant sévèrement l'acuité visuelle (Ansar et al., 2015 ; Kohl et al., 2015). Enfin l'implication d'ATF6 a également été décrite dans des pathologies neurodégénératives telles que la MA, la MP et l'ALS (Ghemrawi and Khair, 2020).

#### **D) Mécanismes physiopathologiques : autres pistes**

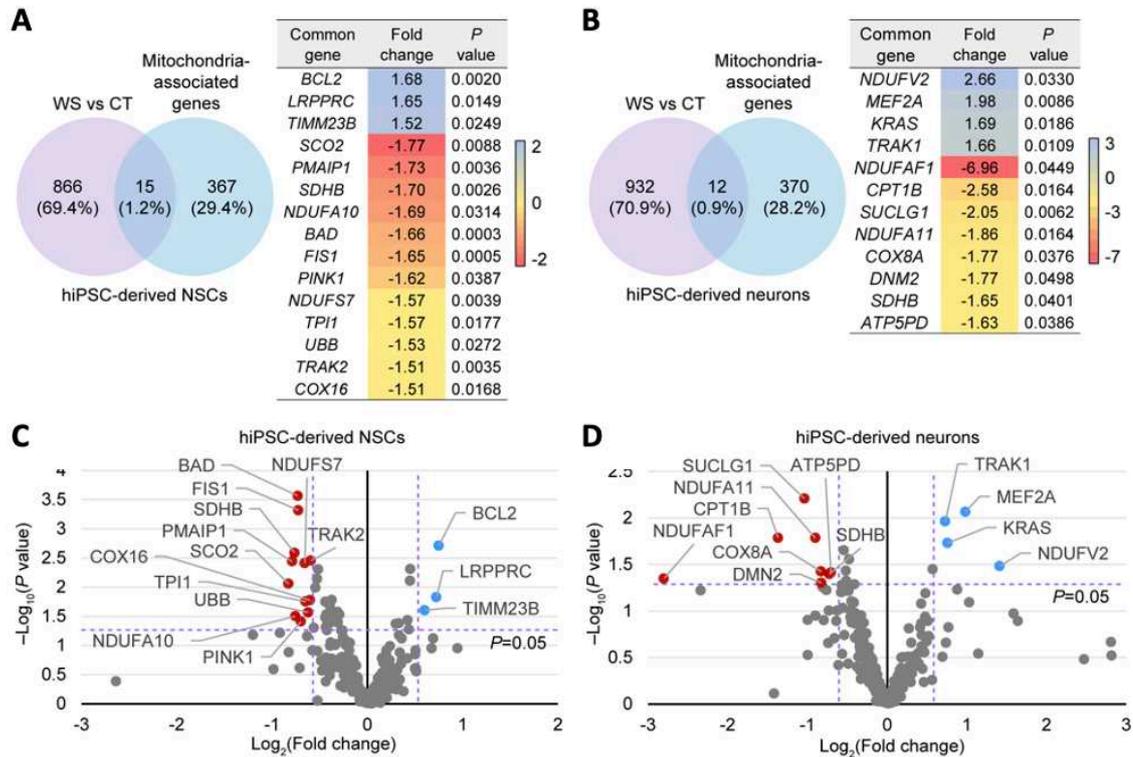
Les atteintes neurologiques du SW1 sont restées longtemps non explorées en raison des difficultés de mise en place de modèle pertinent. Cependant, les différents modèles développés jusqu'à présent ont largement contribué à l'acquisition des connaissances actuelles sur le syndrome ainsi que sur les rôles de la wolframine. Plus récemment, la localisation de la wolframine au niveau des MAMs a été identifiée (Poston et al., 2013). Cette zone d'interactions entre le RE et la mitochondrie est impliquée dans de nombreux mécanismes dont des échanges de calcium, la synthèse lipidique, etc. La mise en place d'un réseau neuronal fonctionnel et stable nécessite l'implication de ces mécanismes physiologiques. Ainsi, le modèle cellulaire développé pendant ma thèse apporte une source appropriée afin d'étudier l'ensemble de ces mécanismes dans le contexte de la mise en place du réseau neuronal des patients.

#### ***Les mitochondries : actrices des mécanismes physiopathologiques ?***

Les mitochondries sont impliquées dans de nombreux mécanismes physiologiques des neurones et de leur développement (Devine and Kittler, 2018). Elles permettent notamment de subvenir aux besoins bioénergétiques des axones et des dendrites pendant leur croissance et effectuent le transport axonal de molécules entre le soma et l'extrémité de l'axone (Smith and Gallo, 2017). Des défauts de cet organe ont été identifiés dans un nombre varié de maladies neurodégénératives dont la MP, la MA et la maladie de Huntington (Butterfield and Hallilwell, 2019 ; Norat et al., 2020). De même, des anomalies mitochondriales multiples ont été rapportées dans des

maladies neurodéveloppementales telles que les troubles du spectre autistique (Rojas-Charry et al., 2021), le syndrome de Prader-Willi (Victor et al., 2021), le syndrome de FOXP1 (*Forkhead-box Protein P1*) (Wang et al., 2022) et le syndrome de Rett (De Filippis et al., 2015).

Dans le cadre du SW1, plusieurs études ont fait mention de défauts morphologiques et fonctionnels, d'une mitophagie augmentée ainsi que de défauts de la dynamique mitochondriale. C'est le cas notamment de l'étude menée par Cagalinec et al., qui a mis en évidence une altération de ces mécanismes dans des neurones de rats déficients en *WFS1*, impactant ainsi le développement de l'arborisation de ces neurones. Au cours de mon doctorat et dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Sarkar et son équipe (Université de Birmingham) ainsi qu'avec le Dr Rak (UMR1141, Hôpital Robert Debré) nous avons donc étudié différents paramètres relatifs aux mitochondries dans notre modèle de NSC et de neurones corticaux. L'analyse de nos données transcriptomiques aux stades NSC et neurones corticaux ont révélé qu'un certain nombre de gènes associés aux mitochondries sont dérégulés dans ces deux types cellulaires (Figure 65). Par la suite, des analyses fonctionnelles ont révélé une diminution du potentiel de membrane mitochondrial, une augmentation de la concentration d'espèces réactives à l'oxygène (*ROS, Reactive Oxygen Species*), une absence de différence d'activité des complexes II, III et IV de la chaîne respiratoire ainsi qu'une diminution de la production d'ATP aux stades NSC et neurones. Ces résultats suggèrent l'existence d'un dysfonctionnement mitochondrial qui pourrait participer au défaut neurodéveloppemental observé dans notre modèle. Ils devraient faire l'objet d'une publication d'ici la fin de l'année.



**Figure 65 : Expression des gènes associés aux mitochondries aux stades NSC et neurones corticaux**

A. Analyse des gènes mitochondriaux dérégulés au stade NSC ; B. Analyse des gènes mitochondriaux dérégulés au stade de neurones corticaux J28 ; C et D. Volcano Plot des NSC (C) et des neurones corticaux J28 (D).

## Lipogenèse

Les MAMs et de manière générale les mitochondries sont également des organites clés dans la synthèse lipidique. En effet, ce sont elles qui génèrent, au cours du cycle de Krebs, l'acétyl-coenzymeA (Acétyl-CoA) nécessaire à la synthèse lipidique. Stockés sous forme de gouttelettes, une accumulation trop importante de lipides peut induire une activation de l'UPR (Olzmann and Carvahlo, 2019). De plus, la synthèse lipidique est augmentée dans les cellules souches neurales adultes, nécessaire au bon déroulement de la myélinisation et est indispensable au bon fonctionnement des neurones (Batchuluun et al., 2022). La perturbation de la synthèse lipidique impacte la différenciation neuronale et a été décrite dans plusieurs maladies neurodégénératives dont la sclérose en plaque, la MA et la MP (Schon and Przedborski, 2011 ; Aera-Gomez et al., 2018). De même, des mutations dans les gènes régulant la lipogenèse ont été rapportées dans la HSP (Blackstone, 2018). Récemment, il a été suggéré que les lipides

et plus particulièrement les lysolipides (dont S1P) étaient impliquées dans le guidage axonal (Guy and Kamiguchi, 2021). De plus, de récentes études métabolomiques utilisant du sérum de patient SW ou des modèles murins de la maladie indiquent des altérations métaboliques et plus particulièrement des lipides dans le SW1 (Zmyslowska et al., 2017 ; Porosk et al., 2017). De par les éléments précités, l'étude de la lipogenèse au cours de la différenciation neuronale des cellules WS serait intéressante.

### *L'homéostasie calcique*

Comme évoqué dans l'introduction de ce mémoire, les ions calcium sont fondamentaux pour les neurones. Ils génèrent une grande quantité de signaux intracellulaires essentiels dans de nombreuses fonctions. De plus, le  $Ca^{2+}$  est l'un des principaux messagers des neurones. Ainsi, il est un très bon indicateur de la fonctionnalité d'un réseau neuronal notamment par l'étude de son flux. En effet, certains défauts calciques ont été identifiés dans des troubles neurologiques. Par exemple, la fréquence des oscillations de calcium est réduite dans les neurones dérivés de CSPi de patients atteints de schizophrénie (Grunwald et al., 2019) tandis que, dans les neurones dérivés de CSPi de patients atteints de troubles autistiques, c'est l'amplitude des oscillations qui est réduite (Marchetto et al., 2017). Dans le cadre du SW1, des perturbations du flux calcique ont été rapportées dans de nombreuses études. De plus, plusieurs approches thérapeutiques sont fondées sur la modulation de celui-ci, tel que le dantrolène.

Suite à l'élaboration de notre modèle de neurones corticaux, l'analyse du flux calcique a été envisagée afin de s'assurer que le réseau généré soit fonctionnel mais aussi afin d'identifier une éventuelle perturbation de celui-ci dans les cellules mutées. Il a été rapporté qu'un flux spontané de calcium est stable dans des co-cultures de neurones corticaux et d'astrocytes *in vitro* au-delà de 35 jours de différenciation (Kuijlaars et al., 2016). Cependant, des analyses préliminaires au laboratoire ont permis d'identifier que dans le cadre d'une mono-culture de neurones corticaux, il était nécessaire d'aller jusqu'à 58 jours de différenciation afin d'observer un flux spontané

stable. Toutefois, les cultures cellulaires réalisées sur de longues durées comme celle-ci comportent un certain nombre de limites. Le réseau neuronal est fragile, les changements de milieux peuvent s'avérer très délicats et le risque de contaminations est augmenté. Au sein de l'équipe, au cours de plusieurs tentatives de différenciations sur de longues durées, une limite technique récurrente est apparue : la fragilité du réseau neuronal, en particulier celle des cellules mutées qui se décrochaient spontanément au-delà de 30 jours de différenciation. Cela peut s'expliquer en partie par une dérégulation de gènes impliqués dans l'adhésion, la migration et la prolifération cellulaire. Face à cette limite technique, j'ai mis en œuvre plusieurs approches en modulant différents paramètres de culture dont le type de support de culture, la nature du coating, la fréquence de changement du milieu de culture... Tous ces efforts m'ont permis d'identifier très récemment un nouveau support qui a permis le maintien de la différenciation neuronale pendant 60 jours. De plus, ce format est particulièrement optimisé pour de l'imagerie. Les prochaines expériences de l'équipe vont donc consister à analyser le flux calcique (amplitude, fréquence...) spontané ainsi qu'à la suite d'une stimulation via des molécules.

Comme mentionné quelques lignes plus haut, il a été démontré qu'une population cellulaire était majeure pour un flux calcique stable : les astrocytes. L'analyse de cette population dans nos cultures s'avère indispensable afin de s'assurer qu'un défaut calcique ne soit pas la conséquence d'anomalies de cette population cellulaire (en termes de proportion, de morphologie ou encore de fonctionnalité). Le calcium est également indispensable au cône de croissance de l'axone pionnier afin qu'il puisse trouver sa cible. L'étude de l'homéostasie calcique au niveau de celui-ci permettrait d'analyser si des défauts précoces de guidage du cône de croissance pourraient être impliqués dans le défaut de mise en place du réseau. Enfin, l'analyse du flux calcique dans les neurones traités avec différentes molécules identifiées dans des études portant sur le SW1 serait également pertinente.

## E) Approches pharmacologiques des atteintes neurologiques du SW1

A ce jour, différentes molécules sont en essai clinique dans le cadre du syndrome de Wolfram de type 1. Parmi elles, on peut citer le dantrolène, le liraglutide ainsi que l'acide valproïque (VPA) (Mishra et al., 2021).

L'une des interrogations majeures à la suite de la découverte de notre phénotype a été d'évaluer l'effet de ces molécules sur le développement du réseau neuronal. Ces molécules ont été administrées entre J10 et J18, soit au début de l'apparition du phénotype et le réseau neuronal a été analysé. Parmi ces molécules, seul le VPA a présenté une action préventive dose-dépendante sur la croissance anormale des neurites. Cet effet est également associé à la normalisation de l'expression de certains gènes codant pour les protéines de guidage axonal. Le mécanisme d'action précis du VPA sur notre phénotype n'est pas connu, cependant différentes études ont démontré que le VPA réduisait le stress du RE (Li et al., 2017) et possédait un effet moins spécifique par le biais d'une activité inhibitrice d'histone désacétylase (Fukuchi et al., 2009). De plus, cette molécule déjà administrée dans le cadre de maladies neurodégénératives présente un effet favorisant la croissance des neurites (Tatsumi et al., 2019). Le VPA est également administré dans le contexte de l'épilepsie, trouble qui se manifeste chez certains patients du SW1 (Barrett et al., 1995 ; Scolding et al., 1996 ; Chausseot et al., 2011).

Ce médicament est actuellement en essai clinique de phase II sur les patients pédiatriques et adultes (identifiant clinicaltrial.gov : NCT03717909, également appelé *TreatWolfram*). Nos résultats ont contribué à la mise en place d'un second essai évaluant l'effet du VPA (identifiant clinicaltrial.gov : NCT04940572, également appelé *AudioWolf*). Cet essai, mené conjointement à l'essai du Pr Barrett, diffère de celui-ci par le critère d'évaluation de l'effet de la molécule. En effet, il est basé sur les capacités auditives des patients contrairement à *TreatWolfram* qui est basé sur l'acuité visuelle des patients. L'élaboration de ce second essai clinique permet d'élargir les critères d'inclusion des patients. Ainsi, nos résultats ont mis en évidence qu'un traitement au

VPA au cours de la différenciation neuronale permet de prévenir l'apparition du phénotype de défaut de pousse neuritique. Cependant, ces différenciations *in vitro* correspondent à des stades très précoces du développement humain. Les traitements réalisés ont un impact direct sur la mise en place du réseau neuronal or ce type de thérapie est inenvisageable à l'heure actuelle pour différentes raisons. Pour administrer un traitement à un patient à un stade embryonnaire aussi précoce, le diagnostic devrait avoir été réalisé dans les toutes premières semaines de grossesse. De plus, le VPA est décrit comme tératogène et entraîne un risque accru de troubles du développement psychomoteur et/ou des troubles du spectre autistique chez les enfants exposés à la molécule *in utero* (Hanold, 1986). C'est pour ces raisons que le traitement est contre indiqué en France pour les femmes enceintes (source : has-santé).

Enfin, depuis le début de mon doctorat, d'autres molécules ont été identifiées par d'autres équipes dont des stabilisateurs du  $Ca^{2+}$  (Ibutilast, JTV-519) ainsi que des chaperonnes (AMX0035, PRE-084) (Mishra et al., 2021 ; Crouzier et al., 2022). Il serait intéressant d'étudier l'effet de ces molécules sur notre modèle.

## **F) Limites et optimisation du modèle**

Bien que les approches de différenciation en 2D des CSPi aient contribué à la découverte d'un grand nombre de processus biologiques et pathologiques, ces modèles possèdent de nombreuses limites dont l'incapacité à reproduire un microenvironnement aussi riche et complexe qu'*in vivo* (Rowe and Daley, 2019). Notre modèle de neurones corticaux n'échappe pas à cette règle. Il a permis de mettre en évidence un défaut très précoce dans la mise en place du réseau neuronal mais il possède des limites liées à la nature de notre approche. En effet, la différenciation en 2D de neurones corticaux ne reflète pas la situation *in vivo* de manière globale. En condition physiologique, les cellules neuronales se développent dans un microenvironnement possédant de nombreuses interactions cellulaires, un large panel de types cellulaires variés ainsi que des contraintes physiques. Par exemple, notre

approche ne favorise pas la différenciation de types cellulaires tels que les astrocytes, les oligodendrocytes ou la microglie. De même, la structure en couches n'est pas reproduite. Le développement de protocoles de différenciation en 3D a permis de palier aux limites des protocoles en 2D et a notamment permis d'observer des mécanismes similaires à un cerveau embryonnaire tels que la formation d'un réseau cortical, un enrichissement des types cellulaires, des interactions cellulaires neurones-glie, la présence de myéline (Sloan et al., 2017 ; Marton et al., 2019) ainsi qu'une cytoarchitecture complexe (Kelley and Paşca, 2022 ; Tang et al., 2022). Ces approches ont également permis de prendre en compte les rôles des composants de la MEC puisque ceux-ci sont impliqués dans la migration, la différenciation, la survie cellulaire ainsi que la prolifération (Bonnans et al., 2014). Le développement de tels protocoles s'est révélé particulièrement pertinent dans l'étude de la mise en place des réseaux neuronaux de pathologies neurologiques telles que les troubles du spectre autistique (Chiola et al., 2022) ainsi que les microcéphalies (Lancaster et al., 2013). Bien que les analyses fonctionnelles des organoïdes soient plus complexes, elles n'ont cessé de s'améliorer ces dernières années. Ainsi, des défauts calciques ont été observés dans des organoïdes dérivés de CSPi porteuses de mutations causales de maladies telles que le syndrome Phelan Mcdermid (Miura et al., 2020), les troubles du spectre autistique (Paulsen et al., 2022) et la MA (Yin and VanDongen, 2021).

Ainsi, la complexification de notre modèle, notamment par une différenciation en 3D, permettrait d'étudier l'expression du phénotype de défaut de pousse neuritique dans un environnement plus complexe en termes de populations cellulaires et de structure. De ce fait, l'implication des autres types cellulaires dans le phénotype pourrait être investiguée. De plus, une hypomyélinisation a été rapportée chez les patients (Lugar et al., 2016). L'analyse des cellules participant à la myélinisation des axones, à savoir les oligodendrocytes, est un axe prometteur pour la compréhension des mécanismes physiopathologiques affectant le cerveau des patients. A ce jour, différents protocoles de différenciation de CSPi humaines en oligodendrocytes en 2D existent (Wang et al., 2013 ; Douvaras et al., 2014, García-León et al., 2020) mais, une

fois de plus, l'approche en 3D permettant des interactions plus nombreuses et riches ainsi qu'une myélinisation des axones, est plus judicieuse (Shaker et al., 2021).

Les protocoles s'étant largement perfectionnés et élargis, des différenciations en zones cérébrales particulièrement affectées chez les patients atteints du SW1 pourraient être envisagées comme par exemple en organoïdes de cervelet. Malgré tous ces avantages, les approches en 3D possèdent également des limites. Ces organoïdes, de par leur structures complexes, présentent une diffusion de l'oxygène ainsi que d'autres éléments nutritifs essentiels aux cellules très limitée, principalement pour les couches profondes qui les constituent. De plus, l'exploitation de ces structures se heurte à des défis de taille notamment en termes d'imagerie mais également dans le cadre de tests à haut débit. Finalement, comme les protocoles en 2D, les protocoles en 3D qui ont récemment émergé, et qui n'ont cessé de s'améliorer, possèdent des limites dont il est nécessaire de tenir compte en particulier lors de modélisation pathologique et de criblage de molécules. Cependant, ils s'avèrent particulièrement prometteurs pour la compréhension et l'identification de molécules thérapeutiques de nombreuses pathologies dont le SW1.

Enfin, une autre limite de notre approche qui semble peu compatible avec le développement de modèle 3D, concerne la lignée « rescue » élaborée. Cet outil innovant et puissant est notamment limité par la nécessité de traitements répétés de doxycycline afin d'induire l'expression de la protéine étant donné que le cDNA codant pour la wolframine a été placé sous un promoteur inductible à la doxycycline. Cependant, il a été montré que des traitements répétés de cet antibiotique sont à l'origine d'une modification de l'expression de certains gènes du métabolisme, une diminution de la prolifération cellulaire ainsi que des défauts des fonctions mitochondriales (Ahler et al., 2013 ; Luger et al., 2018 ; De Boeck and Verfaillie, 2021). Bien que les traitements à la doxycycline des lignées mutées (non corrigées) n'aient pas eu d'effet sur le phénotype de pousse neuritique, l'équipe travaille actuellement sur l'élaboration de lignées isogéniques. La correction directe du gène ou l'induction de mutations au sein de celui-ci notamment par des approches d'édition de base

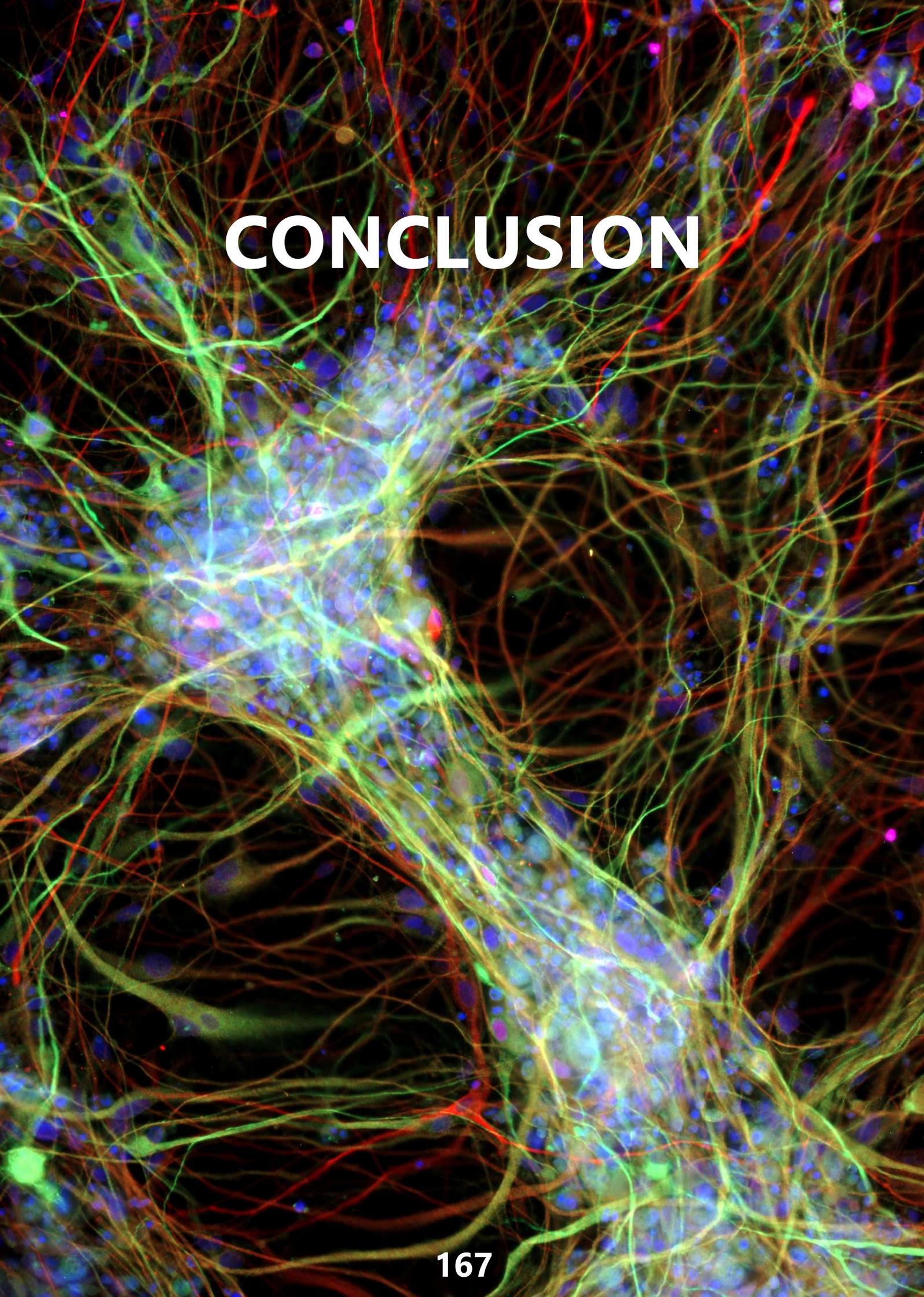
permettent ainsi de s'affranchir de l'utilisation de molécules telles que la doxycycline. C'est notamment par le biais de cette approche qu'une équipe est parvenue récemment à générer trois lignées isogéniques à partir de CSPi de patients atteints du SW1 (Nami et al., 2021).

### **G) Atteintes neurodéveloppementales et neurodégénératives : liées ?**

La découverte d'atteintes neurologiques précoces chez les patients a soulevé de nouvelles interrogations dans le cadre des recherches sur le SW1. En particulier, on peut se demander s'il existe une relation entre les défauts neurodéveloppementaux identifiés, dont le phénotype de défaut de pousse neuritique, et les phénomènes neurodégénératifs qui se manifestent des années après. Bien qu'actuellement au stade de spéculation, il convient de mentionner que plusieurs auteurs ont émis l'hypothèse d'un lien entre ces deux événements distincts temporellement pour d'autres maladies neurodégénératives à apparition tardive. C'est notamment le cas dans une étude réalisée par Lin et al., qui a montré que des polymorphismes mononucléotidiques dans les gènes de guidage axonal étaient prédictifs de différentes évolutions de la maladie de Parkinson (Lin et al., 2009). Depuis, cette observation a été étendue à d'autres maladies neurodégénératives (Van Battum et al., 2015). Plus particulièrement, l'altération du bourgeonnement axonal a été hypothétiquement associée à la dérégulation des protéines de guidage axonal dans l'ALS. Le guidage axonal est fondamental pour l'élaboration d'une connectivité et une fonctionnalité efficace des neurones dans le SNC. Il a ainsi été suggéré que des perturbations des processus développementaux nécessitant un guidage axonal puissent être compensés de manière ponctuelle, sur une durée plus ou moins importante, mais conduisent finalement à la dégénérescence cellulaire (Lin et al., 2009 ; Van Battum et al., 2015 ; Stoeckli et al., 2018, Schwamborn, 2018). Enfin, des défauts subtils dans les protéines impliquées au cours du neurodéveloppement ainsi que dans la neuroplasticité adulte

peuvent contribuer à une neurodégénérescence tardive (Roig-Puiggros et al., 2020). Une approche de modélisation des atteintes neurologiques par le développement d'organoïdes cérébraux est particulièrement pertinente dans ce contexte. En effet, le maintien des organoïdes en culture est moins complexe et fragile que les différenciations en 2D, rendant ainsi des cultures sur plus d'une année possible. Ainsi des analyses peuvent être réalisées à différents temps : au début de la différenciation (modélisant les premières étapes de la mise en place du cortex) mais aussi très loin dans la différenciation (modélisant un réseau plus mature, fonctionnel et âgé). De même, cette approche permettrait d'étudier les conséquences du défaut de pousse neuritique et de guidage axonal sur la mise en place des connexions entre différentes populations neuronales. On peut en effet supposer que si des anomalies de connexions cérébrales existaient, celles-ci pourraient *in fine* aboutir à des processus neurodégénératifs.





# CONCLUSION



Au cours de ce travail de thèse, j'ai pu participer au développement d'un modèle *in vitro* humain innovant, permettant de modéliser et d'étudier les mécanismes à l'origine des atteintes neurologiques du SW1. Ces travaux ont notamment permis de mettre en évidence un défaut précoce de mise en place du réseau neuronal. Ce défaut a été corrélé à une dérégulation de différents gènes impliqués dans la mise en place du système nerveux, la neurogenèse et le guidage axonal. L'identification de ce défaut majeur dans les cellules mutées a permis de renforcer les observations réalisées chez les patients affirmant la nécessité de requalifier le SW1 non seulement en maladie neurodégénérative mais également en maladie neurodéveloppementale. L'effet du VPA sur ce phénotype a également été mis en évidence. De plus, l'élaboration de notre modèle a permis l'initiation de différentes collaborations pendant ma thèse qui ont pour objectifs de mieux appréhender les mécanismes physiopathologiques des atteintes neurologiques. C'est notamment le cas de l'étude du rôle des mitochondries initiées respectivement avec le Dr Rak / l'équipe du Dr Sarkar (mitochondries) et l'équipe du Pr Barrett / Dr Sarkar (autophagie). Nous sommes également en train d'étudier le rôle de l'autophagie dans les atteintes neurologiques du SW en collaboration avec l'équipe du Dr Sarkar. Ces axes sont très prometteurs tant dans la compréhension de la pathologie que dans le développement de thérapeutiques du syndrome.

Bien qu'apportant un élément supplémentaire en faveur du caractère neurodéveloppemental du SW1, notre modèle renforce l'interrogation autour d'un potentiel lien entre ces défauts précoces et les défauts plus tardifs, neurodégénératifs, décrits jusqu'à présent. Une approche de modélisation par des modèles d'organoïdes cérébraux est un outil en cours d'acquisition par l'équipe qui permettrait de répondre à certaines de ces interrogations.

Enfin, nos résultats soulèvent également la question de l'atteinte d'autres populations neuronales telles que les cellules ganglionnaires de la rétine (RGC). Savoir si ces cellules présentes le même type de défaut que ceux observés dans notre modèle de neurones corticaux reste une interrogation qu'il serait intéressant d'étudier.

Au-delà de l'aspect purement scientifique de ce projet de thèse, j'ai eu la chance de participer à un projet ambitieux et innovant à partir du développement d'un modèle cellulaire, sa caractérisation, la découverte d'un nouveau phénotype jusqu'à l'élaboration d'une lignée rescue et l'identification de molécules ayant un effet thérapeutique. Bien que de nombreuses nouvelles questions aient émergé, je ne peux que constater les progrès de la recherche sur le SW1. Les nombreuses avancées en termes de complexification des modèles cellulaires et animaux ainsi que les techniques d'édition génique ont permis l'élaboration de nouveaux modèles du SW1 et la compréhension de mécanismes physiopathologiques du syndrome. Toutes ces avancées ont contribué à la découverte des thérapeutiques actuelles pour les patients ainsi que l'accélération des recherches sur les atteintes neurologiques. Alors qu'aucun traitement n'existait au début de mon stage de Master 1 au sein de l'équipe en 2017, trois molécules sont actuellement en essai clinique et plusieurs molécules au potentiel thérapeutique prometteur ont été identifiées.





## REFERENCES BIBLIOGRAPHIES

### A

Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, Vassena R, Bilić J, Pekarik V, Tiscornia G, Edel M, Boué S, Izpisua Belmonte JC. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol.* 2008 Nov;26(11):1276-84.

Abe K, Katsuno H, Toriyama M, Baba K, Mori T, Hakoshima T, Kanemura Y, Watanabe R, Inagaki N. Grip and slip of L1-CAM on adhesive substrates direct growth cone haptotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018 Mar 13;115(11):2764-2769.

Abreu D, Asada R, Revilla JMP, Lavagnino Z, Kries K, Piston DW, Urano F. Wolfram syndrome 1 gene regulates pathways maintaining beta-cell health and survival. *Lab Invest.* 2020 Jun;100(6):849-862.

Abreu D, Stone SI, Pearson TS, Bucelli RC, Simpson AN, Hurst S, Brown CM, Kries K, Onwumere C, Gu H, Hoekel J, Tychem L, Van Stavern GP, White NH, Marshall BA, Hershey T, Urano F. A phase Ib/IIa clinical trial of dantrolene sodium in patients with Wolfram syndrome. *JCI Insight.* 2021 Aug 9;6(15):e145188.

Abreu D, Urano F. Current Landscape of Treatments for Wolfram Syndrome. *Trends Pharmacol Sci.* 2019 Oct;40(10):711-714.

Agirman G, Broix L, Nguyen L. Cerebral cortex development: an outside-in perspective. *FEBS Lett.* 2017 Dec;591(24):3978-3992.

Ahler E, Sullivan WJ, Cass A, Braas D, York AG, Bensinger SJ, Graeber TG, Christofk HR. Doxycycline alters metabolism and proliferation of human cell lines. *PLoS One.* 2013 May 31;8(5):e64561.

Al Abbar A, Ngai SC, Nograles N, Alhaji SY, Abdullah S. Induced Pluripotent Stem Cells: Reprogramming Platforms and Applications in Cell Replacement Therapy. *Biores Open Access.* 2020 Apr 28;9(1):121-136.

Alfaro D, Rodríguez-Sosa MR, Zapata AG. Eph/ephrin Signaling and Biology of Mesenchymal Stromal/Stem Cells. *J Clin Med.* 2020 Jan 22;9(2):310.

Alfaro R, Doty T, Narayanan A, Lugar H, Hershey T, Pepino MY. Taste and smell function in Wolfram syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 2020 Feb 22;15(1):57.

Angebault C, Fauconnier J, Patergnani S, Rieusset J, Danese A, Affortit CA, Jagodzinska J, Mégy C, Quiles M, Cazevielle C, Korchagina J, Bonnet-Wersinger D, Milea D, Hamel C, Pinton P, Thiry M, Lacampagne A, Delprat B, Delettre C. ER-mitochondria cross-talk is regulated by the Ca<sup>2+</sup> sensor NCS1 and is impaired in Wolfram syndrome. *Sci Signal.* 2018 Oct 23;11(553):eaaq1380.

Ansar M, Santos-Cortez RL, Saqib MA, Zulfiqar F, Lee K, Ashraf NM, Ullah E, Wang X, Sajid S, Khan FS, Amin-ud-Din M; University of Washington Center for Mendelian Genomics, Smith JD, Shendure J, Bamshad MJ, Nickerson DA, Hameed A, Riazuddin S, Ahmed ZM, Ahmad W, Leal SM. Mutation of ATF6 causes autosomal recessive achromatopsia. *Hum Genet.* 2015 Sep;134(9):941-50.

Antonell A, Lladó A, Altirriba J, Botta-Orfila T, Balasa M, Fernández M, Ferrer I, Sánchez-Valle R, Molinuevo JL. A preliminary study of the whole-genome expression profile of sporadic and

monogenic early-onset Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2013 Jul;34(7):1772-8.

Aoi T, Yae K, Nakagawa M, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K, Chiba T, Yamanaka S. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science*. 2008 Aug 1;321(5889):699-702.

Araki R, Hoki Y, Uda M, Nakamura M, Jincho Y, Tamura C, Sunayama M, Ando S, Sugiura M, Yoshida MA, Kasama Y, Abe M. Crucial role of c-Myc in the generation of induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*. 2011 Sep;29(9):1362-70.

Area-Gomez E, de Groof A, Bonilla E, Montesinos J, Tanji K, Boldogh I, Pon L, Schon EA. A key role for MAM in mediating mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease. *Cell Death Dis*. 2018 Feb 28;9(3):335.

Asanad S, Wu J, Nassisi M, Ross-Cisneros FN, Sadun AA. Optical coherence tomography-angiography in Wolfram syndrome: a mitochondrial etiology in disease pathophysiology. *Can J Ophthalmol*. 2019 Feb;54(1):e27-e30.

Ashton RS, Conway A, Pangarkar C, Bergen J, Lim KI, Shah P, Bissell M, Schaffer DV. Astrocytes regulate adult hippocampal neurogenesis through ephrin-B signaling. *Nat Neurosci*. 2012 Oct;15(10):1399-406.

Assou S, Bouckenheimer J, De Vos J. Concise Review: Assessing the Genome Integrity of Human Induced Pluripotent Stem Cells: What Quality Control Metrics? *Stem Cells*. 2018 Jun;36(6):814-821.

Assou S, Girault N, Plinet M, Bouckenheimer J, Sansac C, Combe M, Mianné J, Bourguignon C, Fieldes M, Ahmed E, Commes T, Boureux A, Lemaître JM, De Vos J. Recurrent Genetic Abnormalities in Human Pluripotent Stem Cells: Definition and Routine Detection in Culture Supernatant by Targeted Droplet Digital PCR. *Stem Cell Reports*. 2020 Jan 14;14(1):1-8.

Atamian A, Cordon-Barris L, Quadrato G. Taming human brain organoids one cell at a time. *Semin Cell Dev Biol*. 2021 Mar;111:23-31.

Atouf F, Czernichow P, Scharfmann R. Expression of neuronal traits in pancreatic beta cells. Implication of neuron-restrictive silencing factor/repressor element silencing transcription factor, a neuron-restrictive silencer. *J Biol Chem*. 1997 Jan 17;272(3):1929-34.

Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev*. 2003 Jan 1;17(1):126-40.

Avior Y, Sagi I, Benvenisty N. Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016 Mar;17(3):170-82.

## B

Bababegy SR, Wang MY, Khaderi KR, Sadun AA. Visual improvement with the use of idebenone in the treatment of Wolfram syndrome. *J Neuroophthalmol*. 2012 Dec;32(4):386-9.

Back SH, Scheuner D, Han J, Song B, Ribick M, Wang J, Gildersleeve RD, Pennathur S, Kaufman RJ. Translation attenuation through eIF2alpha phosphorylation prevents oxidative stress and maintains

the differentiated state in beta cells. *Cell Metab.* 2009 Jul;10(1):13-26.

Ban H, Nishishita N, Fusaki N, Tabata T, Saeki K, Shikamura M, Takada N, Inoue M, Hasegawa M, Kawamata S, Nishikawa S. Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Aug 23;108(34):14234-9.

Banito A, Rashid ST, Acosta JC, Li S, Pereira CF, Geti I, Pinho S, Silva JC, Azuara V, Walsh M, Vallier L, Gil J. Senescence impairs successful reprogramming to pluripotent stem cells. *Genes Dev.* 2009 Sep 15;23(18):2134-9.

Barnes AP, Polleux F. Establishment of axon-dendrite polarity in developing neurons. *Annu Rev Neurosci.* 2009;32:347-81.

Bar-Nur O, Russ HA, Efrat S, Benvenisty N. Epigenetic memory and preferential lineage-specific differentiation in induced pluripotent stem cells derived from human pancreatic islet beta cells. *Cell Stem Cell.* 2011 Jul 8;9(1):17-23.: 21726830.

Barquilla A, Pasquale EB. Eph receptors and ephrins: therapeutic opportunities. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2015;55:465-87.

Barrett TG, Bunday SE, Fielder AR, Good PA. Optic atrophy in Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *Eye (Lond).* 1997;11 ( Pt 6):882-8.

Barrett TG, Bunday SE, Macleod AF. Neurodegeneration and diabetes: UK nationwide study of Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *Lancet.* 1995 Dec 2;346(8988):1458-63.

Barrett TG, Bunday SE. Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *J Med Genet.* 1997 Oct;34(10):838-41.

Batchuluun B, Pinkosky SL, Steinberg GR. Lipogenesis inhibitors: therapeutic opportunities and challenges. *Nat Rev Drug Discov.* 2022 Apr;21(4):283-305.

Batjargal K, Tajima T, Jimbo EF, Yamagata T. Effect of 4-phenylbutyrate and valproate on dominant mutations of WFS1 gene in Wolfram syndrome. *J Endocrinol Invest.* 2020 Sep;43(9):1317-1325.

Battista M, Cascavilla ML, Grosso D, Borrelli E, Frontino G, Amore G, Carbonelli M, Bonfanti R, Rigamonti A, Barresi C, Viganò C, Tombolini B, Crepaldi A, Montemagni M, La Morgia C, Bandello F, Barboni P. Retinal vascular impairment in Wolfram syndrome: an optical coherence tomography angiography study. *Sci Rep.* 2022 Feb 8;12(1):2103.

Bassett AR. Editing the genome of hiPSC with CRISPR/Cas9: disease models. *Mamm Genome.* 2017 Aug;28(7-8):348-364.

Bassez G, Audureau E, Hogrel JY, Arrouasse R, Baghdoyan S, Bhugaloo H, Gourlay-Chu ML, Le Corvoisier P, Peschanski M. Improved mobility with metformin in patients with myotonic dystrophy type 1: a randomized controlled trial. *Brain.* 2018 Oct 1;141(10):2855-2865.

Baumer FM, Song JW, Mitchell PD, Pienaar R, Sahin M, Grant PE, Takahashi E. Longitudinal changes in diffusion properties in white matter pathways of children with tuberous sclerosis complex. *Pediatr*

Neurol. 2015 Jun;52(6):615-23.

Baxter M, Withey S, Harrison S, Segeritz CP, Zhang F, Atkinson-Dell R, Rowe C, Gerrard DT, Sison-Young R, Jenkins R, Henry J, Berry AA, Mohamet L, Best M, Fenwick SW, Malik H, Kitteringham NR, Goldring CE, Piper Hanley K, Vallier L, Hanley NA. Phenotypic and functional analyses show stem cell-derived hepatocyte-like cells better mimic fetal rather than adult hepatocytes. *J Hepatol.* 2015 Mar;62(3):581-9.

Bekirov IH, Nagy V, Svoronos A, Huntley GW, Benson DL. Cadherin-8 and N-cadherin differentially regulate pre- and postsynaptic development of the hippocampal mossy fiber pathway. *Hippocampus.* 2008;18(4):349-63.

Bellin M, Marchetto MC, Gage FH, Mummery CL. Induced pluripotent stem cells: the new patient? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012 Nov;13(11):713-26.

Benchoua A, Lasbareilles M, Tournois J. Contribution of Human Pluripotent Stem Cell-Based Models to Drug Discovery for Neurological Disorders. *Cells.* 2021 Nov 24;10(12):3290.

Ben-David U, Benvenisty N. The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nat Rev Cancer.* 2011 Apr;11(4):268-77.

Benes FM, Turtle M, Khan Y, Farol P. Myelination of a key relay zone in the hippocampal formation occurs in the human brain during childhood, adolescence, and adulthood. *Arch Gen Psychiatry.* 1994 Jun;51(6):477-84.

Bengoa-Vergniory N, Kypta RM. Canonical and noncanonical Wnt signaling in neural stem/progenitor cells. *Cell Mol Life Sci.* 2015 Nov;72(21):4157-72.

Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2000 Oct;1(1):11-21.

Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol.* 2000 Jun;2(6):326-32.

Besson A, Dowdy SF, Roberts JM. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell.* 2008 Feb;14(2):159-69.

Bischoff AN, Reiersen AM, Buttlair A, Al-Lozi A, Doty T, Marshall BA, Hershey T; Washington University Wolfram Syndrome Research Group. Selective cognitive and psychiatric manifestations in Wolfram Syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 2015 May 30;10:66.

Blackstone C. Hereditary spastic paraplegia. *Handb Clin Neurol.* 2018;148:633-652.

Boissart C, Poulet A, Georges P, Darville H, Julita E, Delorme R, Bourgeron T, Peschanski M, Benchoua A. Differentiation from human pluripotent stem cells of cortical neurons of the superficial layers amenable to psychiatric disease modeling and high-throughput drug screening. *Transl Psychiatry.* 2013 Aug 20;3(8):e294.

Boldog E, Bakken TE, Hodge RD, Novotny M, Aevermann BD, Baka J, Bordé S, Close JL, Diez-Fuertes F, Ding SL, Faragó N, Kocsis ÁK, Kovács B, Maltzer Z, McCarrison JM, Miller JA, Molnár G, Oláh G,

Ozsvár A, Rózsa M, Shehata SI, Smith KA, Sunkin SM, Tran DN, Venepally P, Wall A, Puskás LG, Barzó P, Steemers FJ, Schork NJ, Scheuermann RH, Lasken RS, Lein ES, Tamás G. Transcriptomic and morphophysiological evidence for a specialized human cortical GABAergic cell type. *Nat Neurosci*. 2018 Sep;21(9):1185-1195.

Bommiasamy H, Back SH, Fagone P, Lee K, Meshinchi S, Vink E, Sriburi R, Frank M, Jackowski S, Kaufman RJ, Brewer JW. ATF6alpha induces XBP1-independent expansion of the endoplasmic reticulum. *J Cell Sci*. 2009 May 15;122(Pt 10):1626-36.

Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014 Dec;15(12):786-801.

Bonnet Wersinger D, Benkafadar N, Jagodzinska J, Hamel C, Tanizawa Y, Lenaers G, Delettre C. Impairment of visual function and retinal ER stress activation in *Wfs1*-deficient mice. *PLoS One*. 2014 May 13;9(5):e97222.

Bossers K, Meerhoff G, Balesar R, van Dongen JW, Kruse CG, Swaab DF, Verhaagen J. Analysis of gene expression in Parkinson's disease: possible involvement of neurotrophic support and axon guidance in dopaminergic cell death. *Brain Pathol*. 2009 Jan;19(1):91-107.

Brandizzi F, Barlowe C. Organization of the ER-Golgi interface for membrane traffic control. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013 Jun;14(6):382-92.

Brennand KJ, Simone A, Jou J, Gelboin-Burkhart C, Tran N, Sangar S, Li Y, Mu Y, Chen G, Yu D, McCarthy S, Sebat J, Gage FH. Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011 May 12;473(7346):221-5.

Briggs R, King TJ. Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1952 May;38(5):455-63.

Bromhall JD. Nuclear transplantation in the rabbit egg. *Nature*. 1975 Dec 25;258(5537):719-22.

Brouwer M, Zhou H, Nadif Kasri N. Choices for Induction of Pluripotency: Recent Developments in Human Induced Pluripotent Stem Cell Reprogramming Strategies. *Stem Cell Rev Rep*. 2016 Feb;12(1):54-72.

Bruce FM, Brown S, Smith JN, Fuerst PG, Erskine L. DSCAM promotes axon fasciculation and growth in the developing optic pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Feb 14;114(7):1702-1707.

Bundesen LQ, Scheel TA, Bregman BS, Kromer LF. Ephrin-B2 and EphB2 regulation of astrocyte-meningeal fibroblast interactions in response to spinal cord lesions in adult rats. *J Neurosci*. 2003 Aug 27;23(21):7789-800.

Bunday S, Poulton K, Whitwell H, Curtis E, Brown IA, Fielder AR. Mitochondrial abnormalities in the DIDMOAD syndrome. *J Inher Metab Dis*. 1992;15(3):315-9.

Burkhardt MF, Martinez FJ, Wright S, Ramos C, Volfson D, Mason M, Garnes J, Dang V, Lievers J, Shoukat-Mumtaz U, Martinez R, Gai H, Blake R, Vaisberg E, Grskovic M, Johnson C, Irion S, Bright J, Cooper B, Nguyen L, Griswold-Prenner I, Javaherian A. A cellular model for sporadic ALS using patient-derived induced pluripotent stem cells. *Mol Cell Neurosci*. 2013 Sep;56:355-64.

Busskamp V, Lewis NE, Guye P, Ng AH, Shipman SL, Byrne SM, Sanjana NE, Murn J, Li Y, Li S, Stadler M, Weiss R, Church GM. Rapid neurogenesis through transcriptional activation in human stem cells. *Mol Syst Biol*. 2014 Nov 17;10(11):760.

Butterfield DA, Halliwell B. Oxidative stress, dysfunctional glucose metabolism and Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci*. 2019 Mar;20(3):148-160.

Byers B, Lee HL, Reijo Pera R. Modeling Parkinson's disease using induced pluripotent stem cells. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2012 Jun;12(3):237-42.

## C

Cagalinec M, Liiv M, Hodurova Z, Hickey MA, Vaarmann A, Mandel M, Zeb A, Choubey V, Kuum M, Safiulina D, Vasar E, Veksler V, Kaasik A. Role of Mitochondrial Dynamics in Neuronal Development: Mechanism for Wolfram Syndrome. *PLoS Biol*. 2016 Jul 19;14(7):e1002511.

Cagalinec M, Zahradníková A, Zahradníková A Jr, Kováčová D, Paulis L, Kureková S, Hot'ka M, Pavelková J, Plaas M, Novotová M, Zahradník I. Calcium Signaling and Contractility in Cardiac Myocyte of Wolfram Deficient Rats. *Front Physiol*. 2019 Mar 13;10:172.

Caiazzo M, Giannelli S, Valente P, Lignani G, Carissimo A, Sessa A, Colasante G, Bartolomeo R, Massimino L, Ferroni S, Settembre C, Benfenati F, Broccoli V. Direct conversion of fibroblasts into functional astrocytes by defined transcription factors. *Stem Cell Reports*. 2015 Jan 13;4(1):25-36.

Caicedo A, Zambrano K, Sanon S, Gavilanes AWD. Extracellular mitochondria in the cerebrospinal fluid (CSF): Potential types and key roles in central nervous system (CNS) physiology and pathogenesis. *Mitochondrion*. 2021 May;58:255-269.

Camp JG, Badsha F, Florio M, Kanton S, Gerber T, Wilsch-Bräuninger M, Lewitus E, Sykes A, Hevers W, Lancaster M, Knoblich JA, Lachmann R, Pääbo S, Huttner WB, Treutlein B. Human cerebral organoids recapitulate gene expression programs of fetal neocortex development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Dec 22;112(51):15672-7.

Çamtosun E, Şıklar Z, Kocaay P, Ceylaner S, Flanagan SE, Ellard S, Berberoğlu M. Three cases of Wolfram syndrome with different clinical aspects. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2015 Mar;28(3-4):433-8.

Cano A, Molines L, Valéro R, Simonin G, Paquis-Flucklinger V, Vialettes B; French Group of Wolfram Syndrome. Microvascular diabetes complications in Wolfram syndrome (diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy, and deafness [DIDMOAD]): an age- and duration-matched comparison with common type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2007 Sep;30(9):2327-30.

Carreras-Sureda A, Pihán P, Hetz C. The Unfolded Protein Response: At the Intersection between Endoplasmic Reticulum Function and Mitochondrial Bioenergetics. *Front Oncol*. 2017 Apr 3;7:55.

Carson MJ, Slager UT, Steinberg RM. Simultaneous occurrence of diabetes mellitus, diabetes insipidus, and optic atrophy in a brother and sister. *Am J Dis Child*. 1977 Dec;131(12):1382-5.

Catalano A, Bellone F, Cicala G, Giandalia A, Morabito N, Cucinotta D, Russo GT. Multiple fractures

and impaired bone metabolism in Wolfram syndrome: a case report. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2017 May-Aug;14(2):254-257.

Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell.* 2003 May 30;113(5):643-55.

Chambers SM, Fasano CA, Papapetrou EP, Tomishima M, Sadelain M, Studer L. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol.* 2009 Mar;27(3):275-80.

Charbord J, Poydenot P, Bonnefond C, Feyeux M, Casagrande F, Brinon B, Francelle L, Aurégan G, Guillermier M, Cailleret M, Viegas P, Nicoleau C, Martinat C, Brouillet E, Cattaneo E, Peschanski M, Lechuga M, Perrier AL. High throughput screening for inhibitors of REST in neural derivatives of human embryonic stem cells reveals a chemical compound that promotes expression of neuronal genes. *Stem Cells.* 2013 Sep;31(9):1816-28.

Chaussonot A, Bannwarth S, Rouzier C, Vialettes B, Mkadem SA, Chabrol B, Cano A, Labauge P, Paquis-Flucklinger V. Neurologic features and genotype-phenotype correlation in Wolfram syndrome. *Ann Neurol.* 2011 Mar;69(3):501-8.

Chen SW, Hung YS, Fuh JL, Chen NJ, Chu YS, Chen SC, Fann MJ, Wong YH. Efficient conversion of human induced pluripotent stem cells into microglia by defined transcription factors. *Stem Cell Reports.* 2021 May 11;16(5):1363-1380.

Chen YA, Lu IL, Tsai JW. Contactin-1/F3 Regulates Neuronal Migration and Morphogenesis Through Modulating RhoA Activity. *Front Mol Neurosci.* 2018 Nov 20;11:422.

Chen ZL, Haegeli V, Yu H, Strickland S. Cortical deficiency of laminin gamma1 impairs the AKT/GSK-3beta signaling pathway and leads to defects in neurite outgrowth and neuronal migration. *Dev Biol.* 2009 Mar 1;327(1):158-68.

Chen ZL, Strickland S. Laminin gamma1 is critical for Schwann cell differentiation, axon myelination, and regeneration in the peripheral nerve. *J Cell Biol.* 2003 Nov 24;163(4):889-99.

Chiola S, Edgar NU, Shcheglovitov A. iPSC toolbox for understanding and repairing disrupted brain circuits in autism. *Mol Psychiatry.* 2022 Jan;27(1):249-258.

Cho YM, Jang YS, Jang YM, Chung SM, Kim HS, Lee JH, Jeong SW, Kim IK, Kim JJ, Kim KS, Kwon OJ. Induction of unfolded protein response during neuronal induction of rat bone marrow stromal cells and mouse embryonic stem cells. *Exp Mol Med.* 2009 Jun 30;41(6):440-52.

Chojnacki AK, Mak GK, Weiss S. Identity crisis for adult periventricular neural stem cells: subventricular zone astrocytes, ependymal cells or both? *Nat Rev Neurosci.* 2009 Feb;10(2):153-63.

Chu P, Staff WG, Morris JA, Polak JM. DIDMOAD syndrome with megacystis and megaureter. *Postgrad Med J.* 1986 Sep;62(731):859-63.

Clevers H. STEM CELLS. What is an adult stem cell? *Science.* 2015 Dec 11;350(6266):1319-20.

Connors BW, Gutnick MJ. Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons. *Trends Neurosci.* 1990 Mar;13(3):99-104.

Conti L, Cattaneo E. Neural stem cell systems: physiological players or in vitro entities? *Nat Rev Neurosci.* 2010 Mar;11(3):176-87.

Coulthard MG, Morgan M, Woodruff TM, Arumugam TV, Taylor SM, Carpenter TC, Lackmann M, Boyd AW. Eph/Ephrin signaling in injury and inflammation. *Am J Pathol.* 2012 Nov;181(5):1493-503.

Cowan CA, Atienza J, Melton DA, Eggan K. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science.* 2005 Aug 26;309(5739):1369-73.

Cox RW. Renal failure in Wolfram's syndrome. *Diabetes Care.* 1993 Apr;16(4):662-3.

Cremers CW, Wijdeveld PG, Pinckers AJ. Juvenile diabetes mellitus, optic atrophy, hearing loss, diabetes insipidus, atonia of the urinary tract and bladder, and other abnormalities (Wolfram syndrome). A review of 88 cases from the literature with personal observations on 3 new patients. *Acta Paediatr Scand Suppl.* 1977;(264):1-16.

Crouzier L, Danese A, Yasui Y, Richard EM, Liévens JC, Patergnani S, Couly S, Diez C, Denus M, Cubedo N, Rossel M, Thiry M, Su TP, Pinton P, Maurice T, Delprat B. Activation of the sigma-1 receptor chaperone alleviates symptoms of Wolfram syndrome in preclinical models. *Sci Transl Med.* 2022 Feb 9;14(631):eabh3763.

Csöbönyeiová M, Danišovič Ľ, Polák Š. Recent advances in iPSC technologies involving cardiovascular and neurodegenerative disease modeling. *Gen Physiol Biophys.* 2016 Jan;35(1):1-12.

Curinga G, Smith GM. Molecular/genetic manipulation of extrinsic axon guidance factors for CNS repair and regeneration. *Exp Neurol.* 2008 Feb;209(2):333-42. PMC2255571.

Cuttler K, Hassan M, Carr J, Cloete R, Bardien S. Emerging evidence implicating a role for neurexins in neurodegenerative and neuropsychiatric disorders. *Open Biol.* 2021 Oct;11(10):210091.

Czogalla A, Sikorski AF. Spectrin and calpain: a 'target' and a 'sniper' in the pathology of neuronal cells. *Cell Mol Life Sci.* 2005 Sep;62(17):1913-24.

## D

D'Amour KA, Agulnick AD, Eliazar S, Kelly OG, Kroon E, Baetge EE. Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. *Nat Biotechnol.* 2005 Dec;23(12):1534-41. .

D'Antonio-Chronowska A, Farley EK, Frazer KA. Large-Scale Profiling Reveals the Influence of Genetic Variation on Gene Expression in Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell.* 2017 Apr 6;20(4):533-546.e7

Davion JB, Kuchcinski G, Viard R, Dumont J, Pruvo JP, Leclerc X, Outteryck O, Lopes R. A Fully Automatic Method for Optic Radiation Tractography Applicable to Multiple Sclerosis Patients. *Brain Topogr.* 2020 Jul;33(4):533-544.

De Boeck J, Verfaillie C. Doxycycline inducible overexpression systems: how to induce your gene of

interest without inducing misinterpretations. *Mol Biol Cell*. 2021 Aug 15;32(17):1517-1522.

DeBoever C, Li H, Jakubosky D, Benaglio P, Reyna J, Olson KM, Huang H, Biggs W, Sandoval E, D'Antonio M, Jepsen K, Matsui H, Arias A, Ren B, Nariai N, Smith EN, D'Antonio-Chronowska A, Farley EK, Frazer KA. Large-Scale Profiling Reveals the Influence of Genetic Variation on Gene Expression in Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2017 Apr 6;20(4):533-546.e7.

De Camilli P, Cameron R, Greengard P. Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. I. Its general distribution in synapses of the central and peripheral nervous system demonstrated by immunofluorescence in frozen and plastic sections. *J Cell Biol*. 1983 May;96(5):1337-54.

De Falco M, Manente L, Lucariello A, Baldi G, Fiore P, Laforgia V, Baldi A, Iannaccone A, De Luca A. Localization and distribution of wolframin in human tissues. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2012 Jan 1;4(5):1986-98.

De Filippis B, Valenti D, Chiodi V, Ferrante A, de Bari L, Fiorentini C, Domenici MR, Ricceri L, Vacca RA, Fabbri A, Laviola G. Modulation of Rho GTPases rescues brain mitochondrial dysfunction, cognitive deficits and aberrant synaptic plasticity in female mice modeling Rett syndrome. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2015 Jun;25(6):889-901.

Degano AL, Pasterkamp RJ, Ronnett GV. MeCP2 deficiency disrupts axonal guidance, fasciculation, and targeting by altering Semaphorin 3F function. *Mol Cell Neurosci*. 2009 Nov;42(3):243-54.

De Heredia ML, Clèries R, Nunes V. Genotypic classification of patients with Wolfram syndrome: insights into the natural history of the disease and correlation with phenotype. *Genet Med*. 2013 Jul;15(7):497-506.

Delépine M, Nicolino M, Barrett T, Golamaully M, Lathrop GM, Julier C. EIF2AK3, encoding translation initiation factor 2-alpha kinase 3, is mutated in patients with Wolcott-Rallison syndrome. *Nat Genet*. 2000 Aug;25(4):406-9.

Deloulme JC, Gory-Fauré S, Mauconduit F, Chauvet S, Jonckheere J, Boulan B, Mire E, Xue J, Jany M, Maucler C, Deparis AA, Montigon O, Daoust A, Barbier EL, Bosc C, Deglon N, Brocard J, Denarier E, Le Brun I, Pernet-Gallay K, Vilgrain I, Robinson PJ, Lahrech H, Mann F, Andrieux A. Microtubule-associated protein 6 mediates neuronal connectivity through Semaphorin 3E-dependent signalling for axonal growth. *Nat Commun*. 2015 Jun 3;6:7246.

Delprat B, Maurice T, Delettre C. Wolfram syndrome: MAMs' connection? *Cell Death Dis*. 2018 Mar 6;9(3):364.

Delprat, Benjamin; Rieusset, Jennifer; Delettre, Cécile (2019). Defective Endoplasmic Reticulum–Mitochondria Connection Is a Hallmark of Wolfram Syndrome. *Contact*, 2(), 251525641984740–.

De Masi C, Spitalieri P, Murdocca M, Novelli G, Sangiuolo F. Application of CRISPR/Cas9 to human-induced pluripotent stem cells: from gene editing to drug discovery. *Hum Genomics*. 2020 Jun 26;14(1):25.

Dent EW, Kalil K. Axon branching requires interactions between dynamic microtubules and actin filaments. *J Neurosci*. 2001 Dec 15;21(24):9757-69.

Dogterom M, Koenderink GH. Actin-microtubule crosstalk in cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019 Jan;20(1):38-54.

Devine MJ, Kittler JT. Mitochondria at the neuronal presynapse in health and disease. *Nat Rev Neurosci.* 2018 Jan 19;19(2):63-80.

Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, Croft GF, Saphier G, Leibel R, Goland R, Wichterle H, Henderson CE, Eggan K. Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science.* 2008 Aug 29;321(5893):1218-21.

Dolmetsch R, Geschwind DH. The human brain in a dish: the promise of iPSC-derived neurons. *Cell.* 2011 Jun 10;145(6):831-4.

Dong CM, Wang XL, Wang GM, Zhang WJ, Zhu L, Gao S, Yang DJ, Qin Y, Liang QJ, Chen YL, Deng HT, Ning K, Liang AB, Gao ZL, Xu J. A stress-induced cellular aging model with postnatal neural stem cells. *Cell Death Dis.* 2014 Mar 13;5(3):e11116.

Dontchev VD, Letourneau PC. Nerve growth factor and semaphorin 3A signaling pathways interact in regulating sensory neuronal growth cone motility. *J Neurosci.* 2002 Aug 1;22(15):6659-69.

Douvaras P, Wang J, Zimmer M, Hanchuk S, O'Bara MA, Sadiq S, Sim FJ, Goldman J, Fossati V. Efficient generation of myelinating oligodendrocytes from primary progressive multiple sclerosis patients by induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports.* 2014 Aug 12;3(2):250-9.

## E

Ebert AD, Liang P, Wu JC. Induced pluripotent stem cells as a disease modeling and drug screening platform. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2012 Oct;60(4):408-16.

Ebert AD, Svendsen CN. Human stem cells and drug screening: opportunities and challenges. *Nat Rev Drug Discov.* 2010 May;9(5):367-72.

Ebert AD, Yu J, Rose FF Jr, Mattis VB, Lorson CL, Thomson JA, Svendsen CN. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature.* 2009 Jan 15;457(7227):277-80.

Elkabetz Y, Panagiotakos G, Al Shamy G, Socci ND, Tabar V, Studer L. Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage. *Genes Dev.* 2008 Jan 15;22(2):152-65.

Eminli S, Utikal J, Arnold K, Jaenisch R, Hochedlinger K. Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression. *Stem Cells.* 2008 Oct;26(10):2467-74.

Engle EC. Human genetic disorders of axon guidance. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010 Mar;2(3):a001784.

Enright BP, Kubota C, Yang X, Tian XC. Epigenetic characteristics and development of embryos cloned from donor cells treated by trichostatin A or 5-aza-2'-deoxycytidine. *Biol Reprod.* 2003

Sep;69(3):896-901.

Etemad S, Zamin RM, Ruitenber MJ, Filgueira L. A novel in vitro human microglia model: characterization of human monocyte-derived microglia. *J Neurosci Methods*. 2012 Jul 30;209(1):79-89.

Evans AR, Euteneuer S, Chavez E, Mullen LM, Hui EE, Bhatia SN, Ryan AF. Laminin and fibronectin modulate inner ear spiral ganglion neurite outgrowth in an in vitro alternate choice assay. *Dev Neurobiol*. 2007 Nov;67(13):1721-30.

Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981 Jul 9;292(5819):154-6.

## F

Fagerberg L, Hallström BM, Oksvold P, Kampf C, Djureinovic D, Odeberg J, Habuka M, Tahmasebpoor S, Danielsson A, Edlund K, Asplund A, Sjöstedt E, Lundberg E, Szigartyo CA, Skogs M, Takanen JO, Berling H, Tegel H, Mulder J, Nilsson P, Schwenk JM, Lindskog C, Danielsson F, Mardinoglu A, Sivertsson A, von Feilitzen K, Forsberg M, Zwahlen M, Olsson I, Navani S, Huss M, Nielsen J, Ponten F, Uhlén M. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2014 Feb;13(2):397-406.

Fan K, Zhang S, Zhang Y, Lu J, Holcombe M, Zhang X. A Machine Learning Assisted, Label-free, Non-invasive Approach for Somatic Reprogramming in Induced Pluripotent Stem Cell Colony Formation Detection and Prediction. *Sci Rep*. 2017 Oct 18;7(1):13496.

Fang J, Liu M, Zhang X, Sakamoto T, Taatjes DJ, Jena BP, Sun F, Woods J, Bryson T, Kowluru A, Zhang K, Chen X. COPII-Dependent ER Export: A Critical Component of Insulin Biogenesis and  $\beta$ -Cell ER Homeostasis. *Mol Endocrinol*. 2015 Aug;29(8):1156-69.

Federation AJ, Bradner JE, Meissner A. The use of small molecules in somatic-cell reprogramming. *Trends Cell Biol*. 2014 Mar;24(3):179-87.

Fedorova V, Vanova T, Elrefae L, Pospisil J, Petrasova M, Kolajova V, Hudacova Z, Baniariova J, Barak M, Peskova L, Barta T, Kaucka M, Killinger M, Vecera J, Bernatik O, Cajanek L, Hribkova H, Bohaciakova D. Differentiation of neural rosettes from human pluripotent stem cells in vitro is sequentially regulated on a molecular level and accomplished by the mechanism reminiscent of secondary neurulation. *Stem Cell Res*. 2019 Oct;40:101563.

Fenton AR, Jongens TA, Holzbaur ELF. Mitochondrial dynamics: Shaping and remodeling an organelle network. *Curr Opin Cell Biol*. 2021 Feb;68:28-36.

Finci L, Zhang Y, Meijers R, Wang JH. Signaling mechanism of the netrin-1 receptor DCC in axon guidance. *Prog Biophys Mol Biol*. 2015 Sep;118(3):153-60.

Fischer TT, Ehrlich BE. Wolfram Syndrome: a Monogenic Model to Study Diabetes Mellitus and Neurodegeneration. *Curr Opin Physiol*. 2020 Oct;17:115-123.

Flitsch LJ, Laupman KE, Brüstle O. Transcription Factor-Based Fate Specification and Forward

Programming for Neural Regeneration. *Front Cell Neurosci.* 2020 May 20;14:121.

Fonseca SG, Fukuma M, Lipson KL, Nguyen LX, Allen JR, Oka Y, Urano F. WFS1 is a novel component of the unfolded protein response and maintains homeostasis of the endoplasmic reticulum in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem.* 2005 Nov 25;280(47):39609-15.

Fonseca SG, Ishigaki S, Osowski CM, Lu S, Lipson KL, Ghosh R, Hayashi E, Ishihara H, Oka Y, Permutt MA, Urano F. Wolfram syndrome 1 gene negatively regulates ER stress signaling in rodent and human cells. *J Clin Invest.* 2010 Mar;120(3):744-55.

Forgac M. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Nov;8(11):917-29.

Fox RJ, Raska P, Barro C, Karafa M, Konig V, Bermel RA, Chase M, Coffey CS, Goodman AD, Klawiter EC, Naismith RT, Kuhle J. Neurofilament light chain in a phase 2 clinical trial of ibudilast in progressive multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2021 Nov;27(13):2014-2022.

Fransen E, Van Camp G, Vits L, Willems PJ. L1-associated diseases: clinical geneticists divide, molecular geneticists unite. *Hum Mol Genet.* 1997;6(10):1625-32.

Fraser FC, Gunn T. Diabetes mellitus, diabetes insipidus, and optic atrophy. An autosomal recessive syndrome? *J Med Genet.* 1977 Jun;14(3):190-3.

Frontino G, Raouf T, Canarutto D, Tirelli E, Di Tonno R, Rigamonti A, Cascavilla ML, Baldoli C, Scotti R, Leocani L, Huang SC, Meschi F, Barera G, Broccoli V, Rossi G, Torchio S, Chimienti R, Bonfanti R, Piemonti L. Case Report: Off-Label Liraglutide Use in Children With Wolfram Syndrome Type 1: Extensive Characterization of Four Patients. *Front Pediatr.* 2021 Dec 14;9:755365.

Fruen BR, Mickelson JR, Louis CF. Dantrolene inhibition of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release by direct and specific action at skeletal muscle ryanodine receptors. *J Biol Chem.* 1997 Oct 24;272(43):26965-71.

Fukuchi M, Nii T, Ishimaru N, Minamino A, Hara D, Takasaki I, Tabuchi A, Tsuda M. Valproic acid induces up- or down-regulation of gene expression responsible for the neuronal excitation and inhibition in rat cortical neurons through its epigenetic actions. *Neurosci Res.* 2009 Sep;65(1):35-43.

Fulka J Jr, Fulka H. Somatic cell nuclear transfer (SCNT) in mammals: the cytoplasm and its reprogramming activities. *Adv Exp Med Biol.* 2007;591:93-102.

Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K, Hasegawa M. 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.* 2009;85(8):348-62.

## G

Gabreëls BA, Swaab DF, de Kleijn DP, Dean A, Seidah NG, Van de Loo JW, Van de Ven WJ, Martens GJ, Van Leeuwen FW. The vasopressin precursor is not processed in the hypothalamus of Wolfram syndrome patients with diabetes insipidus: evidence for the involvement of PC2 and 7B2. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998 Nov;83(11):4026-33.

Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* 2013 Jul;31(7):397-405.

Galiakberova AA, Dashinimaev EB. Neural Stem Cells and Methods for Their Generation From Induced Pluripotent Stem Cells in vitro. *Front Cell Dev Biol.* 2020 Oct 8;8:815.

Gandawijaya J, Bamford RA, Burbach JPH, Oguro-Ando A. Cell Adhesion Molecules Involved in Neurodevelopmental Pathways Implicated in 3p-Deletion Syndrome and Autism Spectrum Disorder. *Front Cell Neurosci.* 2021 Jan 13;14:611379.

Ganie MA, Laway BA, Nisar S, Wani MM, Khurana ML, Ahmad F, Ahmed S, Gupta P, Ali I, Shabir I, Shadan A, Ahmed A, Tufail S. Presentation and clinical course of Wolfram (DIDMOAD) syndrome from North India. *Diabet Med.* 2011 Nov;28(11):1337-42.

García-León JA, García-Díaz B, Eggermont K, Cáceres-Palomo L, Neyrinck K, Madeiro da Costa R, Dávila JC, Baron-Van Evercooren A, Gutiérrez A, Verfaillie CM. Generation of oligodendrocytes and establishment of an all-human myelinating platform from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc.* 2020 Nov;15(11):3716-3744.

Gardner RL, Brook FA. Reflections on the biology of embryonic stem (ES) cells. *Int J Dev Biol.* 1997 Apr;41(2):235-43.

Gartel AL, Tyner AL. Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. *Exp Cell Res.* 1999 Feb 1;246(2):280-9.

Gerakis Y, Hetz C. Emerging roles of ER stress in the etiology and pathogenesis of Alzheimer's disease. *FEBS J.* 2018 Mar;285(6):995-1011.

Gharanei S, Zatyka M, Astuti D, Fenton J, Sik A, Nagy Z, Barrett TG. Vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase V1A subunit is a molecular partner of Wolfram syndrome 1 (WFS1) protein, which regulates its expression and stability. *Hum Mol Genet.* 2013 Jan 15;22(2):203-17.

Ghemrawi R, Khair M. Endoplasmic Reticulum Stress and Unfolded Protein Response in Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci.* 2020 Aug 25;21(17):6127.

Giacomello M, Pyakurel A, Glytsou C, Scorrano L. The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020 Apr;21(4):204-224.

Gilon P, Chae HY, Rutter GA, Ravier MA. Calcium signaling in pancreatic  $\beta$ -cells in health and in Type 2 diabetes. *Cell Calcium.* 2014 Nov;56(5):340-61.

Giorgi C, Marchi S, Pinton P. Publisher Correction: The machineries, regulation and cellular functions of mitochondrial calcium. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018 Nov;19(11):746.

Giorgi C, Missiroli S, Patergnani S, Duszynski J, Wieckowski MR, Pinton P. Mitochondria-associated membranes: composition, molecular mechanisms, and physiopathological implications. *Antioxid Redox Signal.* 2015 Apr 20;22(12):995-1019.

Gocmen R, Guler E. Teaching NeuroImages: MRI of brain findings of Wolfram (DIDMOAD) syndrome. *Neurology.* 2014 Dec 9;83(24):e213-4.

Godin JD, Creppe C, Laguesse S, Nguyen L. Emerging Roles for the Unfolded Protein Response in the Developing Nervous System. *Trends Neurosci.* 2016 Jun;39(6):394-404.

Gomez TM, Zheng JQ. The molecular basis for calcium-dependent axon pathfinding. *Nat Rev Neurosci.* 2006 Feb;7(2):115-25.

Gonda Y, Namba T, Hanashima C. Beyond Axon Guidance: Roles of Slit-Robo Signaling in Neocortical Formation. *Front Cell Dev Biol.* 2020 Dec 23;8:607415.

González F, Boué S, Izpisua Belmonte JC. Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming à la carte. *Nat Rev Genet.* 2011 Apr;12(4):231-42.

Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Krämer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci PG, Heinzl T. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J.* 2001 Dec 17;20(24):6969-78.

Gouveia C, Huyser C, Egli D, Pepper MS. Lessons Learned from Somatic Cell Nuclear Transfer. *Int J Mol Sci.* 2020 Mar 27;21(7):2314.

Gowda GS, Rai D, Nadella RK, Tiwari S, Yadav R, Math SB. Schizophrenia in Wolfram Syndrome (DIDMOAD Syndrome): A case report in support of the mitochondrial dysfunction hypothesis. *Schizophr Res.* 2018 May;195:574-575.

Grabundzija I, Wang J, Sebe A, Erdei Z, Kajdi R, Devaraj A, Steinemann D, Szuhai K, Stein U, Cantz T, Schambach A, Baum C, Izsvák Z, Sarkadi B, Ivics Z. Sleeping Beauty transposon-based system for cellular reprogramming and targeted gene insertion in induced pluripotent stem cells. *Nucleic Acids Res.* 2013 Feb 1;41(3):1829-47.

Gravitz, Stem-cell transplants for Parkinson's disease have entered clinical trials, but what they promise is more relief than cure. *Nature* 597, S8-S10 (2021)

Greig LC, Woodworth MB, Galazo MJ, Padmanabhan H, Macklis JD. Molecular logic of neocortical projection neuron specification, development and diversity. *Nat Rev Neurosci.* 2013 Nov;14(11):755-69.

Grenier J, Meunier I, Daien V, Baudoin C, Halloy F, Bocquet B, Blanchet C, Delettre C, Esmenjaud E, Roubertie A, Lenaers G, Hamel CP. WFS1 in Optic Neuropathies: Mutation Findings in Nonsyndromic Optic Atrophy and Assessment of Clinical Severity. *Ophthalmology.* 2016 Sep;123(9):1989-98.

Grunwald LM, Stock R, Haag K, Buckenmaier S, Eberle MC, Wildgruber D, Storchak H, Kriebel M, Weißgraeber S, Mathew L, Singh Y, Loos M, Li KW, Kraushaar U, Fallgatter AJ, Volkmer H. Comparative characterization of human induced pluripotent stem cells (hiPSC) derived from patients with schizophrenia and autism. *Transl Psychiatry.* 2019 Jul 29;9(1):179.

Grzela DP, Marciniak B, Pulaski L. Characterization of an induced pluripotent stem cell line (IMBPASi001-A) derived from fibroblasts of a patient affected by Wolfram Syndrome. *Stem Cell Res.* 2020 Jul;46:101858.

Grskovic M, Javaherian A, Strulovici B, Daley GQ. Induced pluripotent stem cells--opportunities for

disease modelling and drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2011 Nov 11;10(12):915-29.

Gupta RM, Musunuru K. Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9. *J Clin Invest.* 2014 Oct;124(10):4154-61.

Gurdon JB. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J Embryol Exp Morphol.* 1962 Dec;10:622-40.

Guy AT, Kamiguchi H. Lipids as new players in axon guidance and circuit development. *Curr Opin Neurobiol.* 2021 Feb;66:22-29.

## H

Hahamy A, Behrmann M, Malach R. The idiosyncratic brain: distortion of spontaneous connectivity patterns in autism spectrum disorder. *Nat Neurosci.* 2015 Feb;18(2):302-9.

Halliwell J, Barbaric I, Andrews PW. Acquired genetic changes in human pluripotent stem cells: origins and consequences. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020 Dec;21(12):715-728.

Hamel C, Jagodzinska J, Bonner-Wersinger D, et al. Advances in gene therapy for Wolfram syndrome. *Acta Ophthalmol.* 2017; 95.

Hanold KC. Teratogenic potential of valproic acid. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs.* 1986 Mar-Apr;15(2):111-6.

Hara T, Mahadevan J, Kanekura K, Hara M, Lu S, Urano F. Calcium efflux from the endoplasmic reticulum leads to  $\beta$ -cell death. *Endocrinology.* 2014 Mar;155(3):758-68.

Hardy C, Khamis F, Torres R, Scott-Brown M, Seller A, Poulton J, Collier D, Kirk J, Polymeropoulos M, Latif F, Barrett T. Clinical and molecular genetic analysis of 19 Wolfram syndrome kindreds demonstrating a wide spectrum of mutations in WFS1. *Am J Hum Genet.* 1999 Nov;65(5):1279-90.

Hatanaka M, Tanabe K, Yanai A, Ohta Y, Kondo M, Akiyama M, Shinoda K, Oka Y, Tanizawa Y. Wolfram syndrome 1 gene (WFS1) product localizes to secretory granules and determines granule acidification in pancreatic beta-cells. *Hum Mol Genet.* 2011 Apr 1;20(7):1274-84.

Hayashi S, Inoue Y, Kiyonari H, Abe T, Misaki K, Moriguchi H, Tanaka Y, Takeichi M. Protocadherin-17 mediates collective axon extension by recruiting actin regulator complexes to interaxonal contacts. *Dev Cell.* 2014 Sep 29;30(6):673-87.

Hayashi T, Maurice T, Su TP.  $Ca^{2+}$  signaling via sigma(1)-receptors: novel regulatory mechanism affecting intracellular  $Ca^{2+}$  concentration. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000 Jun;293(3):788-98.

Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell.* 1999 Nov;10(11):3787-99.

Henderson JK, Draper JS, Baillie HS, Fishel S, Thomson JA, Moore H, Andrews PW. Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. *Stem Cells.* 2002;20(4):329-37.

Hershey T, Lugar HM, Shimony JS, Rutlin J, Koller JM, Perantie DC, Paciorkowski AR, Eisenstein SA, Permutt MA; Washington University Wolfram Study Group. Early brain vulnerability in Wolfram syndrome. *PLoS One*. 2012;7(7):e40604.

Hetz C. Adapting the proteostasis capacity to sustain brain healthspan. *Cell*. 2021 Mar 18;184(6):1545-1560.

Hetz C, Axten JM, Patterson JB. Pharmacological targeting of the unfolded protein response for disease intervention. *Nat Chem Biol*. 2019 Aug;15(8):764-775.

Hetz C, Saxena S. ER stress and the unfolded protein response in neurodegeneration. *Nat Rev Neurol*. 2017 Aug;13(8):477-491.

Hetz C, Zhang K, Kaufman RJ. Mechanisms, regulation and functions of the unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2020 Aug;21(8):421-438.

Higo T, Hamada K, Hisatsune C, Nukina N, Hashikawa T, Hattori M, Nakamura T, Mikoshiba K. Mechanism of ER stress-induced brain damage by IP(3) receptor. *Neuron*. 2010 Dec 9;68(5):865-78.

Hildebrand MS, Sorensen JL, Jensen M, Kimberling WJ, Smith RJ. Autoimmune disease in a DFNA6/14/38 family carrying a novel missense mutation in WFS1. *Am J Med Genet A*. 2008 Sep 1;146A(17):2258-65.

Hilson JB, Merchant SN, Adams JC, Joseph JT. Wolfram syndrome: a clinicopathologic correlation. *Acta Neuropathol*. 2009 Sep;118(3):415-28.

Hirschi KK, Li S, Roy K. Induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. *Annu Rev Biomed Eng*. 2014 Jul 11;16:277-94.

Hockemeyer D, Soldner F, Cook EG, Gao Q, Mitalipova M, Jaenisch R. A drug-inducible system for direct reprogramming of human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell*. 2008 Sep 11;3(3):346-353.

Hoekel J, Chisholm SA, Al-Lozi A, Hershey T, Tychsen L; Washington University Wolfram Study Group. Ophthalmologic correlates of disease severity in children and adolescents with Wolfram syndrome. *J AAPOS*. 2014 Oct;18(5):461-465.e1.

Hofmann S, Philbrook C, Gerbitz KD, Bauer MF. Wolfram syndrome: structural and functional analyses of mutant and wild-type wolframin, the WFS1 gene product. *Hum Mol Genet*. 2003 Aug 15;12(16):2003-12.

Hölscher C. Potential role of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) in neuroprotection. *CNS Drugs*. 2012 Oct 1;26(10):871-82.

Honig MG, Camilli SJ, Xue QS. Effects of L1 blockade on sensory axon outgrowth and pathfinding in the chick hindlimb. *Dev Biol*. 2002 Mar 1;243(1):137-54.

Huang R, Yuan DJ, Li S, Liang XS, Gao Y, Lan XY, Qin HM, Ma YF, Xu GY, Schachner M, Sytnyk V, Boltze J, Ma QH, Li S. NCAM regulates temporal specification of neural progenitor cells via profilin2 during corticogenesis. *J Cell Biol*. 2020 Jan 6;219(1):e201902164.

Huang X, Liu J, Ketova T, Fleming JT, Grover VK, Cooper MK, Litingtung Y, Chiang C. Transventricular delivery of Sonic hedgehog is essential to cerebellar ventricular zone development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 May 4;107(18):8422-7.

Hwang I, Jeong YW, Kim JJ, Lee HJ, Kang M, Park KB, Park JH, Kim YW, Kim WT, Shin T, Hyun SH, Jeung EB, Hwang WS. Successful cloning of coyotes through interspecies somatic cell nuclear transfer using domestic dog oocytes. *Reprod Fertil Dev*. 2013;25(8):1142-8.

I

Iafusco D, Zanfardino A, Piscopo A, Curto S, Troncone A, Chianese A, Rollato AS, Testa V, Iafusco F, Maione G, Pennarella A, Boccabella L, Ozen G, Palma PL, Mazzaccara C, Tinto N, Miraglia Del Giudice E. Metabolic Treatment of Wolfram Syndrome. *Int J Environ Res Public Health*. 2022 Feb 27;19(5):2755.

Igarashi M. Molecular basis of the functions of the mammalian neuronal growth cone revealed using new methods. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2019;95(7):358-377.

Ilic D, Ogilvie C. Concise Review: Human Embryonic Stem Cells-What Have We Done? What Are We Doing? Where Are We Going? *Stem Cells*. 2017 Jan;35(1):17-25.

Im K, Ahtam B, Haehn D, Peters JM, Warfield SK, Sahin M, Ellen Grant P. Altered Structural Brain Networks in Tuberous Sclerosis Complex. *Cereb Cortex*. 2016 May;26(5):2046-58..

Ing-Esteves S, Kostadinov D, Marocha J, Sing AD, Joseph KS, Laboulaye MA, Sanes JR, Lefebvre JL. Combinatorial Effects of Alpha- and Gamma-Protocadherins on Neuronal Survival and Dendritic Self-Avoidance. *J Neurosci*. 2018 Mar 14;38(11):2713-2729.

Inoue H, Tanizawa Y, Wasson J, Behn P, Kalidas K, Bernal-Mizrachi E, Mueckler M, Marshall H, Donis-Keller H, Crock P, Rogers D, Mikuni M, Kumashiro H, Higashi K, Sobue G, Oka Y, Permutt MA. A gene encoding a transmembrane protein is mutated in patients with diabetes mellitus and optic atrophy (Wolfram syndrome). *Nat Genet*. 1998 Oct;20(2):143-8.

Ishida S. Organs-on-a-chip: Current applications and consideration points for in vitro ADME-Tox studies. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2018 Feb;33(1):49-54

Ishihara H, Takeda S, Tamura A, Takahashi R, Yamaguchi S, Takei D, Yamada T, Inoue H, Soga H, Katagiri H, Tanizawa Y, Oka Y. Disruption of the WFS1 gene in mice causes progressive beta-cell loss and impaired stimulus-secretion coupling in insulin secretion. *Hum Mol Genet*. 2004 Jun 1;13(11):1159-70.

Ishii N, Wadsworth WG, Stern BD, Culotti JG, Hedgecock EM. UNC-6, a laminin-related protein, guides cell and pioneer axon migrations in *C. elegans*. *Neuron*. 1992 Nov;9(5):873-81.

Ito S, Sakakibara R, Hattori T. Wolfram syndrome presenting marked brain MR imaging abnormalities with few neurologic abnormalities. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2007 Feb;28(2):305-6.

Itskovitz-Eldor, Joseph; Schuldiner, Maya; Karsenti, Dorit; Eden, Amir; Yanuka, Ofra; Amit, Michal; Soreq, Hermona; Benvenisty, Nissim (2000). Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Embryoid Bodies Comprising the Three Embryonic Germ Layers. *Molecular Medicine*, 6(2), 88–95.

Ivask M, Hugill A, Kõks S. RNA-sequencing of WFS1-deficient pancreatic islets. *Physiol Rep*. 2016 Apr;4(7):e12750.

Ivask M, Pajusalu S, Reimann E, Kõks S. Hippocampus and Hypothalamus RNA-sequencing of WFS1-deficient Mice. *Neuroscience*. 2018 Mar 15;374:91-103.

Iwai T, Ito S, Tanimitsu K, Udagawa S, Oka J. Glucagon-like peptide-1 inhibits LPS-induced IL-1beta production in cultured rat astrocytes. *Neurosci Res*. 2006 Aug;55(4):352-60.

Iwasaki Y, Suganami T, Hachiya R, Shirakawa I, Kim-Saijo M, Tanaka M, Hamaguchi M, Takai-Igarashi T, Nakai M, Miyamoto Y, Ogawa Y. Activating transcription factor 4 links metabolic stress to interleukin-6 expression in macrophages. *Diabetes*. 2013 Jan;63(1):152-61. Epub 2013 Aug 29.

## J

Jaenisch R, Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell*. 2008 Feb 22;132(4):567-82.

Jagomäe T, Seppa K, Reimets R, Pastak M, Plaas M, Hickey MA, Kukker KG, Moons L, De Groef L, Vasar E, Kaasik A, Terasmaa A, Plaas M. Early Intervention and Lifelong Treatment with GLP1 Receptor Agonist Liraglutide in a Wolfram Syndrome Rat Model with an Emphasis on Visual Neurodegeneration, Sensorineural Hearing Loss and Diabetic Phenotype. *Cells*. 2021 Nov 16;10(11):3193.

Jaudon F, Thalhammer A, Cingolani LA. Integrin adhesion in brain assembly: From molecular structure to neuropsychiatric disorders. *Eur J Neurosci*. 2021 Jun;53(12):3831-3850.

Jen JC, Chan WM, Bosley TM, Wan J, Carr JR, Rüb U, Shattuck D, Salamon G, Kudo LC, Ou J, Lin DD, Salih MA, Kansu T, Al Dhalaan H, Al Zayed Z, MacDonald DB, Stigsby B, Plaitakis A, Dretakis EK, Gottlob I, Pieh C, Traboulsi EI, Wang Q, Wang L, Andrews C, Yamada K, Demer JL, Karim S, Alger JR, Geschwind DH, Deller T, Sicotte NL, Nelson SF, Baloh RW, Engle EC. Mutations in a human ROBO gene disrupt hindbrain axon pathway crossing and morphogenesis. *Science*. 2004 Jun 4;304(5676):1509-13.

Jiang J, Chan YS, Loh YH, Cai J, Tong GQ, Lim CA, Robson P, Zhong S, Ng HH. A core Klf circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*. 2008 Mar;10(3):353-60.

Joshi AU, Kornfeld OS, Mochly-Rosen D. The entangled ER-mitochondrial axis as a potential therapeutic strategy in neurodegeneration: A tangled duo unchained. *Cell Calcium*. 2016 Sep;60(3):218-34.

Jullien J, Pasque V, Halley-Stott RP, Miyamoto K, Gurdon JB. Mechanisms of nuclear reprogramming by eggs and oocytes: a deterministic process? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011 Jun 23;12(7):453-9.

## K

Kakiuchi C, Ishigaki S, Oslowski CM, Fonseca SG, Kato T, Urano F. Valproate, a mood stabilizer, induces WFS1 expression and modulates its interaction with ER stress protein GRP94. *PLoS One*. 2009;4(1):e4134.

Kakiuchi C, Ishiwata M, Hayashi A, Kato T. XBP1 induces WFS1 through an endoplasmic reticulum stress response element-like motif in SH-SY5Y cells. *J Neurochem*. 2006 Apr;97(2):545-55.

Kampmann M. CRISPR-based functional genomics for neurological disease. *Nat Rev Neurol*. 2020 Sep;16(9):465-480.

Karasik A, O'Hara C, Srikanta S, Swift M, Soeldner JS, Kahn CR, Herskowitz RD. Genetically programmed selective islet beta-cell loss in diabetic subjects with Wolfram's syndrome. *Diabetes Care*. 1989 Feb;12(2):135-8.

Karzon RK, Hullar TE. Audiologic and vestibular findings in Wolfram syndrome. *Ear Hear*. 2013 Nov-Dec;34(6):809-12.

Kast RJ, Levitt P. Precision in the development of neocortical architecture: From progenitors to cortical networks. *Prog Neurobiol*. 2019 Apr;175:77-95.

Kaufman RJ. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest*. 2002 Nov;110(10):1389-98.

Kawada K, Iekumo T, Saito R, Kaneko M, Mimori S, Nomura Y, Okuma Y. Aberrant neuronal differentiation and inhibition of dendrite outgrowth resulting from endoplasmic reticulum stress. *J Neurosci Res*. 2014 Sep;92(9):1122-33.

Kawamura K, Chen Y, Shu Y, Cheng Y, Qiao J, Behr B, Pera RA, Hsueh AJ. Promotion of human early embryonic development and blastocyst outgrowth in vitro using autocrine/paracrine growth factors. *PLoS One*. 2012;7(11):e49328.

Kawamura T, Suzuki J, Wang YV, Menendez S, Morera LB, Raya A, Wahl GM, Izpisua Belmonte JC. Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature*. 2009 Aug 27;460(7259):1140-4.

Kawano J, Fujinaga R, Yamamoto-Hanada K, Oka Y, Tanizawa Y, Shinoda K. Wolfram syndrome 1 (Wfs1) mRNA expression in the normal mouse brain during postnatal development. *Neurosci Res*. 2009 Jun;64(2):213-30.

Kawano J, Tanizawa Y, Shinoda K. Wolfram syndrome 1 (Wfs1) gene expression in the normal mouse visual system. *J Comp Neurol*. 2008 Sep 1;510(1):1-23.

Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, Kaneko S, Kuwana Y, Nakanishi S, Nishikawa SI, Sasai Y. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron*. 2000 Oct;28(1):31-40.

Kelley KW, Paşca SP. Human brain organogenesis: Toward a cellular understanding of development and disease. *Cell*. 2022 Jan 6;185(1):42-61.

Khacho M, Harris R, Slack RS. Mitochondria as central regulators of neural stem cell fate and cognitive function. *Nat Rev Neurosci*. 2019 Jan;20(1):34-48.

Khurana V, Tardiff DF, Chung CY, Lindquist S. Toward stem cell-based phenotypic screens for

neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurol*. 2015 Jun;11(6):339-50.

Kim D, Kim CH, Moon JI, Chung YG, Chang MY, Han BS, Ko S, Yang E, Cha KY, Lanza R, Kim KS. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell*. 2009 Jun 5;4(6):472-6.

Kim K, Zhao R, Doi A, Ng K, Unternaehrer J, Cahan P, Huo H, Loh YH, Aryee MJ, Lensch MW, Li H, Collins JJ, Feinberg AP, Daley GQ. Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*. 2011 Nov 27;29(12):1117-9.

Kimbrel EA, Lanza R. Current status of pluripotent stem cells: moving the first therapies to the clinic. *Nat Rev Drug Discov*. 2015 Oct;14(10):681-92.

Kinsley BT, Swift M, Dumont RH, Swift RG. Morbidity and mortality in the Wolfram syndrome. *Diabetes Care*. 1995 Dec;18(12):1566-70.

Kiskinis E, Eggan K. Progress toward the clinical application of patient-specific pluripotent stem cells. *J Clin Invest*. 2010 Jan;120(1):51-9.

Klein R. Axon guidance: opposing EPHects in the growth cone. *Cell*. 2005 Apr 8;121(1):4-6.

Klein R, Kania A. Ephrin signalling in the developing nervous system. *Curr Opin Neurobiol*. 2014 Aug;27:16-24.

Koch P, Opitz T, Steinbeck JA, Ladewig J, Brüstle O. A rosette-type, self-renewing human ES cell-derived neural stem cell with potential for in vitro instruction and synaptic integration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Mar 3;106(9):3225-30.

Kohl S, Zobor D, Chiang WC, Weisschuh N, Staller J, Gonzalez Menendez I, Chang S, Beck SC, Garcia Garrido M, Sothilingam V, Seeliger MW, Stanzial F, Benedicenti F, Inzana F, Héon E, Vincent A, Beis J, Strom TM, Rudolph G, Roosing S, Hollander AI, Cremers FP, Lopez I, Ren H, Moore AT, Webster AR, Michaelides M, Koenekoop RK, Zrenner E, Kaufman RJ, Tsang SH, Wissinger B, Lin JH. Mutations in the unfolded protein response regulator ATF6 cause the cone dysfunction disorder achromatopsia. *Nat Genet*. 2015 Jul;47(7):757-65.

Koido K, Köks S, Nikopensus T, Maron E, Altmäe S, Heinaste E, Vabrit K, Tammekivi V, Hallast P, Kurg A, Shlik J, Vasar V, Metspalu A, Vasar E. Polymorphisms in wolframin (WFS1) gene are possibly related to increased risk for mood disorders. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2005 Jun;8(2):235-44.

Köks S, Soomets U, Paya-Cano JL, Fernandes C, Luuk H, Plaas M, Terasmaa A, Tillmann V, Noormets K, Vasar E, Schalkwyk LC. Wfs1 gene deletion causes growth retardation in mice and interferes with the growth hormone pathway. *Physiol Genomics*. 2009 May 13;37(3):249-59.

Komada M, Saito H, Kinboshi M, Miura T, Shiota K, Ishibashi M. Hedgehog signaling is involved in development of the neocortex. *Development*. 2008 Aug;135(16):2717-27.

Kondo M, Tanabe K, Amo-Shiinoki K, Hatanaka M, Morii T, Takahashi H, Seino S, Yamada Y, Tanizawa Y. Activation of GLP-1 receptor signalling alleviates cellular stresses and improves beta cell function in a mouse model of Wolfram syndrome. *Diabetologia*. 2018 Oct;61(10):2189-2201.

Kondo T, Asai M, Tsukita K, Kutoku Y, Ohsawa Y, Sunada Y, Imamura K, Egawa N, Yahata N, Okita K, Takahashi K, Asaka I, Aoi T, Watanabe A, Watanabe K, Kadoya C, Nakano R, Watanabe D, Maruyama K, Hori O, Hibino S, Choshi T, Nakahata T, Hioki H, Kaneko T, Naitoh M, Yoshikawa K, Yamawaki S, Suzuki S, Hata R, Ueno S, Seki T, Kobayashi K, Toda T, Murakami K, Irie K, Klein WL, Mori H, Asada T, Takahashi R, Iwata N, Yamanaka S, Inoue H. Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A $\beta$  and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell*. 2013 Apr 4;12(4):487-96.

Kooreman NG, Wu JC. Tumorigenicity of pluripotent stem cells: biological insights from molecular imaging. *J R Soc Interface*. 2010 Dec 6;7 Suppl 6(Suppl 6):S753-63.

Krencik R, Zhang SC. Directed differentiation of functional astroglial subtypes from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc*. 2011 Oct 13;6(11):1710-7.

Kryvenko V, Vagin O, Dada LA, Sznajder JI, Vadász I. Maturation of the Na,K-ATPase in the Endoplasmic Reticulum in Health and Disease. *J Membr Biol*. 2021 Dec;254(5-6):447-457.

Kuijlaars J, Oyelami T, Diels A, Rohrbacher J, Versweyveld S, Meneghello G, Tuefferd M, Verstraelen P, Detrez JR, Verschuuren M, De Vos WH, Meert T, Peeters PJ, Cik M, Nuydens R, Brône B, Verheyen A. Sustained synchronized neuronal network activity in a human astrocyte co-culture system. *Sci Rep*. 2016 Nov 7;6:36529.

Kumar S. Wolfram syndrome: important implications for pediatricians and pediatric endocrinologists. *Pediatr Diabetes*. 2010 Feb;11(1):28-37.

## L

Laguesse S, Creppe C, Nedialkova DD, Prévot PP, Borgs L, Huysseune S, Franco B, Duysens G, Krusy N, Lee G, Thelen N, Thiry M, Close P, Chariot A, Malgrange B, Leidel SA, Godin JD, Nguyen L. A Dynamic Unfolded Protein Response Contributes to the Control of Cortical Neurogenesis. *Dev Cell*. 2015 Dec 7;35(5):553-567.

Lai KO, Ip NY. Synapse development and plasticity: roles of ephrin/Eph receptor signaling. *Curr Opin Neurobiol*. 2009 Jun;19(3):275-83.

Lai Wing Sun K, Correia JP, Kennedy TE. Netrins: versatile extracellular cues with diverse functions. *Development*. 2011 Jun;138(11):2153-69.

La Morgia C, Maresca A, Amore G, Gramegna LL, Carbonelli M, Scimonelli E, Danese A, Patergnani S, Caporali L, Tagliavini F, Del Dotto V, Capristo M, Sadun F, Barboni P, Savini G, Evangelisti S, Bianchini C, Valentino ML, Liguori R, Tonon C, Giorgi C, Pinton P, Lodi R, Carelli V. Calcium mishandling in absence of primary mitochondrial dysfunction drives cellular pathology in Wolfram Syndrome. *Sci Rep*. 2020 Mar 16;10(1):4785.

Lancaster MA, Renner M, Martin CA, Wenzel D, Bicknell LS, Hurles ME, Homfray T, Penninger JM, Jackson AP, Knoblich JA. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*. 2013 Sep 19;501(7467):373-9.

Lapasset L, Milhavet O, Prieur A, Besnard E, Babled A, Aït-Hamou N, Leschik J, Pellestor F, Ramirez JM, De Vos J, Lehmann S, Lemaitre JM. Rejuvenating senescent and centenarian human cells by

reprogramming through the pluripotent state. *Genes Dev.* 2011 Nov 1;25(21):2248-53.

Laustriat D, Gide J, Barrault L, Chautard E, Benoit C, Auboeuf D, Boland A, Battail C, Artiguenave F, Deleuze JF, Bénit P, Rustin P, Franc S, Charpentier G, Furling D, Bassez G, Nissan X, Martinat C, Peschanski M, Baghdoyan S. In Vitro and In Vivo Modulation of Alternative Splicing by the Biguanide Metformin. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2015 Nov 3;4(11):e262.

La Valle A, Piccolo G, Maghnie M, d'Annunzio G. Urinary Tract Involvement in Wolfram Syndrome: A Narrative Review. *Int J Environ Res Public Health.* 2021 Nov 15;18(22):11994.

Lee H, Shamy GA, Elkabetz Y, Schofield CM, Harrision NL, Panagiotakos G, Socci ND, Tabar V, Studer L. Directed differentiation and transplantation of human embryonic stem cell-derived motoneurons. *Stem Cells.* 2007 Aug;25(8):1931-9.

Lefebvre, Julie Marocha, Chapter 12 - Dendrite development: vertebrates, Editor(s): John Rubenstein, Pasko Rakic, Bin Chen, Kenneth Y. Kwan, Alex Kolodkin, Eva Anton, Cellular Migration and Formation of Axons and Dendrites (Second Edition), Academic Press, 2020, Pages 257-286, ISBN 9780128144077

Lefort N, Feyeux M, Bas C, Féraud O, Bennaceur-Griscelli A, Tachdjian G, Peschanski M, Perrier AL. Human embryonic stem cells reveal recurrent genomic instability at 20q11.21. *Nat Biotechnol.* 2008 Dec;26(12):1364-6

Leung LC, Urbančič V, Baudet ML, Dwivedy A, Bayley TG, Lee AC, Harris WA, Holt CE. Coupling of NF-protocadherin signaling to axon guidance by cue-induced translation. *Nat Neurosci.* 2013 Feb;16(2):166-73.

Lewis TL Jr, Courchet J, Polleux F. Cell biology in neuroscience: Cellular and molecular mechanisms underlying axon formation, growth, and branching. *J Cell Biol.* 2013 Sep 16;202(6):837-48.

Leyva-Díaz E, López-Bendito G. In and out from the cortex: development of major forebrain connections. *Neuroscience.* 2013 Dec 19;254:26-44.

Lin L, Lesnick TG, Maraganore DM, Isacson O. Axon guidance and synaptic maintenance: preclinical markers for neurodegenerative disease and therapeutics. *Trends Neurosci.* 2009 Mar;32(3):142-9.

Li H, Collado M, Villasante A, Strati K, Ortega S, Cañamero M, Blasco MA, Serrano M. The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming. *Nature.* 2009 Aug 27;460(7259):1136-9.

Li Z, Wu F, Zhang X, Chai Y, Chen D, Yang Y, Xu K, Yin J, Li R, Shi H, Wang Z, Li X, Xiao J, Zhang H. Valproate Attenuates Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis in SH-SY5Y Cells via the AKT/GSK3 $\beta$  Signaling Pathway. *Int J Mol Sci.* 2017 Feb 8;18(2):315.

Licis A, Davis G, Eisenstein SA, Lugar HM, Hershey T. Sleep disturbances in Wolfram syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 2019 Aug 2;14(1):188.

Lin T, Ambasadhan R, Yuan X, Li W, Hilcove S, Abujarour R, Lin X, Hahm HS, Hao E, Hayek A, Ding S. A chemical platform for improved induction of human iPSCs. *Nat Methods.* 2009 Nov;6(11):805-8.

Lindahl M, Danilova T, Palm E, Lindholm P, Võikar V, Hakonen E, Ustinov J, Andressoo JO, Harvey BK, Otonkoski T, Rossi J, Saarma M. MANF is indispensable for the proliferation and survival of pancreatic  $\beta$  cells. *Cell Rep*. 2014 Apr 24;7(2):366-375.

Lipson KL, Fonseca SG, Ishigaki S, Nguyen LX, Foss E, Bortell R, Rossini AA, Urano F. Regulation of insulin biosynthesis in pancreatic beta cells by an endoplasmic reticulum-resident protein kinase IRE1. *Cell Metab*. 2006 Sep;4(3):245-54.

Liu S, Mauvais-Jarvis F. Rapid, nongenomic estrogen actions protect pancreatic islet survival. *Islets*. 2009 Nov-Dec;1(3):273-5.

Liu Z, Cai Y, Wang Y, Nie Y, Zhang C, Xu Y, Zhang X, Lu Y, Wang Z, Poo M, Sun Q. Cloning of Macaque Monkeys by Somatic Cell Nuclear Transfer. *Cell*. 2018 Feb 8;172(4):881-887.e7.

Loh YH, Agarwal S, Park IH, Urbach A, Huo H, Heffner GC, Kim K, Miller JD, Ng K, Daley GQ. Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood*. 2009 May 28;113(22):5476-9.

Lombardo F, Salzano G, Di Bella C, Aversa T, Pugliatti F, Cara S, Valenzise M, De Luca F, Rigoli L. Phenotypical and genotypical expression of Wolfram syndrome in 12 patients from a Sicilian district where this syndrome might not be so infrequent as generally expected. *J Endocrinol Invest*. 2014 Feb ;37(2) :195-202.

Long CR, Westhusin ME, Golding MC. Reshaping the transcriptional frontier: epigenetics and somatic cell nuclear transfer. *Mol Reprod Dev*. 2014 Feb;81(2):183-93.

Lowery LA, Van Vactor D. The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009 May;10(5):332-43.

Lu KP, Means AR. Regulation of the cell cycle by calcium and calmodulin. *Endocr Rev*. 1993 Feb;14(1):40-58.

Lu S, Kanekura K, Hara T, Mahadevan J, Spears LD, Osowski CM, Martinez R, Yamazaki-Inoue M, Toyoda M, Neilson A, Blanner P, Brown CM, Semenkovich CF, Marshall BA, Hershey T, Umezawa A, Greer PA, Urano F. A calcium-dependent protease as a potential therapeutic target for Wolfram syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Dec 9;111(49):E5292-301.

Lugar HM, Koller JM, Rutlin J, Eisenstein SA, Neyman O, Narayanan A, Chen L, Shimony JS, Hershey T. Evidence for altered neurodevelopment and neurodegeneration in Wolfram syndrome using longitudinal morphometry. *Sci Rep*. 2019 Apr 12;9(1):6010.

Lugar HM, Koller JM, Rutlin J, Marshall BA, Kanekura K, Urano F, Bischoff AN, Shimony JS, Hershey T; Washington University Wolfram Syndrome Research Study Group. Neuroimaging evidence of deficient axon myelination in Wolfram syndrome. *Sci Rep*. 2016 Feb 18;6:21167.

Luger AL, Sauer B, Lorenz NI, Engel AL, Braun Y, Voss M, Harter PN, Steinbach JP, Ronellenfisch MW. Doxycycline Impairs Mitochondrial Function and Protects Human Glioma Cells from Hypoxia-Induced Cell Death: Implications of Using Tet-Inducible Systems. *Int J Mol Sci*. 2018 May 17;19(5):1504.

Luuk H, Koks S, Plaas M, Hannibal J, Rehfeld JF, Vasar E. Distribution of Wfs1 protein in the central nervous system of the mouse and its relation to clinical symptoms of the Wolfram syndrome. *J Comp Neurol*. 2008 Aug 20;509(6):642-60.

## M

Magi S, Castaldo P, Macrì ML, Maiolino M, Matteucci A, Bastioli G, Gratteri S, Amoroso S, Lariccia V. Intracellular Calcium Dysregulation: Implications for Alzheimer's Disease. *Biomed Res Int*. 2016;2016:6701324.

Mahadevan J, Morikawa S, Yagi T, Abreu D, Lu S, Kanekura K, Brown CM, Urano F. A soluble endoplasmic reticulum factor as regenerative therapy for Wolfram syndrome. *Lab Invest*. 2020 Sep;100(9):1197-1207.

Maherali N, Ahfeldt T, Rigamonti A, Utikal J, Cowan C, Hochedlinger K. A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2008 Sep 11;3(3):340-5.

Mahmoudi S, Brunet A. Aging and reprogramming: a two-way street. *Curr Opin Cell Biol*. 2012 Dec;24(6):744-56.

Maitra A, Arking DE, Shivapurkar N, Ikeda M, Stastny V, Kassauei K, Sui G, Cutler DJ, Liu Y, Brimble SN, Noaksson K, Hyllner J, Schulz TC, Zeng X, Freed WJ, Crook J, Abraham S, Colman A, Sartipy P, Matsui S, Carpenter M, Gazdar AF, Rao M, Chakravarti A. Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. *Nat Genet*. 2005 Oct;37(10):1099-103.

Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, Hirami Y, Morinaga C, Daimon T, Fujihara M, Akimaru H, Sakai N, Shibata Y, Terada M, Nomiyama Y, Tanishima S, Nakamura M, Kamao H, Sugita S, Onishi A, Ito T, Fujita K, Kawamata S, Go MJ, Shinohara C, Hata KI, Sawada M, Yamamoto M, Ohta S, Ohara Y, Yoshida K, Kuwahara J, Kitano Y, Amano N, Umekage M, Kitaoka F, Tanaka A, Okada C, Takasu N, Ogawa S, Yamanaka S, Takahashi M. Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N Engl J Med*. 2017 Mar 16;376(11):1038-1046.

Mann F, Chauvet S, Rougon G. Semaphorins in development and adult brain: Implication for neurological diseases. *Prog Neurobiol*. 2007 Jun;82(2):57-79.

Marchetto MC, Belinson H, Tian Y, Freitas BC, Fu C, Vadodaria K, Beltrao-Braga P, Trujillo CA, Mendes APD, Padmanabhan K, Nunez Y, Ou J, Ghosh H, Wright R, Brennand K, Pierce K, Eichenfield L, Pramparo T, Eyster L, Barnes CC, Courchesne E, Geschwind DH, Gage FH, Wynshaw-Boris A, Muotri AR. Altered proliferation and networks in neural cells derived from idiopathic autistic individuals. *Mol Psychiatry*. 2017 Jun;22(6):820-835.

Marchetto MC, Carromeu C, Acab A, Yu D, Yeo GW, Mu Y, Chen G, Gage FH, Muotri AR. A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell*. 2010 Nov 12;143(4):527-39.

Marchetto MC, Winner B, Gage FH. Pluripotent stem cells in neurodegenerative and neurodevelopmental diseases. *Hum Mol Genet*. 2010 Apr 15;19(R1):R71-6.

Marchetto MC, Yeo GW, Kainohana O, Marsala M, Gage FH, Muotri AR. Transcriptional signature

and memory retention of human-induced pluripotent stem cells. *PLoS One*. 2009 Sep 18;4(9):e7076

Marchi S, Patergnani S, Missiroli S, Morciano G, Rimessi A, Wieckowski MR, Giorgi C, Pinton P. Mitochondrial and endoplasmic reticulum calcium homeostasis and cell death. *Cell Calcium*. 2018 Jan;69:62-72.

Mariani J, Simonini MV, Palejev D, Tomasini L, Coppola G, Szekely AM, Horvath TL, Vaccarino FM. Modeling human cortical development in vitro using induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jul 31;109(31):12770-5.

Marión RM, Strati K, Li H, Murga M, Blanco R, Ortega S, Fernandez-Capetillo O, Serrano M, Blasco MA. A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature*. 2009 Aug 27;460(7259):1149-53.

Marshall BA, Permutt MA, Paciorkowski AR, Hoekel J, Karzon R, Wasson J, Viehover A, White NH, Shimony JS, Manwaring L, Austin P, Hullar TE, Hershey T; Washington University Wolfram Study Group. Phenotypic characteristics of early Wolfram syndrome. *Orphanet J Rare Dis*. 2013 Apr 27;8:64.

Marthiens V, Gavard J, Padilla F, Monnet C, Castellani V, Lambert M, Mège RM. A novel function for cadherin-11 in the regulation of motor axon elongation and fasciculation. *Mol Cell Neurosci*. 2005 Apr;28(4):715-26.

Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 7634–7638, 1981.

Marton RM, Miura Y, Sloan SA, Li Q, Revah O, Levy RJ, Huguenard JR, Paşca SP. Differentiation and maturation of oligodendrocytes in human three-dimensional neural cultures. *Nat Neurosci*. 2019 Mar;22(3):484-491.

Mathews E, Dewees K, Diaz D, Favero C. White matter abnormalities in fetal alcohol spectrum disorders: Focus on axon growth and guidance. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2021 Apr;246(7):812-821.

Matoba S, Zhang Y. Somatic Cell Nuclear Transfer Reprogramming: Mechanisms and Applications. *Cell Stem Cell*. 2018 Oct 4;23(4):471-485.

Matsunaga K, Tanabe K, Inoue H, Okuya S, Ohta Y, Akiyama M, Taguchi A, Kora Y, Okayama N, Yamada Y, Wada Y, Amemiya S, Sugihara S, Nakao Y, Oka Y, Tanizawa Y. Wolfram syndrome in the Japanese population; molecular analysis of WFS1 gene and characterization of clinical features. *PLoS One*. 2014 Sep 11;9(9):e106906.

Maxwell KG, Augsornworawat P, Velazco-Cruz L, Kim MH, Asada R, Hoglebe NJ, Morikawa S, Urano F, Millman JR. Gene-edited human stem cell-derived  $\beta$  cells from a patient with monogenic diabetes reverse preexisting diabetes in mice. *Sci Transl Med*. 2020 Apr 22;12(540):eaax9106.

McFadden K, Minshew NJ. Evidence for dysregulation of axonal growth and guidance in the etiology of ASD. *Front Hum Neurosci*. 2013 Oct 22;7:671.

McGrath J, Solter D. Nuclear transplantation in mouse embryos. *J Exp Zool*. 1983 Nov;228(2):355-

62.

McTague A, Rossignoli G, Ferrini A, Barral S, Kurian MA. Genome Editing in iPSC-Based Neural Systems: From Disease Models to Future Therapeutic Strategies. *Front Genome Ed.* 2021 Mar 15;3:630600.

Meng L, Ely JJ, Stouffer RL, Wolf DP. Rhesus monkeys produced by nuclear transfer. *Biol Reprod.* 1997 Aug;57(2):454-9.

Mertens J, Reid D, Lau S, Kim Y, Gage FH. Aging in a Dish: iPSC-Derived and Directly Induced Neurons for Studying Brain Aging and Age-Related Neurodegenerative Diseases. *Annu Rev Genet.* 2018 Nov 23;52:271-293.

Miller JD, Ganat YM, Kishinevsky S, Bowman RL, Liu B, Tu EY, Mandal PK, Vera E, Shim JW, Kriks S, Taldone T, Fusaki N, Tomishima MJ, Krainc D, Milner TA, Rossi DJ, Studer L. Human iPSC-based modeling of late-onset disease via progerin-induced aging. *Cell Stem Cell.* 2013 Dec 5;13(6):691-705.

Miller RA, Ruddle FH. Pluripotent teratocarcinoma-thymus somatic cell hybrids. *Cell.* 1976 Sep;9(1):45-55.

Mishra R, Chen BS, Richa P, Yu-Wai-Man P. Wolfram syndrome: new pathophysiological insights and therapeutic strategies. *Therapeutic Advances in Rare Disease.* January 2021. *Ther Adv Rare Dis* 2021, Vol. 2 : 1-21

Missaire M, Hindges R. The role of cell adhesion molecules in visual circuit formation: from neurite outgrowth to maps and synaptic specificity. *Dev Neurobiol.* 2015 Jun;75(6):569-83.

Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell.* 2003 May 30;113(5):631-42.

Miura Y, Li MY, Birey F, Ikeda K, Revah O, Thete MV, Park JY, Puno A, Lee SH, Porteus MH, Paşca SP. Generation of human striatal organoids and cortico-striatal assembloids from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* 2020 Dec;38(12):1421-1430.

Molnár Z, Clowry GJ, Šestan N, Alzu'bi A, Bakken T, Hevner RF, Hüppi PS, Kostović I, Rakic P, Anton ES, Edwards D, Garcez P, Hoerder-Suabedissen A, Kriegstein A. New insights into the development of the human cerebral cortex. *J Anat.* 2019 Sep;235(3):432-451.

Molyneaux BJ, Arlotta P, Menezes JR, Macklis JD. Neuronal subtype specification in the cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci.* 2007 Jun;8(6):427-37.

Moreland T, Poulain FE. To Stick or Not to Stick: The Multiple Roles of Cell Adhesion Molecules in Neural Circuit Assembly. *Front Neurosci.* 2022 Apr 28;16:889155.

Morikawa S, Blacher L, Onwumere C, Urano F. Loss of Function of WFS1 Causes ER Stress-Mediated Inflammation in Pancreatic Beta-Cells. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2022 Mar 25;13:849204.

Mukhtar T, Taylor V. Untangling Cortical Complexity During Development. *J Exp Neurosci.* 2018 Mar

1;12:1179069518759332.

Munshani S, Ibrahim EY, Domenicano I, Ehrlich BE. The Impact of Mutations in Wolframin on Psychiatric Disorders. *Front Pediatr*. 2021 Oct 21;9:718132.

Murai KK, Nguyen LN, Irie F, Yamaguchi Y, Pasquale EB. Control of hippocampal dendritic spine morphology through ephrin-A3/EphA4 signaling. *Nat Neurosci*. 2003 Feb;6(2):153-60.

Murphy MP, Hartley RC. Mitochondria as a therapeutic target for common pathologies. *Nat Rev Drug Discov*. 2018 Dec;17(12):865-886.

## N

Nami F, Ramezankhani R, Vandenabeele M, Vervliet T, Vogels K, Urano F, Verfaillie C. Fast and Efficient Generation of Isogenic Induced Pluripotent Stem Cell Lines Using Adenine Base Editing. *CRISPR J*. 2021 Aug;4(4):502-518.

Narsinh KH, Jia F, Robbins RC, Kay MA, Longaker MT, Wu JC. Generation of adult human induced pluripotent stem cells using nonviral minicircle DNA vectors. *Nat Protoc*. 2011 Jan;6(1):78-88.

Nelakanti RV, Kooreman NG, Wu JC. Teratoma formation: a tool for monitoring pluripotency in stem cell research. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 2015 Feb 2;32:4A.8.1-4A.8.17.

Nguyen LD, Fischer TT, Abreu D, Arroyo A, Urano F, Ehrlich BE. Calpain inhibitor and ibudilast rescue  $\beta$  cell functions in a cellular model of Wolfram syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020 Jul 21;117(29):17389-17398.

Nguyen LD, Petri ET, Huynh LK, Ehrlich BE. Characterization of NCS1-InsP3R1 interaction and its functional significance. *J Biol Chem*. 2019 Dec 6;294(49):18923-18933.

Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Schöler H, Smith A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*. 1998 Oct 30;95(3):379-91.

Noormets K, Kõks S, Muldmaa M, Mauring L, Vasar E, Tillmann V. Sex differences in the development of diabetes in mice with deleted wolframin (Wfs1) gene. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2011 May;119(5):271-5.

Norat P, Soldozy S, Sokolowski JD, Gorick CM, Kumar JS, Chae Y, Yağmurlu K, Prada F, Walker M, Levitt MR, Price RJ, Tvrdik P, Kalani MYS. Mitochondrial dysfunction in neurological disorders: Exploring mitochondrial transplantation. *NPJ Regen Med*. 2020 Nov 23;5(1):22.

## O

Oceguera-Yanez F, Kim SI, Matsumoto T, Tan GW, Xiang L, Hatani T, Kondo T, Ikeya M, Yoshida Y, Inoue H, Woltjen K. Engineering the AAVS1 locus for consistent and scalable transgene expression in human iPSCs and their differentiated derivatives. *Methods*. 2016 May 15;101:43-55.

Oh SI, Lee CK, Cho KJ, Lee KO, Cho SG, Hong S. Technological progress in generation of induced pluripotent stem cells for clinical applications. *Scientific World Journal*. 2012;2012:417809.

Oh Y, Jang J. Directed Differentiation of Pluripotent Stem Cells by Transcription Factors. *Mol Cells*. 2019 Mar 31;42(3):200-209

Ohi Y, Qin H, Hong C, Blouin L, Polo JM, Guo T, Qi Z, Downey SL, Manos PD, Rossi DJ, Yu J, Hebrok M, Hochedlinger K, Costello JF, Song JS, Ramalho-Santos M. Incomplete DNA methylation underlies a transcriptional memory of somatic cells in human iPSCs. *Nat Cell Biol*. 2011 May;13(5):541-9.

Oksanen M, Petersen AJ, Naumenko N, Puttonen K, Lehtonen Š, Gubert Olivé M, Shakirzyanova A, Leskelä S, Sarajärvi T, Viitanen M, Rinne JO, Hiltunen M, Haapasalo A, Giniatullin R, Tavi P, Zhang SC, Kanninen KM, Hämäläinen RH, Koistinaho J. PSEN1 Mutant iPSC-Derived Model Reveals Severe Astrocyte Pathology in Alzheimer's Disease. *Stem Cell Reports*. 2017 Dec 12;9(6):1885-1897.

Okumura M, Kato T, Miura M, Chihara T. Hierarchical axon targeting of *Drosophila* olfactory receptor neurons specified by the proneural transcription factors Atonal and Amos. *Genes Cells*. 2016 Jan;21(1):53-64.

Oldershaw RA, Baxter MA, Lowe ET, Bates N, Grady LM, Soncin F, Brison DR, Hardingham TE, Kimber SJ. Directed differentiation of human embryonic stem cells toward chondrocytes. *Nat Biotechnol*. 2010 Nov;28(11):1187-94.

Olzmann JA, Carvalho P. Dynamics and functions of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019 Mar;20(3):137-155.

Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Jul;4(7):552-65.

Osman AA, Saito M, Makepeace C, Permutt MA, Schlesinger P, Mueckler M. Wolframin expression induces novel ion channel activity in endoplasmic reticulum membranes and increases intracellular calcium. *J Biol Chem*. 2003 Dec 26;278(52):52755-62.

## P

Palmieri C, Loi P, Ptak G, Della Salda L. Review paper: a review of the pathology of abnormal placentae of somatic cell nuclear transfer clone pregnancies in cattle, sheep, and mice. *Vet Pathol*. 2008 Nov;45(6):865-80.

Paquet D, Kwart D, Chen A, Sproul A, Jacob S, Teo S, Olsen KM, Gregg A, Noggle S, Tessier-Lavigne M. Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. *Nature*. 2016 May 5;533(7601):125-9.

Pasterkamp RJ. Getting neural circuits into shape with semaphorins. *Nat Rev Neurosci*. 2012 Sep;13(9):605-18.

Pasterkamp RJ, Giger RJ. Semaphorin function in neural plasticity and disease. *Curr Opin Neurobiol*. 2009 Jun;19(3):263-74.

Paulsen B, Velasco S, Kedaigle AJ, Pignoni M, Quadrato G, Deo AJ, Adiconis X, Uzquiano A, Sartore R, Yang SM, Simmons SK, Symvoulidis P, Kim K, Tsafou K, Podury A, Abbate C, Tucewicz A, Smith SN, Albanese A, Barrett L, Sanjana NE, Shi X, Chung K, Lage K, Boyden ES, Regev A, Levin JZ, Arlotta P. Autism genes converge on asynchronous development of shared neuron classes. *Nature*. 2022 Feb;602(7896):268-273.

- Pekkanen-Mattila M, Peltö-Huikko M, Kujala V, Suuronen R, Skottman H, Aalto-Setälä K, Kerkelä E. Spatial and temporal expression pattern of germ layer markers during human embryonic stem cell differentiation in embryoid bodies. *Histochem Cell Biol.* 2010 May;133(5):595-606.
- Perrier AL, Tabar V, Barberi T, Rubio ME, Bruses J, Topf N, Harrison NL, Studer L. Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Aug 24;101(34):12543-8.
- Philbrook C, Fritz E, Weiher H. Expressional and functional studies of Wolframin, the gene function deficient in Wolfram syndrome, in mice and patient cells. *Exp Gerontol.* 2005 Aug-Sep;40(8-9):671-8.
- Pickett KA, Duncan RP, Hoekel J, Marshall B, Hershey T, Earhart GM; Washington University Wolfram Study Group. Early presentation of gait impairment in Wolfram Syndrome. *Orphanet J Rare Dis.* 2012 Dec 8;7:92.
- Pierfelice T, Alberi L, Gaiano N. Notch in the vertebrate nervous system: an old dog with new tricks. *Neuron.* 2011 Mar 10;69(5):840-55.
- Pittman AJ, Law MY, Chien CB. Pathfinding in a large vertebrate axon tract: isotypic interactions guide retinotectal axons at multiple choice points. *Development.* 2008 Sep;135(17):2865-71.
- Plaas M, Seppa K, Reimets R, Jagomäe T, Toots M, Koppel T, Vallisoo T, Nigul M, Heinla I, Meier R, Kaasik A, Piirsoo A, Hickey MA, Terasmaa A, Vasar E. *Wfs1*-deficient rats develop primary symptoms of Wolfram syndrome: insulin-dependent diabetes, optic nerve atrophy and medullary degeneration. *Sci Rep.* 2017 Aug 31;7(1):10220.
- Pollerberg GE, Thelen K, Theiss MO, Hochlehnert BC. The role of cell adhesion molecules for navigating axons: density matters. *Mech Dev.* 2013 Jun-Aug;130(6-8):359-72.
- Polymeropoulos MH, Swift RG, Swift M. Linkage of the gene for Wolfram syndrome to markers on the short arm of chromosome 4. *Nat Genet.* 1994 Sep;8(1):95-7.
- Poplawski GH, Tranziska AK, Leshchyn'ska I, Meier ID, Streichert T, Sytnyk V, Schachner M. L1CAM increases MAP2 expression via the MAPK pathway to promote neurite outgrowth. *Mol Cell Neurosci.* 2012 Jun;50(2):169-78.
- Porosk R, Kilk K, Mahlapuu R, Terasmaa A, Soomets U. Glutathione system in Wolfram syndrome 1-deficient mice. *Mol Med Rep.* 2017 Nov;16(5):7092-7097.
- Poston CN, Krishnan SC, Bazemore-Walker CR. In-depth proteomic analysis of mammalian mitochondria-associated membranes (MAM). *J Proteomics.* 2013 Feb 21;79:219-30.
- Prinz WA, Toulmay A, Balla T. The functional universe of membrane contact sites. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020 Jan;21(1):7-24.
- Przyborski SA. Differentiation of human embryonic stem cells after transplantation in immunodeficient mice. *Stem Cells.* 2005 Oct;23(9):1242-50.

## Q

Qi T, Wu F, Xie Y, Gao S, Li M, Pu J, Li D, Lan F, Wang Y. Base Editing Mediated Generation of Point Mutations Into Human Pluripotent Stem Cells for Modeling Disease. *Front Cell Dev Biol.* 2020 Sep 25;8:590581.

## R

Rallu M, Corbin JG, Fishell G. Parsing the prosencephalon. *Nat Rev Neurosci.* 2002 Dec;3(12):943-51.

Ramalingam S, London V, Kandavelou K, Cebotaru L, Guggino W, Civin C, Chandrasegaran S. Generation and genetic engineering of human induced pluripotent stem cells using designed zinc finger nucleases. *Stem Cells Dev.* 2013 Feb 15;22(4):595-610.

Rangaraju V, Tom Dieck S, Schuman EM. Local translation in neuronal compartments: how local is local? *EMBO Rep.* 2017 May;18(5):693-711.

Rao SR, Kostic A, Baillargeon P, Fernandez-Vega V, de Anda MR, Fletcher K, Shumate J, Scampavia L, Buxbaum JD, Spicer TP. Screening for modulators of autism spectrum disorder using induced human neurons. *SLAS Discov.* 2022 Feb 3:S2472-5552(22)00009-0.

Rash BG, Richards LJ. A role for cingulate pioneering axons in the development of the corpus callosum. *J Comp Neurol.* 2001 May 28;434(2):147-57.

Rivière C, Kaboré FA, Chaussonot A, Paquis-Flucklinger V, Lenne-Aurier K, Gaillet S, Boissier R, Karsenty G. Troubles vésicosphinctériens au cours du syndrome de Wolfram [Bladder-sphincter disorders associated with Wolfram syndrome]. *Prog Urol.* 2013 Jun;23(8):519-23. French.

Richards M, Tan SP, Tan JH, Chan WK, Bongso A. The transcriptome profile of human embryonic stem cells as defined by SAGE. *Stem Cells.* 2004;22(1):51-64.

Riggs AC, Bernal-Mizrachi E, Ohsugi M, Wasson J, Fatrai S, Welling C, Murray J, Schmidt RE, Herrera PL, Permutt MA. Mice conditionally lacking the Wolfram gene in pancreatic islet beta cells exhibit diabetes as a result of enhanced endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Diabetologia.* 2005 Nov;48(11):2313-21.

Rigoli L, Caruso V, Salzano G, Lombardo F. Wolfram Syndrome 1: From Genetics to Therapy. *Int J Environ Res Public Health.* 2022 Mar 9;19(6):3225.

Rigoli L, Lombardo F, Di Bella C. Wolfram syndrome and WFS1 gene. *Clin Genet.* 2011 Feb;79(2):103-17.

Robinton DA, Daley GQ. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature.* 2012 Jan 18;481(7381):295-305.

Rogers SL, Letourneau PC, Pech IV. The role of fibronectin in neural development. *Dev Neurosci.* 1989;11(4-5):248-65.

Rohayem J, Ehlers C, Wiedemann B, Holl R, Oexle K, Kordonouri O, Salzano G, Meissner T, Burger W, Schober E, Huebner A, Lee-Kirsch MA; Wolfram Syndrome Diabetes Writing Group. Diabetes

and neurodegeneration in Wolfram syndrome: a multicenter study of phenotype and genotype. *Diabetes Care*. 2011 Jul;34(7):1503-10.

Roig-Puiggros S, Vigouroux RJ, Beckman D, Bocai NI, Chiou B, Davimes J, Gomez G, Grassi S, Hoque A, Karikari TK, Kiffer F, Lopez M, Lunghi G, Mazenganya P, Meier S, Olguín-Albuerne M, Oliveira MM, Paraíso-Luna J, Pradhan J, Radiske A, Ramos-Hryb AB, Ribeiro MC, Schellino R, Selles MC, Singh S, Theotokis P, Chédotal A. Construction and reconstruction of brain circuits: normal and pathological axon guidance. *J Neurochem*. 2020 Apr;153(1):10-32.

Rojas-Charry L, Nardi L, Methner A, Schmeisser MJ. Abnormalities of synaptic mitochondria in autism spectrum disorder and related neurodevelopmental disorders. *J Mol Med (Berl)*. 2021 Feb;99(2):161-178.

Rolan P, Hutchinson M, Johnson K. Ibudilast: a review of its pharmacology, efficacy and safety in respiratory and neurological disease. *Expert Opin Pharmacother*. 2009 Dec;10(17):2897-904.

Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Jul;8(7):519-29.

Rossignol DA, Frye RE. Mitochondrial dysfunction in autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis. *Mol Psychiatry*. 2012 Mar;17(3):290-314.

Rothberg JM, Hartley DA, Walther Z, Artavanis-Tsakonas S. slit: an EGF-homologous locus of *D. melanogaster* involved in the development of the embryonic central nervous system. *Cell*. 1988 Dec 23;55(6):1047-59.

Rove KO, Vricella GJ, Hershey T, Thu MH, Lugar HM, Vetter J, Marshall BA, Austin PF. Lower Urinary Tract Dysfunction and Associated Pons Volume in Patients with Wolfram Syndrome. *J Urol*. 2018 Nov;200(5):1107-1113.

Rowe RG, Daley GQ. Induced pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nat Rev Genet*. 2019 Jul;20(7):377-388.

Rubenstein JL. Annual Research Review: Development of the cerebral cortex: implications for neurodevelopmental disorders. *J Child Psychol Psychiatry*. 2011 Apr;52(4):339-55.

Ruillier V, Tournois J, Boissart C, Lasbareilles M, Mahé G, Chatrousse L, Cailleret M, Peschanski M, Benchoua A. Rescuing compounds for Lesch-Nyhan disease identified using stem cell-based phenotypic screening. *JCI Insight*. 2020 Feb 27;5(4):e132094.

## S

Sahara S, O'Leary DD. Fgf10 regulates transition period of cortical stem cell differentiation to radial glia controlling generation of neurons and basal progenitors. *Neuron*. 2009 Jul 16;63(1):48-62.

Sakakibara Y, Sekiya M, Fujisaki N, Quan X, Iijima KM. Knockdown of *wfs1*, a fly homolog of Wolfram syndrome 1, in the nervous system increases susceptibility to age- and stress-induced neuronal dysfunction and degeneration in *Drosophila*. *PLoS Genet*. 2018 Jan 22;14(1):e1007196.

Sakurai T. The role of cell adhesion molecules in brain wiring and neuropsychiatric disorders. *Mol*

Cell Neurosci. 2017 Jun;81:4-11.

Samara A, Lugar HM, Hershey T, Shimony JS. Longitudinal Assessment of Neuroradiologic Features in Wolfram Syndrome. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2020 Dec;41(12):2364-2369.

Samara A, Rahn R, Neyman O, Park KY, Samara A, Marshall B, Dougherty J, Hershey T. Developmental hypomyelination in Wolfram syndrome: new insights from neuroimaging and gene expression analyses. *Orphanet J Rare Dis*. 2019 Dec 3;14(1):279.

Sandoe J, Eggan K. Opportunities and challenges of pluripotent stem cell neurodegenerative disease models. *Nat Neurosci*. 2013 Jul;16(7):780-9.

Scaramuzzi M, Kumar P, Peachey N, Nucci P, Traboulsi EI. Evidence of retinal degeneration in Wolfram syndrome. *Ophthalmic Genet*. 2019 Feb;40(1):34-38.

Scherthaner-Reiter MH, Stratakis CA, Luger A. Genetics of Diabetes Insipidus. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2017 Jun;46(2):305-334.

Schmidt-Kastner R, Kreczmanski P, Preising M, Diederer R, Schmitz C, Reis D, Blanks J, Dorey CK. Expression of the diabetes risk gene wolframin (WFS1) in the human retina. *Exp Eye Res*. 2009 Oct;89(4):568-74.

Schon EA, Przedborski S. Mitochondria: the next (neurode)generation. *Neuron*. 2011 Jun 23;70(6):1033-53.

Schwamborn JC. Is Parkinson's Disease a Neurodevelopmental Disorder and Will Brain Organoids Help Us to Understand It? *Stem Cells Dev*. 2018 Jul 15;27(14):968-975.

Schwarz DS, Blower MD. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cell Mol Life Sci*. 2016 Jan;73(1):79-94.

Scolding NJ, Kellar-Wood HF, Shaw C, Shneerson JM, Antoun N. Wolfram syndrome: hereditary diabetes mellitus with brainstem and optic atrophy. *Ann Neurol*. 1996 Mar;39(3):352-60.

Seppa K, Jagomäe T, Kukker KG, Reimets R, Pastak M, Vasar E, Terasmaa A, Plaas M. Liraglutide, 7,8-DHF and their co-treatment prevents loss of vision and cognitive decline in a Wolfram syndrome rat model. *Sci Rep*. 2021 Jan 26;11(1):2275.

Seppa K, Toots M, Reimets R, Jagomäe T, Koppel T, Pallase M, Hasselholt S, Krogsbæk Mikkelsen M, Randel Nyengaard J, Vasar E, Terasmaa A, Plaas M. GLP-1 receptor agonist liraglutide has a neuroprotective effect on an aged rat model of Wolfram syndrome. *Sci Rep*. 2019 Oct 31;9(1):15742.

Sequeira A, Kim C, Seguin M, Lesage A, Chawky N, Desautels A, Tousignant M, Vanier C, Lipp O, Benkelfat C, Rouleau G, Turecki G. Wolfram syndrome and suicide: Evidence for a role of WFS1 in suicidal and impulsive behavior. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2003 May 15;119B(1):108-13.

Shahin A, Mahsa J, Hamideh M, Mahya F. Assessment of Genetic Mutations in WFS1 & CISD2 in Wolfram Syndrome Human. *On J Neur & Br Disord* 1(1)- 2018. OJNBD.MS.ID.000104.

Shaker MR, Pietrogrande G, Martin S, Lee JH, Sun W, Wolvetang EJ. Rapid and Efficient Generation of Myelinating Human Oligodendrocytes in Organoids. *Front Cell Neurosci*. 2021 Mar 17;15:631548.

Shang L, Hua H, Foo K, Martinez H, Watanabe K, Zimmer M, Kahler DJ, Freeby M, Chung W, LeDuc C, Goland R, Leibel RL, Egli D.  $\beta$ -cell dysfunction due to increased ER stress in a stem cell model of Wolfram syndrome. *Diabetes*. 2014 Mar;63(3):923-33.

Shannon P, Becker L, Deck J. Evidence of widespread axonal pathology in Wolfram syndrome. *Acta Neuropathol*. 1999 Sep;98(3):304-8.

Sheridan SD, Theriault KM, Reis SA, Zhou F, Madison JM, Daheron L, Loring JF, Haggarty SJ. Epigenetic characterization of the FMR1 gene and aberrant neurodevelopment in human induced pluripotent stem cell models of fragile X syndrome. *PLoS One*. 2011;6(10):e26203.

Shi Y, Kirwan P, Livesey FJ. Directed differentiation of human pluripotent stem cells to cerebral cortex neurons and neural networks. *Nat Protoc*. 2012 Oct;7(10):1836-46.

Shi Y, Kirwan P, Smith J, Robinson HP, Livesey FJ. Human cerebral cortex development from pluripotent stem cells to functional excitatory synapses. *Nat Neurosci*. 2012 Feb 5;15(3):477-86, S1.

Shoulders MD, Ryno LM, Genereux JC, Moresco JJ, Tu PG, Wu C, Yates JR 3rd, Su AI, Kelly JW, Wiseman RL. Stress-independent activation of XBP1s and/or ATF6 reveals three functionally diverse ER proteostasis environments. *Cell Rep*. 2013 Apr 25;3(4):1279-92.

Simsek E, Simsek T, Tekgöl S, Hosal S, Seyrantepe V, Aktan G. Wolfram (DIDMOAD) syndrome: a multidisciplinary clinical study in nine Turkish patients and review of the literature. *Acta Paediatr*. 2003;92(1):55-61.

Skottman H, Hovatta O. Culture conditions for human embryonic stem cells. *Reproduction*. 2006 Nov;132(5):691-8.

Sloan SA, Darmanis S, Huber N, Khan TA, Birey F, Caneda C, Reimer R, Quake SR, Barres BA, Paşca SP. Human Astrocyte Maturation Captured in 3D Cerebral Cortical Spheroids Derived from Pluripotent Stem Cells. *Neuron*. 2017 Aug 16;95(4):779-790.e6.

Slosarek EL, Schuh AL, Pustova I, Johnson A, Bird J, Johnson M, Frankel EB, Bhattacharya N, Hanna MG, Burke JE, Ruhl DA, Quinney K, Block S, Peotter JL, Chapman ER, Sheets MD, Butcher SE, Stagg SM, Audhya A. Pathogenic TFG Mutations Underlying Hereditary Spastic Paraplegia Impair Secretory Protein Trafficking and Axon Fasciculation. *Cell Rep*. 2018 Aug 28;24(9):2248-2260.

Šmít D, Fouquet C, Pincet F, Zapotocky M, Trembleau A. Axon tension regulates fasciculation/defasciculation through the control of axon shaft zippering. *Elife*. 2017 Apr 19;6:e19907.

Smith CJ, Crock PA, King BR, Meldrum CJ, Scott RJ. Phenotype-genotype correlations in a series of wolfram syndrome families. *Diabetes Care*. 2004 Aug;27(8):2003-9.

Smith GM, Gallo G. The role of mitochondria in axon development and regeneration. *Dev Neurobiol*. 2018 Mar;78(3):221-237.

- Smith JR, Vallier L, Lupo G, Alexander M, Harris WA, Pedersen RA. Inhibition of Activin/Nodal signaling promotes specification of human embryonic stem cells into neuroectoderm. *Dev Biol.* 2008 Jan 1;313(1):107-17.
- Smith KP, Luong MX, Stein GS. Pluripotency: toward a gold standard for human ES and iPS cells. *J Cell Physiol.* 2009 Jul;220(1):21-9.
- Smith WC, Harland RM. Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. *Cell.* 1992 Sep 4;70(5):829-40.
- Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, Gao Q, Bell GW, Cook EG, Hargus G, Blak A, Cooper O, Mitalipova M, Isacson O, Jaenisch R. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell.* 2009 Mar 6;136(5):964-77.
- Soukup SF, Vanhauwaert R, Verstreken P. Parkinson's disease: convergence on synaptic homeostasis. *EMBO J.* 2018 Sep 14;37(18):e98960.
- Sossin WS, Costa-Mattioli M. Translational Control in the Brain in Health and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2019 Aug 1;11(8):a032912.
- Spead O, Poulain FE. Trans-Axonal Signaling in Neural Circuit Wiring. *Int J Mol Sci.* 2020 Jul 21;21(14):5170.
- Sperry RW. Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fiber patterns and connections. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1963 Oct;50(4):703-10.
- Spieß M, Beuret N, Rutishauser J. Genetic forms of neurohypophyseal diabetes insipidus. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2020 Sep;34(5):101432.
- Sriburi R, Jackowski S, Mori K, Brewer JW. XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 2004 Oct 11;167(1):35-41.
- Srikanth P, Young-Pearse TL. Stem cells on the brain: modeling neurodevelopmental and neurodegenerative diseases using human induced pluripotent stem cells. *J Neurogenet.* 2014 Mar-Jun;28(1-2):5-29.
- Steichen C, Hannoun Z, Luce E, Hauet T, Dubart-Kupperschmitt A. Genomic integrity of human induced pluripotent stem cells: Reprogramming, differentiation and applications. *World J Stem Cells.* 2019 Oct 26;11(10):729-747.
- Sternecker JL, Reinhardt P, Schöler HR. Investigating human disease using stem cell models. *Nat Rev Genet.* 2014 Sep;15(9):625-39.
- Stipursky J, Francis D, Dezone RS, Bérnago de Araújo AP, Souza L, Moraes CA, Alcantara Gomes FC. TGF- $\beta$ 1 promotes cerebral cortex radial glia-astrocyte differentiation in vivo. *Front Cell Neurosci.* 2014 Nov 21;8:393.
- Stoeckli ET. Understanding axon guidance: are we nearly there yet? *Development.* 2018 May 14;145(10):dev151415.

Strom TM, Hörtnagel K, Hofmann S, Gekeler F, Scharfe C, Rabl W, Gerbitz KD, Meitinger T. Diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy and deafness (DIDMOAD) caused by mutations in a novel gene (wolframin) coding for a predicted transmembrane protein. *Hum Mol Genet.* 1998 Dec;7(13):2021-8.

Sullivan S, Stacey GN, Akazawa C, Aoyama N, Baptista R, Bedford P, Bennaceur Griscelli A, Chandra A, Elwood N, Girard M, Kawamata S, Hanatani T, Latsis T, Lin S, Ludwig TE, Malygina T, Mack A, Mountford JC, Noggle S, Pereira LV, Price J, Sheldon M, Srivastava A, Stachelscheid H, Velayudhan SR, Ward NJ, Turner ML, Barry J, Song J. Quality control guidelines for clinical-grade human induced pluripotent stem cell lines. *Regen Med.* 2018 Oct;13(7):859-866.

Swanson MR, Wolff JJ, Shen MD, Styner M, Estes A, Gerig G, McKinstry RC, Botteron KN, Piven J, Hazlett HC; Infant Brain Imaging Study (IBIS) Network. Development of White Matter Circuitry in Infants With Fragile X Syndrome. *JAMA Psychiatry.* 2018 May 1;75(5):505-513.

Swift M, Swift RG. Psychiatric disorders and mutations at the Wolfram syndrome locus. *Biol Psychiatry.* 2000 May 1;47(9):787-93.

Swift RG, Perkins DO, Chase CL, Sadler DB, Swift M. Psychiatric disorders in 36 families with Wolfram syndrome. *Am J Psychiatry.* 1991 Jun;148(6):775-9.

## T

Tada M, Takahama Y, Abe K, Nakatsuji N, Tada T. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr Biol.* 2001 Oct 2;11(19):1553-8.

Tagle DA. The NIH microphysiological systems program: developing in vitro tools for safety and efficacy in drug development. *Curr Opin Pharmacol.* 2019 Oct;48:146-154.

Takahashi J. iPS cell-based therapy for Parkinson's disease: A Kyoto trial. *Regen Ther.* 2020 Sep 15;13:18-22.

Takahashi J. Preparing for first human trial of induced pluripotent stem cell-derived cells for Parkinson's disease: an interview with Jun Takahashi. *Regen Med.* 2019 Feb;14(2):93-95.

Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007 Nov 30;131(5):861-72.

Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006 Aug 25;126(4):663-76.

Takeda K, Inoue H, Tanizawa Y, Matsuzaki Y, Oba J, Watanabe Y, Shinoda K, Oka Y. WFS1 (Wolfram syndrome 1) gene product: predominant subcellular localization to endoplasmic reticulum in cultured cells and neuronal expression in rat brain. *Hum Mol Genet.* 2001 Mar 1;10(5):477-84.

Tanaka Y, Cakir B, Xiang Y, Sullivan GJ, Park IH. Synthetic Analyses of Single-Cell Transcriptomes from Multiple Brain Organoids and Fetal Brain. *Cell Rep.* 2020 Feb 11;30(6):1682-1689.e3.

Tang XY, Wu S, Wang D, Chu C, Hong Y, Tao M, Hu H, Xu M, Guo X, Liu Y. Human organoids in basic

research and clinical applications. *Signal Transduct Target Ther.* 2022 May 24;7(1):168.

Tannenbaum SE, Turetsky TT, Singer O, Aizenman E, Kirshberg S, Ilouz N, Gil Y, Berman-Zaken Y, Perlman TS, Geva N, Levy O, Arbell D, Simon A, Ben-Meir A, Shufaro Y, Laufer N, Reubinoff BE. Derivation of xeno-free and GMP-grade human embryonic stem cells--platforms for future clinical applications. *PLoS One.* 2012;7(6):e35325.

Tarasov AI, Semplici F, Ravier MA, Bellomo EA, Pullen TJ, Gilon P, Sekler I, Rizzuto R, Rutter GA. The mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uniporter MCU is essential for glucose-induced ATP increases in pancreatic  $\beta$ -cells. *PLoS One.* 2012;7(7):e39722.

Tatsumi Y, Matsumoto N, Iibe N, Watanabe N, Torii T, Sango K, Homma K, Miyamoto Y, Sakagami H, Yamauchi J. CMT type 2N disease-associated AARS mutant inhibits neurite growth that can be reversed by valproic acid. *Neurosci Res.* 2019 Feb;139:69-78.

Tekgöl S, Oge O, Simşek E, Yordam N, Kendi S. Urological manifestations of the Wolfram syndrome: observations in 14 patients. *J Urol.* 1999 Feb;161(2):616-7.

Tekko T, Lakspere T, Allikalt A, End J, Kõlvart KR, Jagomäe T, Terasmaa A, Philips MA, Visnapuu T, Väärtnõu F, Gilbert SF, Rincken A, Vasar E, Lilleväli K. Wfs1 is expressed in dopaminergic regions of the amniote brain and modulates levels of D1-like receptors. *PLoS One.* 2017 Mar 7;12(3):e0172825.

Tekko T, Lilleväli K, Luuk H, Sütt S, Truu L, Örd T, Möls M, Vasar E. Initiation and developmental dynamics of Wfs1 expression in the context of neural differentiation and ER stress in mouse forebrain. *Int J Dev Neurosci.* 2014 Jun;35:80-8.

Temple S. The development of neural stem cells. *Nature.* 2001 Nov 1;414(6859):112-7.

Tessier-Lavigne M, Goodman CS. The molecular biology of axon guidance. *Science.* 1996 Nov 15;274(5290):1123-33.

Tewary M, Shakiba N, Zandstra PW. Stem cell bioengineering: building from stem cell biology. *Nat Rev Genet.* 2018 Oct;19(10):595-614.

Thanos A, Farmakis A, Sami Z, Davillas E, Davillas N. Three cases of didmoad or Wolfram's syndrome: urological aspects. *J Urol.* 1992 Jul;148(1):150-2.

Thompson CJ, Charlton J, Walford S, Baird J, Hearnshaw J, McCulloch A, Kelly W, Baylis PH. Vasopressin secretion in the DIDMOAD (Wolfram) syndrome. *Q J Med.* 1989 Apr;71(264):333-45. PMID: 2687931.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998 Nov 6;282(5391):1145-7.

Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA, Hearn JP. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Aug 15;92(17):7844-8.

Thorne N, Malik N, Shah S, Zhao J, Class B, Aguisanda F, Southall N, Xia M, McKew JC, Rao M, Zheng W. High-Throughput Phenotypic Screening of Human Astrocytes to Identify Compounds That

Protect Against Oxidative Stress. *Stem Cells Transl Med.* 2016 May;5(5):613-27.

Thuan NV, Kishigami S, Wakayama T. How to improve the success rate of mouse cloning technology. *J Reprod Dev.* 2010 Feb;56(1):20-30.

Tiscornia G, Vivas EL, Izpisua Belmonte JC. Diseases in a dish: modeling human genetic disorders using induced pluripotent cells. *Nat Med.* 2011 Dec;17(12):1570-6.

Tong M, Jun T, Nie Y, Hao J, Fan D. The Role of the Slit/Robo Signaling Pathway. *J Cancer.* 2019 Jun 2;10(12):2694-2705.

Toots M, Reimets R, Plaas M, Vasar E. Muscarinic Agonist Ameliorates Insulin Secretion in *Wfs1*-Deficient Mice. *Can J Diabetes.* 2019 Mar;43(2):115-120.

Touboul T, Hannan NR, Corbineau S, Martinez A, Martinet C, Branchereau S, Mainot S, Strick-Marchand H, Pedersen R, Di Santo J, Weber A, Vallier L. Generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells under chemically defined conditions that recapitulate liver development. *Hepatology.* 2010 May;51(5):1754-65.

Treiny R, Kaselis A, Jover E, Bagnard D, Šatkauskas S. R-type calcium channels are crucial for semaphorin 3A-induced DRG axon growth cone collapse. *PLoS One.* 2014 Jul 17;9(7):e102357.

Treubert-Zimmermann U, Heyers D, Redies C. Targeting axons to specific fiber tracts in vivo by altering cadherin expression. *J Neurosci.* 2002 Sep 1;22(17):7617-26.

Tropepe V, Hitoshi S, Sirard C, Mak TW, Rossant J, van der Kooy D. Direct neural fate specification from embryonic stem cells: a primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism. *Neuron.* 2001 Apr;30(1):65-78.

Tsubooka N, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K, Nakagawa M, Yamanaka S. Roles of *Sall4* in the generation of pluripotent stem cells from blastocysts and fibroblasts. *Genes Cells.* 2009 Jun;14(6):683-94.

## U

Ueda K, Kawano J, Takeda K, Yujiri T, Tanabe K, Anno T, Akiyama M, Nozaki J, Yoshinaga T, Koizumi A, Shinoda K, Oka Y, Tanizawa Y. Endoplasmic reticulum stress induces *Wfs1* gene expression in pancreatic beta-cells via transcriptional activation. *Eur J Endocrinol.* 2005 Jul;153(1):167-76.

Urbach A, Bar-Nur O, Daley GQ, Benvenisty N. Differential modeling of fragile X syndrome by human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell.* 2010 May 7;6(5):407-11.

Urra H, Dufey E, Avril T, Chevet E, Hetz C. Endoplasmic Reticulum Stress and the Hallmarks of Cancer. *Trends Cancer.* 2016 May;2(5):252-262.

Ustaoglu M, Onder F, Karapapak M, Taslidere H, Guven D. Ophthalmic, systemic, and genetic characteristics of patients with Wolfram syndrome. *Eur J Ophthalmol.* 2020 Sep;30(5):1099-1105.

## V

Valenzuela DM, Economides AN, Rojas E, Lamb TM, Nuñez L, Jones P, Lp NY, Espinosa R 3rd, Brannan CI, Gilbert DJ, et al. Identification of mammalian noggin and its expression in the adult nervous system. *J Neurosci*. 1995 Sep;15(9):6077-84.

Vallier L, Alexander M, Pedersen RA. Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *J Cell Sci*. 2005 Oct 1;118(Pt 19):4495-509.

Van Battum EY, Brignani S, Pasterkamp RJ. Axon guidance proteins in neurological disorders. *Lancet Neurol*. 2015 May;14(5):532-46.

Vásquez GE, Medinas DB, Urra H, Hetz C. Emerging roles of endoplasmic reticulum proteostasis in brain development. *Cells Dev*. 2022 Apr 25;170:203781.

Vera E, Studer L. When rejuvenation is a problem: challenges of modeling late-onset neurodegenerative disease. *Development*. 2015 Sep 15;142(18):3085-9.

Victor AK, Donaldson M, Johnson D, Miller W, Reiter LT. Molecular Changes in Prader-Willi Syndrome Neurons Reveals Clues About Increased Autism Susceptibility. *Front Mol Neurosci*. 2021 Oct 29;14:747855.

Vosberg DE, Zhang Y, Menegaux A, Chalupa A, Manitt C, Zehntner S, Eng C, DeDuck K, Allard D, Durand F, Dagher A, Benkelfat C, Srour M, Joobar R, Lepore F, Rouleau G, Théoret H, Bedell BJ, Flores C, Leyton M. Mesocorticolimbic Connectivity and Volumetric Alterations in *DCC* Mutation Carriers. *J Neurosci*. 2018 May 16;38(20):4655-4665.

## W

Wakade CG, Mehta SH, Maeda M, Webb RC, Chiu FC. Axonal fasciculation and the role of polysialic acid-neural cell adhesion molecule in rat cortical neurons. *J Neurosci Res*. 2013 Nov;91(11):1408-18.

Wakui T, Matsumoto T, Matsubara K, Kawasaki T, Yamaguchi H, Akutsu H. Method for evaluation of human induced pluripotent stem cell quality using image analysis based on the biological morphology of cells. *J Med Imaging (Bellingham)*. 2017 Oct;4(4):044003.

Wang B, Stanford KR, Kundu M. ER-to-Golgi Trafficking and Its Implication in Neurological Diseases. *Cells*. 2020 Feb 11;9(2):408.

Wang J, Fröhlich H, Torres FB, Silva RL, Poschet G, Agarwal A, Rappold GA. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress contribute to cognitive and motor impairment in FOXP1 syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022 Feb 22;119(8):e2112852119.

Wang L, Liu H, Zhang X, Song E, Wang Y, Xu T, Li Z. WFS1 functions in ER export of vesicular cargo proteins in pancreatic  $\beta$ -cells. *Nat Commun*. 2021 Nov 30;12(1):6996.

Wang L, Marquardt T. What axons tell each other: axon-axon signaling in nerve and circuit assembly. *Curr Opin Neurobiol*. 2013 Dec;23(6):974-82.

Wang M, Kaufman RJ. Protein misfolding in the endoplasmic reticulum as a conduit to human

disease. *Nature*. 2016 Jan 21;529(7586):326-35.

Wang M, Roussos P, McKenzie A, Zhou X, Kajiwara Y, Brennand KJ, De Luca GC, Crary JF, Casaccia P, Buxbaum JD, Ehrlich M, Gandy S, Goate A, Katsel P, Schadt E, Haroutunian V, Zhang B. Integrative network analysis of nineteen brain regions identifies molecular signatures and networks underlying selective regional vulnerability to Alzheimer's disease. *Genome Med*. 2016 Nov 1;8(1):104.

Wang S, Bates J, Li X, Schanz S, Chandler-Militello D, Levine C, Maherali N, Studer L, Hochedlinger K, Windrem M, Goldman SA. Human iPSC-derived oligodendrocyte progenitor cells can myelinate and rescue a mouse model of congenital hypomyelination. *Cell Stem Cell*. 2013 Feb 7;12(2):252-64.

Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, Ebina W, Mandal PK, Smith ZD, Meissner A, Daley GQ, Brack AS, Collins JJ, Cowan C, Schlaeger TM, Rossi DJ. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*. 2010 Nov 5;7(5):618-30.

Waters BJ, Blum B. Axon Guidance Molecules in the Islets of Langerhans. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022 Apr 14;13:869780.

Weick JP, Held DL, Bonadurer GF 3rd, Doers ME, Liu Y, Maguire C, Clark A, Knackert JA, Molinarolo K, Musser M, Yao L, Yin Y, Lu J, Zhang X, Zhang SC, Bhattacharyya A. Deficits in human trisomy 21 iPSCs and neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jun 11;110(24):9962-7.

Weiner JA, Koo SJ, Nicolas S, Fraboulet S, Pfaff SL, Pourquié O, Sanes JR. Axon fasciculation defects and retinal dysplasias in mice lacking the immunoglobulin superfamily adhesion molecule BEN/ALCAM/SC1. *Mol Cell Neurosci*. 2004 Sep;27(1):59-69.

Weissman L, de Souza-Pinto NC, Stevnsner T, Bohr VA. DNA repair, mitochondria, and neurodegeneration. *Neuroscience*. 2007 Apr 14;145(4):1318-29.

Whitlock KE, Westerfield M. A transient population of neurons pioneers the olfactory pathway in the zebrafish. *J Neurosci*. 1998 Nov 1;18(21):8919-27.

Willadsen SM. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*. 1986 Mar 6-12;320(6057):63-5.

Williams LA, Davis-Dusenbery BN, Eggan KC. SnapShot: directed differentiation of pluripotent stem cells. *Cell*. 2012 May 25;149(5):1174-1174.e1.

Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 1997 Feb 27;385(6619):810-3.

Wit JM, Donckerwolcke RA, Schulpden TW, Deutman AF. Documented vasopressin deficiency in a child with Wolfram syndrome. *J Pediatr*. 1986 Sep;109(3):493-4.

Wobus AM, Boheler KR. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev*. 2005 Apr;85(2):635-78.

Wolfram, D.J., and Wagener, H.P. (1938). Diabetes mellitus and simple optic atrophy among siblings: report of four cases. *Mayo Clin Proc* 13, 715–718.

Wolman MA, Regnery AM, Becker T, Becker CG, Halloran MC. Semaphorin3D regulates axon axon interactions by modulating levels of L1 cell adhesion molecule. *J Neurosci*. 2007 Sep 5;27(36):9653-

63.

Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hämäläinen R, Cowling R, Wang W, Liu P, Gertsenstein M, Kaji K, Sung HK, Nagy A. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2009 Apr 9;458(7239):766-70.

## X

Xie N, Gong H, Suhl JA, Chopra P, Wang T, Warren ST. Reactivation of FMR1 by CRISPR/Cas9-Mediated Deletion of the Expanded CGG-Repeat of the Fragile X Chromosome. *PLoS One*. 2016 Oct 21;11(10):e0165499.

Xu Q, Guo L, Moore H, Waclaw RR, Campbell K, Anderson SA. Sonic hedgehog signaling confers ventral telencephalic progenitors with distinct cortical interneuron fates. *Neuron*. 2010 Feb 11;65(3):328-40.

Xu X, Tay Y, Sim B, Yoon SI, Huang Y, Ooi J, Utami KH, Ziaei A, Ng B, Radulescu C, Low D, Ng AYJ, Loh M, Venkatesh B, Ginhoux F, Augustine GJ, Pouladi MA. Reversal of Phenotypic Abnormalities by CRISPR/Cas9-Mediated Gene Correction in Huntington Disease Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*. 2017 Mar 14;8(3):619-633.

## Y

Yamada T, Ishihara H, Tamura A, Takahashi R, Yamaguchi S, Takei D, Tokita A, Satake C, Tashiro F, Katagiri H, Aburatani H, Miyazaki J, Oka Y. WFS1-deficiency increases endoplasmic reticulum stress, impairs cell cycle progression and triggers the apoptotic pathway specifically in pancreatic beta-cells. *Hum Mol Genet*. 2006 May 15;15(10):1600-9.

Yamamoto H, Hofmann S, Hamasaki DI, Yamamoto H, Kreczmanski P, Schmitz C, Parel JM, Schmidt-Kastner R. Wolfram syndrome 1 (WFS1) protein expression in retinal ganglion cells and optic nerve glia of the cynomolgus monkey. *Exp Eye Res*. 2006 Nov;83(5):1303-6.

Yamanaka S. Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy-Promise and Challenges. *Cell Stem Cell*. 2020 Oct 1;27(4):523-531.

Yang X, Smith SL, Tian XC, Lewin HA, Renard JP, Wakayama T. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nat Genet*. 2007 Mar;39(3):295-302.

Yapa NMB, Lisnyak V, Reljic B, Ryan MT. Mitochondrial dynamics in health and disease. *FEBS Lett*. 2021 Apr;595(8):1184-1204.

Ye L, Chang JC, Lin C, Qi Z, Yu J, Kan YW. Generation of induced pluripotent stem cells using site-specific integration with phage integrase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Nov 9;107(45):19467-72.

Yin J, VanDongen AM. Enhanced Neuronal Activity and Asynchronous Calcium Transients Revealed in a 3D Organoid Model of Alzheimer's Disease. *ACS Biomater Sci Eng*. 2021 Jan 11;7(1):254-264.

Yogev S, Shen K. Cellular and molecular mechanisms of synaptic specificity. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2014;30:417-37.

Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell*. 2001 Dec

28;107(7):881-91.

Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*. 2009 May 8;324(5928):797-801.

Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007 Dec 21;318(5858):1917-20.

Yu TW, Bargmann CI. Dynamic regulation of axon guidance. *Nat Neurosci*. 2001 Nov;4 Suppl:1169-76.

Yu Y, Liu DY, Chen XS, Zhu L, Wan LH. MANF: A Novel Endoplasmic Reticulum Stress Response Protein-The Role in Neurological and Metabolic Disorders. *Oxid Med Cell Longev*. 2021 Oct 28;2021:6467679.

Yuca SA, Rendtorff ND, Boulahbel H, Lodahl M, Tranebjærg L, Cesur Y, Dogan M, Yilmaz C, Akgun C, Acikgoz M. Rapidly progressive renal disease as part of Wolfram syndrome in a large inbred Turkish family due to a novel WFS1 mutation (p.Leu511Pro). *Eur J Med Genet*. 2012 Jan;55(1):37-42.

## Z

Zalloua PA, Azar ST, Delépine M, Makhoul NJ, Blanc H, Sanyoura M, Lavergne A, Stankov K, Lemainque A, Baz P, Julier C. WFS1 mutations are frequent monogenic causes of juvenile-onset diabetes mellitus in Lebanon. *Hum Mol Genet*. 2008 Dec 15;17(24):4012-21.

Zatyka M, Da Silva Xavier G, Bellomo EA, Leadbeater W, Astuti D, Smith J, Michelangeli F, Rutter GA, Barrett TG. Sarco(endo)plasmic reticulum ATPase is a molecular partner of Wolfram syndrome 1 protein, which negatively regulates its expression. *Hum Mol Genet*. 2015 Feb 1;24(3):814-27.

Zatyka M, Ricketts C, da Silva Xavier G, Minton J, Fenton S, Hofmann-Thiel S, Rutter GA, Barrett TG. Sodium-potassium ATPase 1 subunit is a molecular partner of Wolframin, an endoplasmic reticulum protein involved in ER stress. *Hum Mol Genet*. 2008 Jan 15;17(2):190-200.

Zatz M, Starling A. Calpains and disease. *N Engl J Med*. 2005 Jun 9;352(23):2413-23.

Zeng H, Guo M, Martins-Taylor K, Wang X, Zhang Z, Park JW, Zhan S, Kronenberg MS, Lichtler A, Liu HX, Chen FP, Yue L, Li XJ, Xu RH. Specification of region-specific neurons including forebrain glutamatergic neurons from human induced pluripotent stem cells. *PLoS One*. 2010 Jul 29;5(7):e11853.

Zhang J, Hirst AJ, Duan F, Qiu H, Huang R, Ji Y, Bai L, Zhang F, Robinson D, Jones M, Li L, Wang P, Jiang P, Andrews PW, Barbaric I, Na J. Anti-apoptotic Mutations Desensitize Human Pluripotent Stem Cells to Mitotic Stress and Enable Aneuploid Cell Survival. *Stem Cell Reports*. 2019 Mar 5;12(3):557-571.

Zhang L, Qi Z, Li J, Li M, Du X, Wang S, Zhou G, Xu B, Liu W, Xi S, Xu Z, Deng Y. Roles and Mechanisms of Axon-Guidance Molecules in Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol*. 2021 Jul;58(7):3290-3307.

Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, Brüstle O, Thomson JA. In vitro differentiation of transplantable

neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2001 Dec;19(12):1129-33.

Zhao Y, Yin X, Qin H, Zhu F, Liu H, Yang W, Zhang Q, Xiang C, Hou P, Song Z, Liu Y, Yong J, Zhang P, Cai J, Liu M, Li H, Li Y, Qu X, Cui K, Zhang W, Xiang T, Wu Y, Zhao Y, Liu C, Yu C, Yuan K, Lou J, Ding M, Deng H. Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation. *Cell Stem Cell.* 2008 Nov 6;3(5):475-9.

Zhou J, Liu CY, Back SH, Clark RL, Peisach D, Xu Z, Kaufman RJ. The crystal structure of human IRE1 luminal domain reveals a conserved dimerization interface required for activation of the unfolded protein response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Sep 26;103(39):14343-8.

Zhou W, Freed CR. Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells.* 2009 Nov;27(11):2667-74.

Zmyslowska A, Ciborowski M, Borowiec M, Fendler W, Pietrowska K, Parfieniuk E, Antosik K, Pyziak A, Waszczykowska A, Kretowski A, Mlynarski W. Serum Metabolic Fingerprinting Identified Putatively Annotated Sphinganine Isomer as a Biomarker of Wolfram Syndrome. *J Proteome Res.* 2017 Nov 3;16(11):4000-4008.

Zmyslowska A, Fendler W, Niwald A, Ludwikowska-Pawlowska M, Borowiec M, Antosik K, Szadkowska A, Mlynarski W. Retinal thinning as a marker of disease progression in patients with Wolfram syndrome. *Diabetes Care.* 2015 Mar;38(3):e36-7.

Zmyslowska A, Fendler W, Waszczykowska A, Niwald A, Borowiec M, Jurowski P, Mlynarski W. Retinal thickness as a marker of disease progression in longitudinal observation of patients with Wolfram syndrome. *Acta Diabetol.* 2017 Nov;54(11):1019-1024.

Zmyslowska A, Kuljanin M, Malachowska B, Stanczak M, Michalek D, Wlodarczyk A, Grot D, Taha J, Pawlik B, Lebidzińska-Arciszewska M, Nieznanska H, Wieckowski MR, Rieske P, Mancias JD, Borowiec M, Mlynarski W, Fendler W. Multiomic analysis on human cell model of wolfram syndrome reveals changes in mitochondrial morphology and function. *Cell Commun Signal.* 2021 Nov 20;19(1):116.