



**HAL**  
open science

# Modélisation du Syndrome d'Alström à partir de cellules souches pluripotentes humaines pour l'identification de cibles moléculaires d'intérêt thérapeutique

Elie Frank

## ► To cite this version:

Elie Frank. Modélisation du Syndrome d'Alström à partir de cellules souches pluripotentes humaines pour l'identification de cibles moléculaires d'intérêt thérapeutique. Embryologie et organogenèse. Université Paris-Saclay, 2024. Français. NNT : 2024UPASQ041 . tel-04844022

**HAL Id: tel-04844022**

**<https://theses.hal.science/tel-04844022v1>**

Submitted on 17 Dec 2024

**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 du syndrome d'Alström à partir de cellules souches pluripotentes humaines pour l'identification de cibles moléculaires d'intérêt thérapeutique

*Alström Syndrome modeling based on human pluripotent stem cells to identify molecular targets of therapeutic interest*

## Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay

École doctorale n°569, Innovation Thérapeutique, du Fondamental à l'Appliqué (ITFA)  
Spécialité de doctorat : Immunologie  
Graduate School : Santé & Médicaments. Référent : Université d'Evry Val d'Essonne

Thèse préparée à l'**Institut des Cellules Souches pour le Traitement et l'Etude des Maladies Monogéniques (I-Stem, Université Paris-Saclay, INSERM)**,  
sous la direction de **Karim BEN M'BAREK**, Chargé de Recherche  
et la co-direction de **Christelle MONVILLE**, Professeure des Universités

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 21 novembre 2024, par

**Elie FRANK**

## Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

|   |                             |
|---|-----------------------------|
| <b>Dr. Muriel PERRON</b><br>Institut NeuroPSI         | Présidente du jury          |
| <b>Pr. Afsaneh GAILLARD</b><br>Université de Poitiers | Rapportrice et examinatrice |
| <b>Dr Delphine BOHL</b><br>Institut du Cerveau        | Rapportrice et examinatrice |
| <b>Dr. Jean-Michel ROZET</b><br>Institut Imagine      | Examineur                   |
| <b>Dr. Frank Yates</b><br>Sup'Biotech                 | Examineur                   |

**Titre :** Modélisation du Syndrome d'Alström à partir de cellules souches pluripotentes humaines pour l'identification de cibles moléculaires d'intérêt thérapeutique.

**Mots clés :** Syndrome d'Alström, ciliopathie, CSpH, organoïdes neuro-rétiniens, CRISPR/Cas9, modélisation pathologique

**Résumé :** Le syndrome d'Alström (SA) est une maladie monogénique récessive multi-systémique, caractérisée notamment par une perte de l'audition et de la vue, une obésité, un diabète de type II, une cardiomyopathie et une insuffisance hépatique et rénale progressive. Les symptômes affectant la vision se développent dès les premières semaines après la naissance et mènent progressivement à une perte totale de la vue. À l'heure actuelle, aucun traitement ne permet de soigner cette maladie et seules des solutions permettant de réduire les effets des symptômes peuvent être proposées.

L'objet de la thèse est de mettre au point un modèle cellulaire du SA dans le but de comprendre les mécanismes moléculaires entraînant la maladie et d'identifier des cibles thérapeutiques.

Nous avons obtenu différents clones présentant des mutations pathologiques ou *de novo* à l'aide de systèmes d'édition génomique associés à CRISPR/Cas9. Nous avons caractérisé ces clones modèles en cherchant à identifier des marqueurs phénotypiques particuliers au sein des CSpH. Les mutations engendrées ne provoquent pas de changement des propriétés de ces cellules.

Dans un second temps, toujours dans le but d'identifier un phénotype pathologique, nous avons différencié les lignées de CSpH modèles en cellules de l'EPR.

Là encore, nous n'avons pas identifié de marqueur phénotypique spécifique. Enfin, nous avons différencié les lignées de CSpH modèles en organoïdes neuro-rétiniens afin d'étudier le développement des cellules rétiniennes au sein de ces structures avec une attention particulière apportée aux photorécepteurs. Nous avons ainsi pu constater une absence ou une réduction d'expression des opsines caractéristiques des cônes et des bâtonnets dans les organoïdes issus de CSpH mutées dans *ALMS1*. De plus, ces organoïdes présentent une mortalité cellulaire accrue par rapport aux organoïdes issus des lignées de CSpH saines. Ces éléments laissent penser que les photorécepteurs dégénèrent durant leur différenciation au sein des organoïdes. Les mécanismes par lesquels les mutations dans *ALMS1* entraînent cette dégénérescence ne sont pas élucidés à l'heure actuelle.

Les modèles cellulaires du SA présentés dans cette thèse reproduisent donc un phénotype pathologique et seront des outils précieux pour la compréhension des mécanismes responsables des symptômes visuels de la maladie et pavent la voie à des stratégies de criblage visant à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

**Title :** Alström Syndrome modeling based on human pluripotent stem cells to identify molecular targets of therapeutic interest.

**Keywords :** Alström Syndrome, ciliopathy, hPSC, neuroretinal organoids, CRISPR/Cas9, disease modeling

**Abstract :** Alström syndrome (AS) is a monogenic recessive multi-systemic disease characterized by hearing and vision loss, obesity, type II diabetes, cardiomyopathy and progressive liver and kidney failure. Symptoms affecting vision develop in the first few weeks after birth and gradually lead to total loss of sight. At present, there is no cure for this disease, and only solutions that reduce the effects of the symptoms can be proposed.

The aim of this thesis is to develop a cellular model of AS with a view to understanding the molecular mechanisms driving the disease and identifying therapeutic targets.

We obtained different clones with pathological or de novo mutations using genome-editing systems associated with CRISPR/Cas9. We characterized these model clones by seeking to identify specific phenotypic markers within the hiPSCs. The mutations generated did not change the properties of these cells.

In a second step, still with the aim of identifying a pathological phenotype, we differentiated the model iPSC lines into RPE cells.

Again, no specific phenotypic marker was identified. Finally, we differentiated our model hiPSC lines into neuroretinal organoids to study retinal cells development within these structures with a particular focus on photoreceptors. We were able to observe the absence or reduced expression of opsins characteristic of cones and rods in organoids derived from *ALMS1*-mutant hiPSCs. In addition, these organoids showed increased cell death compared with organoids derived from healthy hiPSC lines. This suggests that photoreceptors degenerate during differentiation within organoids. The mechanisms by which mutations in *ALMS1* lead to this degeneration remain unclear.

The cellular models of AS presented in this thesis therefore reproduce a pathological phenotype and will be invaluable tools for understanding the mechanisms responsible for the visual symptoms of the disease and pave the way for screening strategies aimed at identifying new therapeutic targets.

## REMERCIEMENTS

---

Je souhaite tout d'abord exprimer ma gratitude aux membres de mon jury pour avoir consacré du temps à lire, commenter et discuter les travaux présentés dans ce manuscrit. Mes remerciements vont particulièrement au Pr. Afsaneh GAILLARD et au Dr. Delphine BOHL, qui ont accepté d'être les rapportrices de cette thèse. Je remercie également le Dr. Frank YATES et le Dr. Muriel PERRON pour leur participation en tant qu'examineurs. Enfin, je tiens à remercier chaleureusement le Dr. Jean-Michel ROZET, qui, en plus de son rôle d'examineur, a fait partie, avec le Pr. Elisabeth PETIT-TEIXEIRA, de mon comité de suivi annuel. Leurs conseils avisés m'ont permis de rester sur la bonne voie tout au long de cette aventure.

Ensuite, je souhaite remercier sincèrement et chaleureusement le Pr. Christelle MONVILLE et le Dr. Karim BEN M'BAREK pour leur encadrement tout au long de ma thèse, et même avant. Je suis fier d'avoir vécu cette aventure à vos côtés et d'avoir pu profiter de vos enseignements qui vont bien au-delà de la connaissance scientifique. Votre duo de directeurs de thèse a été une source d'échanges constructifs et stimulants qui m'ont permis de mûrir en tant que chercheur. Merci pour votre expertise, votre disponibilité et votre soutien constant. Je tâcherai à présent de faire vivre vos enseignements tout au long de mon parcours futur.

Merci au Dr. Marc PESCHANSKI, au Dr. Cécile MARTINAT et à Yann GUIVARCH pour leur accueil au sein d'I-Stem, ma deuxième (presque première) maison depuis 5 ans.

Je tiens également à saluer le Pr. José-Alain SAHEL et le Dr. Olivier GOUREAU pour m'avoir accueilli en stage à l'Institut de la Vision. Même si cet accueil remonte à près de 8 ans, il a semé les premières graines d'un parcours qui se poursuit encore aujourd'hui.

Un immense merci à mes parents pour leur amour, leur soutien sans faille et leurs encouragements constants tout au long de cette aventure. Je ne peux vous remercier assez

pour tous les sacrifices que vous avez faits afin que je puisse mener à bien cette thèse. Merci pour la confiance que vous m'avez témoignée et qui, en alimentant la mienne, m'a permis d'arriver où j'en suis aujourd'hui. Merci à mes sœurs Tsivia, Judith et Yaël qui même de loin, m'ont toujours guidé, soutenu et accueilli à chaque étape de mon chemin. Chacune d'entre vous est un modèle auquel j'essaie de ressembler un peu plus chaque jour. J'envoie également énormément d'amour à mes neveux et nièces ainsi qu'à mes beaux-frères. J'ai hâte de tous vous voir pour que vous puissiez m'appeler Dr. Tilou. Un merci tout particulier à mon frère Daniel, à Audélia et à Yuval que j'ai la chance de voir évoluer à mes côtés au quotidien. Le chemin que j'ai parcouru a été plus facile grâce à votre présence tout près de moi. J'ai aussi une pensée pour mes grands-parents, Huguette, Willy, Esther et Maurice. Vous vivez toujours à travers les valeurs que vous m'avez transmises et dont j'espère me montrer digne. Je garde précieusement en moi les moments passés avec ceux que j'ai eu la chance de connaître et je suis persuadé que vous auriez été fiers de me voir avancer dans la vie en traçant ma propre voie.

En plus de ma famille, je suis entouré d'amis exceptionnels que je ne peux remercier assez pour leur accompagnement. Merci Ella d'être mon meilleur binôme dans toutes les expos, les restos et les matchs de water-polo et d'être toujours disponible pour m'écouter. Merci Carla pour ta gaieté constante et pour ton sourire qui rayonne tout autour de toi. Depuis 10 ans, notre amitié à tous les trois me tient chaud partout où je vais, depuis le Touquet jusqu'au cœur du plus long des hivers montréalais. Merci de rigoler à mes pires blagues, vous êtes mes Sweetos 2.0 forever ❤️

Merci aux sisters & co Pierre, Axelle, Raphaël, Juliette, Rébecca, Jérémie, Rachel et Max pour les moments passés ensemble à Paris, Cannes, Presles et pour les nombreuses célébrations à venir.

Merci Mado pour ton énergie débordante qui me pousse à me dépasser, des séances de dynamo jusqu'au Cross du Figaro.

Merci Judy, Rebecca et Dan pour la stabilité de notre amitié qui vous pousse à goûter mes expériences culinaires les plus hasardeuses. Bisous aux goyas et à tous mes anciens éclais.

Merci Lara et Dan pour nos rendez-vous hebdomadaires et de m'avoir si souvent écouté raconter mes histoires du labo et du métro.

Merci Sasha, Mickaël et Ellie ainsi que Frédérique et Vincent de m'accueillir si généreusement partout où vous le pouvez.

Merci Dany pour ta présence depuis si longtemps et de ne pas laisser la distance géographique nous éloigner.

Merci Louise pour ta fidélité à nos rendez-vous du RER de 8h10, pour ta joie quotidienne et pour toutes les séances d'escalade gratuites. J'ai adoré travailler près de toi, j'ai appris plein de choses à tes côtés et même si je dois tout vérifier sur Wikipédia, j'ai une confiance absolue en toi et en tes qualités. Je reste impressionné par ta capacité à collectionner tout ce que tu trouves (🐛) et je te remercie aussi de me laisser gagner au jeu des villes.

Merci Camille pour ton rire qui traverse la vitre du secteur, pour nos duos mémorables sur Angels et pour avoir noté tous les moments marquants de notre voyage à Seattle (🗺️). Un immense merci est plus que mérité pour ton dévouement à faire avancer mon projet. Je sais que mes résultats n'auraient pas été si FORMIDABLES sans ta capacité à rendre faciles des expériences qui sans toi seraient restées totalement obscures pour moi.

Merci Natacha pour tes goûts musicaux qui me font me sentir moins seul dans les années 70-80. Merci pour ta présence bienveillante au labo, pour ton altruisme naturel et surtout merci de m'avoir montré que je suis capable de maintenir une plante en vie plus de 3 semaines.

Merci à tous les membres de l'équipe Rétino pour leur accueil, leurs conseils et leur soutien. Merci Walter, Alexandra P, Hélène, Abdallah et Elise.

Merci Tatiana, Céline, Laurine et Thifaine pour les pauses JetPunk, les sorties à Marquesse Avenue et les spectacles Canopée. J'ai une pensée spéciale pour la team ATVG des séminaires internes qui a vécu la faim à mes côtés.

Merci Manon pour ton oreille attentive et pour ta motivation à me faire courir par tous les temps. Merci aussi pour les kinder réconfortants cachés sur mon bureau.

Merci Lucille d'avoir été ma camarade de thèse du début à la fin. J'en profite pour saluer tous mes confrères et consœurs du PhD meeting : Caroline, Hugo, Azania, Noella, Johanna et Minh mais également Marie, Sabrina, Axel, Antoine, Julie, Camille J, Margot et Céline B.

Merci Quentin et Morgan de m'avoir laissé le lit simple à chaque séminaire interne, j'espère que l'ambiance de la chambre restera aussi bonne lors des prochains séminaires.

Merci à l'ensemble des membres d'I-Stem, qu'ils fassent partie de l'administration, des plateformes technologiques ou des équipes de recherche. Merci aux chefs d'équipe pour leurs commentaires et conseils constructifs à chaque lab meeting : Xavier, Alexandra B, Nathalie, Laëtitia et Christine. Merci Karine, Lina et Hamel, les professionnelles du caryotype pour les contrôles qualité de mes lignées. Merci Jérôme pour ton expertise en microscopie et d'avoir accepté de relever chaque nouveau défi que représentaient mes marquages. Merci Michel d'avoir bien voulu traduire ton langage CRISPR pour que je puisse le comprendre. Puis, de façon non exhaustive et dans le désordre, merci à Stéphanie, Arnaud, Antoine, Houda, Sandrine S, Olivier, Adeline, Noémie, Sandra, Aubin, Sandrine B, Amandine, Justine, Lise, Claire, Laure, Céline L, Pascal, Emilie, Mathieu, Océane, Benjamin, Christelle, Lucile, Stephen, Manoubia, Annabelle, Jennifer, Marion, Sophie et également aux anciens dont j'ai croisé la route : Jacquie, Léa, Pauline, Florine, Judith, Alexandre, Eren, Hassan, Julien, Tom, Yohann, Arthur, Gabriel et Oxane.

Merci à tous ceux qui m'entourent et qui ont participé de près ou de loin à rendre cette aventure plus agréable par leur présence, leur attention et leur amitié.

Enfin, merci à toi, lecteur de ce manuscrit, pour l'attention que tu portes à ce travail.

## TABLE DES MATIERES

---

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Remerciements</b> .....                                 | <b>4</b>  |
| <b>Table des matières</b> .....                            | <b>8</b>  |
| <b>Liste des Figures</b> .....                             | <b>10</b> |
| <b>Liste des Tables</b> .....                              | <b>11</b> |
| <b>Liste des Abréviations</b> .....                        | <b>12</b> |
| <b>Avant-Propos</b> .....                                  | <b>16</b> |
| <b>1 Introduction</b> .....                                | <b>18</b> |
| <b>1.1 L'œil humain</b> .....                              | <b>18</b> |
| 1.1.1 Rôle, structure et morphologie.....                  | 18        |
| 1.1.2 La rétine .....                                      | 19        |
| 1.1.2.1 La neuro-rétine .....                              | 19        |
| 1.1.2.2 L'épithélium pigmentaire de la rétine.....         | 24        |
| <b>1.2 Le syndrome d'Alström</b> .....                     | <b>29</b> |
| 1.2.1 Description .....                                    | 29        |
| 1.2.2 Prise en charge des patients.....                    | 39        |
| 1.2.3 Génétique du SA .....                                | 41        |
| 1.2.3.1 Le gène <i>ALMS1</i> .....                         | 41        |
| 1.2.3.2 Mutations pathologiques .....                      | 42        |
| 1.2.3.3 Lien génotype-phénotype.....                       | 44        |
| 1.2.3.4 Les variants d' <i>ALMS1</i> .....                 | 45        |
| 1.2.3.5 Fonctions de la protéine <i>ALMS1</i> .....        | 46        |
| 1.2.4 Les ciliopathies.....                                | 47        |
| 1.2.4.1 Le syndrome d'Alström, une ciliopathie .....       | 47        |
| 1.2.4.2 Description du cil primaire .....                  | 49        |
| 1.2.4.3 Ciliogenèse et désassemblage du cil .....          | 51        |
| 1.2.4.4 Rôles du cil primaire .....                        | 58        |
| <b>1.3 Les modèles d'étude du syndrome d'Alström</b> ..... | <b>59</b> |
| 1.3.1 Les modèles animaux du SA .....                      | 59        |
| 1.3.1.1 Les modèles murins du SA .....                     | 59        |

|            |   |            |
|------------|---|------------|
| 1.3.1.2    | Les modèles félins du SA.....   | 65         |
| 1.3.1.3    | Le poisson-zèbre modèle du SA.....  | 66         |
| 1.3.1.4    | La drosophile modèle du SA.....   | 68         |
| 1.3.2      | Les cellules permettant l'étude du SA.....  | 69         |
| 1.3.2.1    | Les cellules non-humaines .....   | 69         |
| 1.3.2.2    | Les cellules humaines .....   | 71         |
| 1.3.2.3    | Les modèles basés sur les CSPh.....   | 74         |
| <b>1.4</b> | <b>Différenciation de CSPh en cellules de la rétine.....</b>  | <b>79</b>  |
| 1.4.1      | Éléments du développement embryonnaire de l'œil humain .....  | 80         |
| 1.4.2      | Les protocoles de différenciation en cellules de l'EPR.....   | 85         |
| 1.4.3      | Les protocoles de différenciation en cellules de la neuro-rétine .....  | 91         |
| 1.4.3.1    | Les protocoles en 2 dimensions.....   | 92         |
| 1.4.3.2    | Les protocoles en 3 dimensions.....   | 93         |
| <b>2</b>   | <b>Objectifs .....</b>  | <b>98</b>  |
| <b>3</b>   | <b>Résultats .....</b>  | <b>99</b>  |
| <b>3.1</b> | <b>Etude 1 : Développement d'une méthode semi-automatisée pour l'isolation de clones issus d'expériences d'édition génomique de CSPh par CRISPR/Cas9 et génération de nouvelles lignées cellulaires modélisant le Syndrome d'Alström.....</b> | <b>99</b>  |
| 3.1.1      | Introduction .....  | 99         |
| 3.1.2      | Résultats (publication scientifique) .....  | 102        |
| 3.1.3      | Discussion.....   | 117        |
| <b>3.2</b> | <b>Etude 2 : Caractérisation des cellules réiniennes modélisant le Syndrome d'Alström à l'aide de modèles cellulaires issus de CSPh .</b>   | <b>121</b> |
| 3.2.1      | Introduction .....  | 121        |
| 3.2.2      | Résultats .....   | 123        |
| 3.2.2.1    | Reproduction de mutations pathologiques au sein de CSPih.....   | 123        |
| 3.2.2.2    | Effet des mutations sur l'expression d'ALMS1 et sur les propriétés des CSPih .....  | 124        |
| 3.2.2.3    | Expression des variants d'ALMS1.....  | 127        |
| 3.2.2.4    | L'induction de mutations pathologiques n'altère pas la différenciation des CSPih en cellules de l'EPR.....  | 128        |

|          |  |            |
|----------|--|------------|
| 3.2.2.5  | Différenciation des CSPih en organoïdes neuro-rétiniens et analyse de la production de photorécepteurs ..... | 133        |
| 3.2.3    | Discussion .....   | 137        |
| 3.2.4    | Matériel et méthodes .....   | 147        |
| 3.2.5    | Annexes .....  | 156        |
| <b>4</b> | <b>Discussion générale.....</b>  | <b>160</b> |
| <b>5</b> | <b>Conclusion générale.....</b>  | <b>171</b> |
|          | <b>Bibliographie .....</b>   | <b>172</b> |
|          | <b>Annexes .....</b>   | <b>210</b> |

## **LISTE DES FIGURES**

---

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Figure 1 : Anatomie de l'œil humain.....</b>                                      | <b>18</b> |
| <b>Figure 2 : Organisation de la rétine humaine. ....</b>                            | <b>20</b> |
| <b>Figure 3 : Structure des photorécepteurs. ....</b>                                | <b>22</b> |
| <b>Figure 4 : Schéma récapitulatif du cycle visuel. ....</b>                         | <b>26</b> |
| <b>Figure 5 : Récapitulatif des symptômes du SA et âge d'apparition..</b><br>.....   | <b>39</b> |
| <b>Figure 6 : Structure du gène <i>ALMS1</i>.....</b>                                | <b>41</b> |
| <b>Figure 7 : Structure de la protéine <i>ALMS1</i>.....</b>                         | <b>42</b> |
| <b>Figure 8 : Répartition de mutations pathologiques au sein d'<i>ALMS1</i>.....</b> | <b>44</b> |
| <b>Figure 9 : Comparaison des symptômes de plusieurs ciliopathies.</b><br>.....      | <b>48</b> |
| <b>Figure 10 : Structure du cil primaire.....</b>                                    | <b>50</b> |
| <b>Figure 11 : Cycle cellulaire et ciliogenèse. ....</b>                             | <b>52</b> |
| <b>Figure 12 : Déroulement de la ciliogenèse.....</b>                                | <b>54</b> |
| <b>Figure 13 : Composition des complexes IFT.....</b>                                | <b>55</b> |
| <b>Figure 14 : Schéma de la zone de transition.....</b>                              | <b>56</b> |
| <b>Figure 15 : Localisation de la protéine <i>ALMS1</i> au centrosome. ...</b>       | <b>57</b> |
| <b>Figure 16 : Hiérarchie des cellules souches.....</b>                              | <b>75</b> |
| <b>Figure 17 : Différentes méthode d'édition génomique.....</b>                      | <b>78</b> |
| <b>Figure 18 : Première étape de l'embryogenèse de l'œil : formation</b>             |           |

|  |           |
|--|-----------|
| du tube neural.....  | 81        |
| <b>Figure 19 : Deuxième étape de l'embryogenèse de l'œil : formation de la vésicule optique.....</b>                     | <b>82</b> |
| <b>Figure 20 : Troisième étape de l'embryogenèse de l'œil: développement des structures oculaires.....</b>               | <b>83</b> |
| <b>Figure 21 : Embryogenèse de la rétine.....</b>  | <b>85</b> |
| <b>Figure 22 : Comparaison de plusieurs protocoles dirigés pour la différenciation de CSPh en cellules de l'EPR.....</b> | <b>88</b> |
| <b>Figure 23 : Gènes impliqués dans le développement des photorécepteurs et cellules de l'EPR.....</b>                   | <b>92</b> |
| <b>Figure 24 : Comparaison de deux protocoles de différenciation de CSPh en organoïdes de neuro-rétine.....</b>          | <b>95</b> |

#### Etude 2 :

|   |            |
|---|------------|
| <b>Figure 1 : Caractérisation de mutations par CRISPR/Cas9 au sein du gène <i>ALMS1</i> de CSPih et caractérisation des clones obtenus.</b> | <b>125</b> |
| <b>Figure 2 : Expression de différents variant d'<i>ALMS1</i> au sein des CSPih.</b>  | <b>128</b> |
| <b>Figure 3 : Différenciation des CSPih en cellules de l'EPR et caractérisation des EPR obtenus.</b>  | <b>130</b> |
| <b>Figure 4 : Analyse morphométrique des cellules de l'EPR obtenues à partir des CSPih modèles.</b>   | <b>132</b> |
| <b>Figure 5 : Différenciation des CSPih modèles en organoïdes neuro-rétiniens.</b>  | <b>135</b> |
| <b>Figure 6 : Caractérisation des organoïdes obtenus à partir des CSPih modèles.</b>  | <b>134</b> |
| <b>Figure 7 : Analyse de la mortalité au sein des organoïdes obtenus.</b>   | <b>137</b> |

## **LISTE DES TABLES**

---

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Table 1 : Critères pour le diagnostic du syndrome d'Alström.....</b>   | <b>31</b> |
| <b>Tableau 2 : Tableau récapitulatif des protocoles de différenciation des CSPh en cellules de l'EPR.....</b>           | <b>91</b> |
| <b>Tableau 3 : Tableau récapitulatif des protocoles de différenciation des CSPh en cellules de la neuro-rétine.....</b> | <b>97</b> |

## LISTE DES ABREVIATIONS

---

AAV : *adeno-associated virus* ; virus adéno-associé  
ACE : *angiotensin-converting enzyme* ; enzyme de conversion de l'angiotensine  
ADN : acide désoxyribonucléique  
ADNg : ADN génomique  
ALMS1 : gène et protéine Alstrom Syndrome 1  
ARL13B : *ADP-ribosylation factor-like protein 13B*  
ARN : acide ribonucléique  
(pré-) ARNm : (pré-) ARN messenger  
ARR3 : *retinal cone arrestin-3*  
A, T, G, C, U : adénine, thymine, guanine, cytosine, uracile  
ATP : adénosine triphosphate  
B27 : supplément favorisant la croissance et la différenciation des cellules neuronales  
BBS : syndrome de Bardet-Biedl  
(b)FGF : (*basic*) *fibroblast growth factor* ; facteur de croissance des fibroblastes (basique)  
C10orf90 : *chromosome 10 open reading frame 90* ;  
Casp3 : caspase 3  
CCG : couche des cellules ganglionnaires  
CEP295, CEP250, CEP135, CEP70 : *centrosomal protein 295/250/135/70*  
CHF : *congestive heart failure* ; insuffisance cardiaque congestive  
CNE : couche nucléaire externe  
CNI : couche nucléaire interne  
CP : couche des photorécepteurs  
CPE : couche plexiforme externe  
CPI : couche plexiforme interne  
CRALBP : *cellular retinaldehyde-binding protein*  
CRBP-1 : *cellular retinol binding protein*

CRISPR/Cas9 : *clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein 9* ; courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées/protéine associée à CRISPR 9

CRX : *cone-rod homeobox-containing protein*

CSEh : cellules souche pluripotente embryonnaire humaine

CSPih : cellule souche pluripotente humaine

DAPI : 4',6-diamidino-2-phénylindole

DCM : *dilated cardiomyopathy* ; cardiomyopathie dilatée

DMEM : milieu de Eagle modifié par Dulbecco

DMLA : dégénérescence maculaire liée à l'âge

(D)PBS : solution saline dans un tampon phosphate (de Dulbecco)

EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique

ENU : *N-ethyl-N-nitrosourea* ; N-nitroso-N-éthyl-lurée

EPR : épithélium pigmentaire de la rétine

ERG : électrorétinogramme

FIV : fécondation *in vitro*

FSH : *follicle stimulating hormone* ; hormone de stimulation folliculaire

FT4 : *free tyroxin* ; tyroxine libre

Gas6 : protéine *Growth Arrest – Specific 6*

GFP : *green fluorescent protein* ; protéine fluorescente verte

GGT : gamma-glutamyl transpeptidase

GLUT1, GLUT3, GLUT4 : transporteurs de glucose

gRNA : *guide RNA* ; ARN guide

HDAC2 : histone désacétylase 2

HEK293T : *human embryonic kidney* ; cellule de rein embryonnaire humain

HL : *Hodgkin lymphoma* ; lymphome de Hodgkin

HSPC : *hematopoietic stem/progenitor cells* ; cellules souches et progéniteurs hématopoïétiques

IFT : *intraflagellar transport* ; transport intraflagellaire

IRBP : *interstitial retinol binding protein*

IMC : indice de masse corporelle  
kDa : kiloDalton  
KO : *knockout* ; invalidation génique  
KSR : *KnockOut serum replacement* ; sérum de remplacement Knock-Out  
LH : *luteinizing hormone* ; hormone lutéinisante  
LCA : *Leber congenital amaurosis* ; amaurose congénitale de Leber  
LRAT : *lecithin retinol acetyltransferase*  
MERTK : *myeloid-epithelial-reproductive tyrosine kinase*  
MITF : *microphthalmia-associated transcription factor* ; facteur de transcription associé à la microphthalmie  
MTOC : *microtubule organizing center* ; centre organisateur des microtubules  
N2 : supplément utilisé pour la culture de cellules neuronales et des cellules souches  
NASH : *non alcoholic steatotic hepatitis* ; stéatopathie non-alcoolique  
NPHP1 : *nephrocystin 1*  
NRL : *neural retina-specific leucine zipper protein*  
OCT : tomographie en cohérence optique  
OFD1 : gène du syndrome oro-facio-digital de type 1  
ORL : oto-rhino-laryngologique  
PAM : *protospacer adjacent motif* ; motif adjacent au protospacer  
PAX6 : *paired box 6*  
PCM : *pericentriolar material* ; matière péricentriolaire  
PCR : *polymerase chain reaction* ; réaction en chaîne par polymérase  
PCV : *preciliary vesicle* ; vésicule préciliaire  
PEDF : *pigment epithelium-derived factor* ; facteur dérivé de l'épithélium pigmentaire  
pegRNA : *prime editing guide RNA* ; ARN guide pour le *prime editing*  
PRPF31 : *pre-mRNA processing factor 31*  
PtdSer : phosphatidylsérine  
QI : quotient intellectuel  
RDH5, RDH8 : rétinol déshydrogénases

ROS : *reactive oxygen species* ; dérivés réactifs de l'oxygène  
RPE65 : protéine *retinal pigment epithelium-specific 65 kda*  
RPGR : *retinitis pigmentosa GTPase regulator*  
(RT-) qPCR : (*reverse transcriptase*) *quantitative PCR* ; PCR quantitative  
(par transcription inverse) en temps réel  
SA : syndrome d'Alström  
SAG : *Shh signaling agonist* ; agoniste de la voie Shh  
sgRNA : *single guide RNA* ; ARN simple guide  
siRNA : *small interfering RNA* ; petits ARN interférents  
Shh : *Sonic Hedgehog*  
SNP : *single nucleotide polymorphism* ; polymorphisme nucléotidique  
SVF : sérum de veau foetal  
TALEN : *transcription activator-like effector nuclease* ; nucléase effec-  
trice de type activateur de transcription  
TEER : *trans-epithelial electrical resistance* ; résistance électrique trans-  
épithéliale  
TERT : *telomerase reverse transcriptase* ; transcriptase inverse de la té-  
lomérase  
TGF : *transforming growth factor* ; facteur de croissance transformant  
TRD : *tandem repetition domain* ; domaine de répétitions en tandem  
TSH : hormone thyroïdienne  
TUNEL : *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*  
TULP1 : *tub-like protein 1*  
TVRM : *translational vision research models* ; modèles de recherche  
translationnelle sur la vision  
VEGF : *vascular endothelial growth factor* ; facteur de croissance de  
l'endothélium vasculaire  
VIP : *vasoactive intestinal peptide* ; peptide vasoactif intestinal  
VSX2 : *visual system homeobox 2*  
ZFN : *zinc finger nuclease* ; nucléase à doigt de zinc  
2D/3D : 2 dimensions/3 dimensions

## AVANT-PROPOS

---

Cette thèse est organisée en plusieurs parties visant à donner une vision d'ensemble du contexte scientifique, des objectifs que j'ai cherché à remplir, des résultats obtenus et des conclusions tirées. Dans l'introduction, je décrirai l'œil humain en m'attardant sur la rétine, une de ses composantes majeures. Je décrirai ensuite la maladie génétique rare qui nous intéresse : le syndrome d'Alström (SA). Je décrirai ses différents symptômes et plus particulièrement ceux touchant la rétine. Dans cette partie, je m'intéresserai également au cil primaire, une structure cellulaire atteinte dans les ciliopathies, une famille de maladies à laquelle appartient le SA puis je décrirai les différents modèles animaux et cellulaires permettant actuellement l'étude du SA. Je détaillerai le développement embryonnaire de la rétine et présenterai des protocoles permettant la différenciation de cellules souches pluripotentes humaines en cellules de l'EPR, une sous-couche de la rétine et en organoïdes neuro-rétiniens, des structures récapitulant les types cellulaires de la rétine.

Je présenterai ensuite les objectifs de ma thèse et à l'aide de deux articles, l'un déjà publié et l'autre en cours de publication, je présenterai les résultats obtenus au cours de ma thèse.

Enfin, dans une dernière partie, je discuterai des résultats présentés et des perspectives que ceux-ci ouvrent pour l'étude des symptômes visuels du SA.



# 1 INTRODUCTION

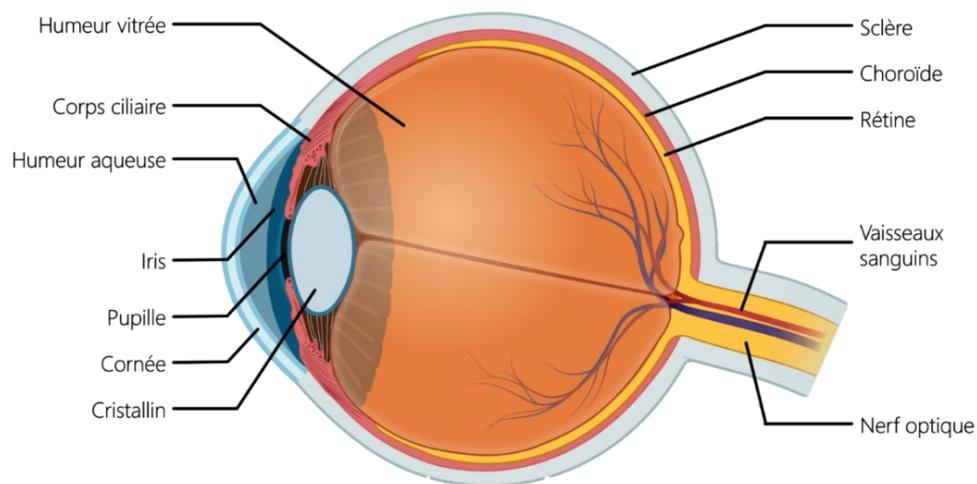
---

## 1.1 L'ŒIL HUMAIN

### 1.1.1 Rôle, structure et morphologie

L'œil humain est une structure extrêmement complexe qui permet la réception de signaux lumineux et leur conversion en signaux électriques analysables par le système nerveux central.

D'un point de vue anatomique, l'œil humain est un organe sphérique de 23 mm de diamètre, et pesant entre 7 et 8 grammes (« Human eye | Definition, Anatomy, Diagram, Function, & Facts | Britannica »). Il est formé de trois enveloppes aussi appelées tuniques, renfermant l'humeur vitrée, l'humeur aqueuse et le cristallin (**Figure 1**).



**Figure 1 : Anatomie de l'œil humain.** La rétine est située est située dans la tunique interne, à l'arrière du globe oculaire. Créé avec BioRender.

La tunique externe, ou fibreuse, est composée de la sclère qui donne à l'œil sa forme et de la cornée, une membrane courbée et transparente laissant passer la lumière. La tunique moyenne, ou uvéale, est composée de la choroïde qui assure l'apport de sang et de nutriments à l'œil, du corps ciliaire et de l'iris qui ensemble régulent la quantité de lumière entrant dans l'œil par la pupille. Enfin, la tunique interne, ou nerveuse, est composée d'une couche pigmentaire et d'une couche nerveuse, la rétine. La cornée, l'iris, le cristallin, le corps ciliaire et l'humeur aqueuse constituent le segment antérieur de l'œil tandis que l'humeur vitrée, la choroïde, la sclère et la rétine constituent le segment postérieur.

La lumière qui émane des objets qui nous entourent pénètre dans l'œil en traversant la cornée puis l'iris qui est un muscle lisse circulaire et pigmenté dont la contraction et la dilatation permettent de réguler la quantité de lumière en fonction de l'intensité lumineuse et ainsi s'adapter aux conditions extérieures. Ensuite, la lumière traverse le cristallin qui joue le rôle de lentille et qui focalise les rayons lumineux sur la rétine avec la macula comme point de concentration des rayons.

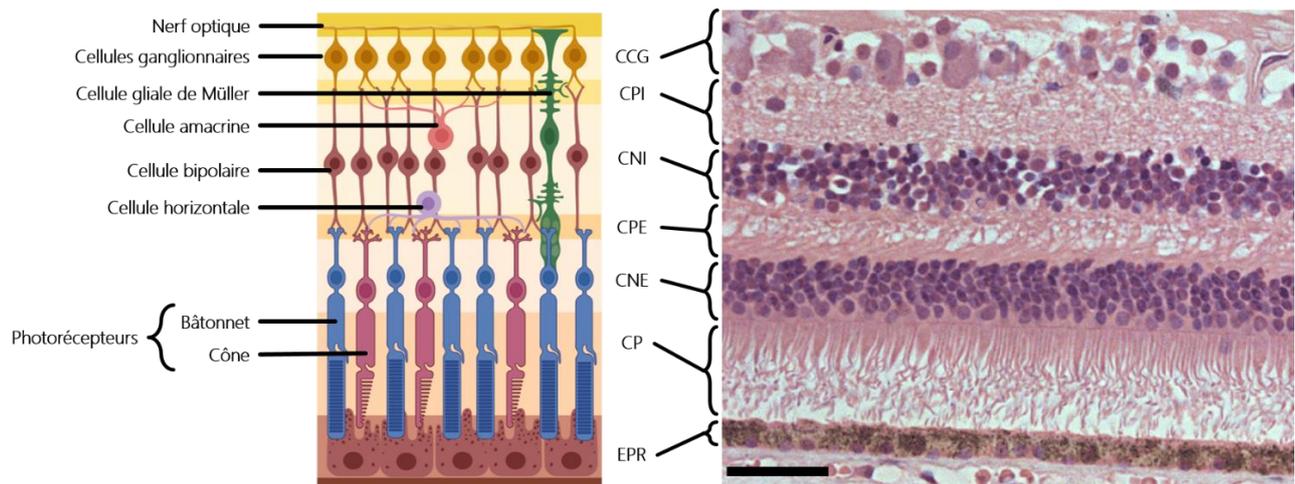
## 1.1.2 La rétine

La rétine est le tissu sensible de l'œil. C'est une fine couche de cellules d'environ 0,25 mm d'épaisseur constituée de deux parties : la neuro-rétine et l'épithélium pigmentaire de la rétine (Augustine et al. 1997).

### 1.1.2.1 La neuro-rétine

La neuro-rétine est composée de trois couches de neurones spécialisés. Ces trois couches sont, de la plus externe à la plus interne, la couche des photorécepteurs (CP), la couche nucléaire externe (CNE) qui contient les noyaux des photorécepteurs, la couche nucléaire interne (CNI) et la couche des cellules ganglionnaires (CCG). Ces couches sont

reliées entre elles par des couches synaptiques : la couche plexiforme externe (CPE) entre la CNI et la CNE et la couche plexiforme interne (CPI) entre la CCG et la CNI (**Figure 2**).

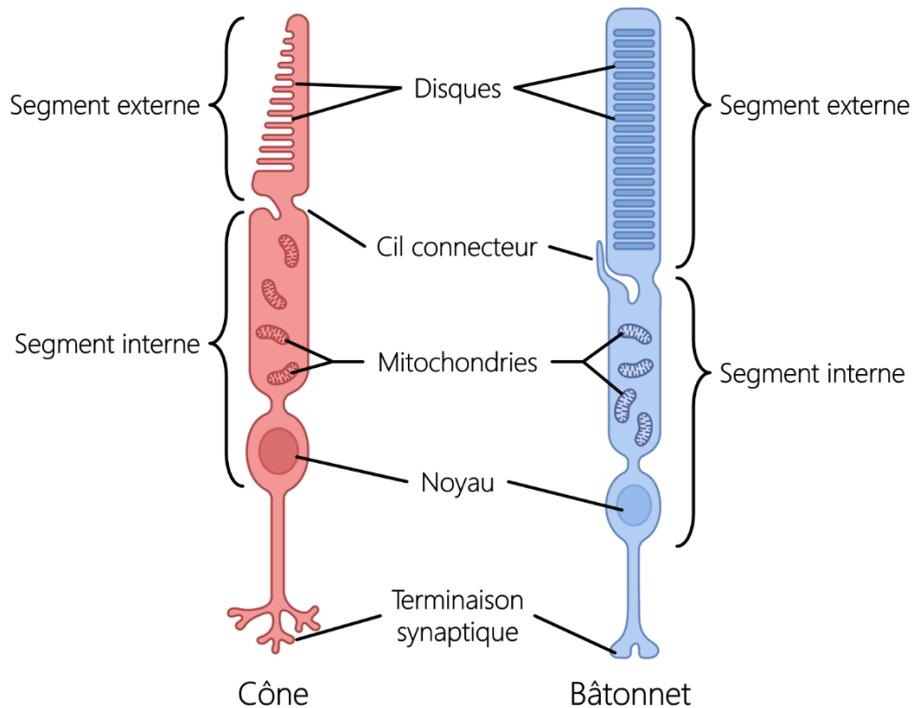


**Figure 2 : Organisation de la rétine humaine.** La rétine est composée de 3 couches de neurones séparées par 2 couches synaptiques. Ces couches sont composées de 7 types cellulaires différents. Adapté de Salobar-Garcia et al. 2014. Créé avec BioRender.

Les cellules les plus externes de la rétine sont les photorécepteurs qui captent la lumière émise. Ce sont ces cellules qui sont capable de phototransduction, c'est-à-dire de convertir un signal lumineux en un signal électrique. Les deux types de photorécepteurs sont les cônes (détection des couleurs) et les bâtonnets (détection des variations d'intensité lumineuse). Une rétine humaine comporte environ 120 millions de bâtonnets et 6 millions de cônes (Schacter 2011). Les cônes sont divisés en 3 sous-types : les cônes S, M et L en fonction des opsines qu'ils contiennent et qui sont excités par des photons émis à différentes longueurs d'ondes. Les cônes S (ou bleus) ont une absorbance de 428 nm, les cônes M (ou verts) ont une absorbance de 534 nm et les cônes L

(ou rouges) ont une absorbance de 564 nm. La présence des trois types de cônes permet une vision trichromatique. Les photorécepteurs sont constitués d'un segment externe, d'un segment interne, d'un corps cellulaire et d'une terminaison synaptique. Dans le cas des bâtonnets, le segment externe est cylindrique et est composé d'une superposition de disques contenant de la rhodopsine, une protéine permettant l'absorption des photons. Dans le cas des cônes, le segment externe est conique et les parois de ce segment forment des replis au sein desquels se trouve une des différentes opsines S (*short* ; bleue), M (*middle* ; verte) ou L (*long* ; rouge). Le segment externe des photorécepteurs est une évolution du cil primaire (Liu, Zhang, et Pierce 2010). Le segment interne des photorécepteurs contient la machinerie métabolique (mitochondries, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, lysosomes) et est connecté au segment externe par le cil connecteur (Molday et Moritz 2015). Le corps cellulaire est continu au segment interne et contient le noyau de la cellule. Enfin, la terminaison synaptique contient des vésicules synaptiques et des synapses à ruban impliquées dans la transmission du glutamate (neurotransmetteur excitateur) des photorécepteurs aux cellules horizontales et bipolaires (**Figure 3**).

La répartition des différents types de photorécepteurs n'est pas homogène sur toute la surface de la rétine. Ainsi, différentes régions peuvent être identifiées au sein de la rétine à savoir la macula, la fovéa, la fovéola, le pôle postérieur et le bord périphérique. La fovéola, zone la plus centrale, est composée de cônes M et L tandis que la fovéa et la macula, plus externes, sont composées de cônes S, M et L. La fovéa est la zone de la rétine où la vision des détails est la plus précise. Elle forme un creux au sein de la macula en raison d'une absence de vascularisation (Bringmann et al. 2018). Par ailleurs, la fovéa comporte deux fois plus de cônes L que de M. La macula contient des bâtonnets en plus des cônes. La rétine périphérique est composée principalement des bâtonnets (Viets, Eldred, et Johnston 2016).



**Figure 3 : Structure des photorécepteurs.** Il existe deux types de photorécepteurs différents, les cônes, chargés de la vision des couleurs et les bâtonnets, chargés de la détection des variations d'intensité lumineuse. Les disques des segments externes renferment la rhodopsine ou les opsines S, M ou L. Créé avec BioRender.

Les cellules horizontales sont des interneurons situés dans la CPE, à la frontière entre les cellules bipolaires et les photorécepteurs. Elles servent à moduler le signal électrique entre ces deux types cellulaires. Lorsqu'une cellule horizontale reçoit un signal du photorécepteur avec lequel elle partage une synapse, elle inhibe les photorécepteurs situés autour. Cette inhibition latérale permet d'augmenter le contraste entre les zones sombres et les zones éclairées (Kaneko 1987). Les cellules horizontales peuvent être de deux types différents : les cellules horizontales H1 et H2. Les cellules horizontales de type H1 forment des synapses avec les bâtonnets et les cônes M et L tandis

que les cellules horizontales de type H2 forment principalement des synapses avec les cônes S et dans une moindre proportion, avec les cônes M et L (Dacey et al. 1996).

Les cellules bipolaires sont des neurones situés dans la CNI et dont le rôle est de transmettre le signal nerveux des photorécepteurs ou des cellules horizontales aux cellules ganglionnaires, soit directement, soit en passant par l'intermédiaire des cellules amacrines. Il existe deux types de cellules bipolaires dont l'activation dépend du signal lumineux arrivant au niveau des photorécepteurs. Lorsque le signal lumineux extérieur est faible, les photorécepteurs vont libérer du glutamate qui a pour effet d'hyperpolariser et donc d'inhiber les cellules bipolaires ON et de dépolariser et donc d'exciter les cellules bipolaires OFF. A l'inverse, lorsque le signal lumineux extérieur est intense, moins de glutamate est libéré par les photorécepteurs. Les cellules bipolaires ON perdent donc leur inhibition tandis que les cellules bipolaires OFF subissent l'effet inverse (Purves et al. 2008).

Les cellules amacrines sont des interneurons inhibiteurs permettant de moduler les signaux électriques. Il existe au moins 33 types de cellules amacrines qui diffèrent par leurs morphologies, par leur stratification au sein de la rétine et par les neurotransmetteurs qu'elles sécrètent (GABAergique, glycinergique ou autre) (Balasubramanian et Gan 2014). Le corps cellulaire de ces cellules se trouve dans la CNI mais c'est dans la CPI qu'elles forment des synapses avec les cellules ganglionnaires de la rétine.

Les cellules ganglionnaires de la rétine sont des neurones dont les axones myélinisés forment le nerf optique reliant le globe oculaire au cerveau. Ces cellules reçoivent les signaux électriques de la part des cellules amacrines et bipolaires et les transmettent sous forme de potentiel d'action jusqu'au cerveau au niveau du corps genouillé latéral (U. S. Kim et al. 2021). Certaines cellules ganglionnaires peuvent être photosensibles bien que ne participant pas directement à la vision. Les axones de ces cellules ganglionnaires photosensibles forment le tractus rétino-hypothalamique et

jouent un rôle dans le rythme circadien et dans le réflexe photomoteur (La Morgia et al. 2017).

En plus des cellules amacrines, la CNI renferme les cellules gliales de Müller, des cellules ayant un rôle de support métabolique des autres types cellulaires de la rétine permettant ainsi un maintien de l'homéostasie rétinienne (Reichenbach et Bringmann 2013).

#### 1.1.2.2 *L'épithélium pigmentaire de la rétine*

L'épithélium pigmentaire de la rétine est une couche monostratifiée faisant partie de la barrière hémato-rétinienne. La membrane apicale de l'EPR fait face au segment externe des photorécepteurs et comporte deux types de microvillosités, certaines fines et longues de 5 à 7  $\mu\text{m}$  de longueur et d'autres plus courtes appelés « gaines ». Les gaines en contact avec les bâtonnets sont cylindriques et ne recouvrent que l'extrémité du segment externe tandis que les gaines en contact avec les cônes sont plus longues et peuvent s'étendre pour recouvrir une plus grande surface de leur segment externe. L'EPR présente également un cil primaire à sa surface apicale, une structure ayant été décrite comme ayant un rôle dans plusieurs voies de signalisation intracellulaires (C. Sun, Zhou, et Meng 2021). La membrane basale est fortement invaginée ce qui permet d'augmenter la surface d'absorption des nutriments et fait face à la membrane de Bruch, une membrane perméable riche en collagène séparant la rétine de la choroïde. La membrane basolatérale des cellules de l'EPR présente des jonctions serrées (*zona occludens*) ainsi que des jonctions adhérentes (gap junctions) et communicantes. Ces jonctions permettent un transport apico-basal de fluides entre les cellules et ainsi maintiennent l'étanchéité et la perméabilité de l'épithélium, participant au maintien de l'homéostasie de la rétine. Le noyau des cellules de l'EPR est localisé en position basale et la présence de mitochondries et de lysosomes révèle une forte activité métabolique.

Enfin, les cellules de l'EPR ont une forme hexagonale et sont caractérisées par une pigmentation due à l'expression de la mélanine (Boulton et Dayhaw-Barker 2001).

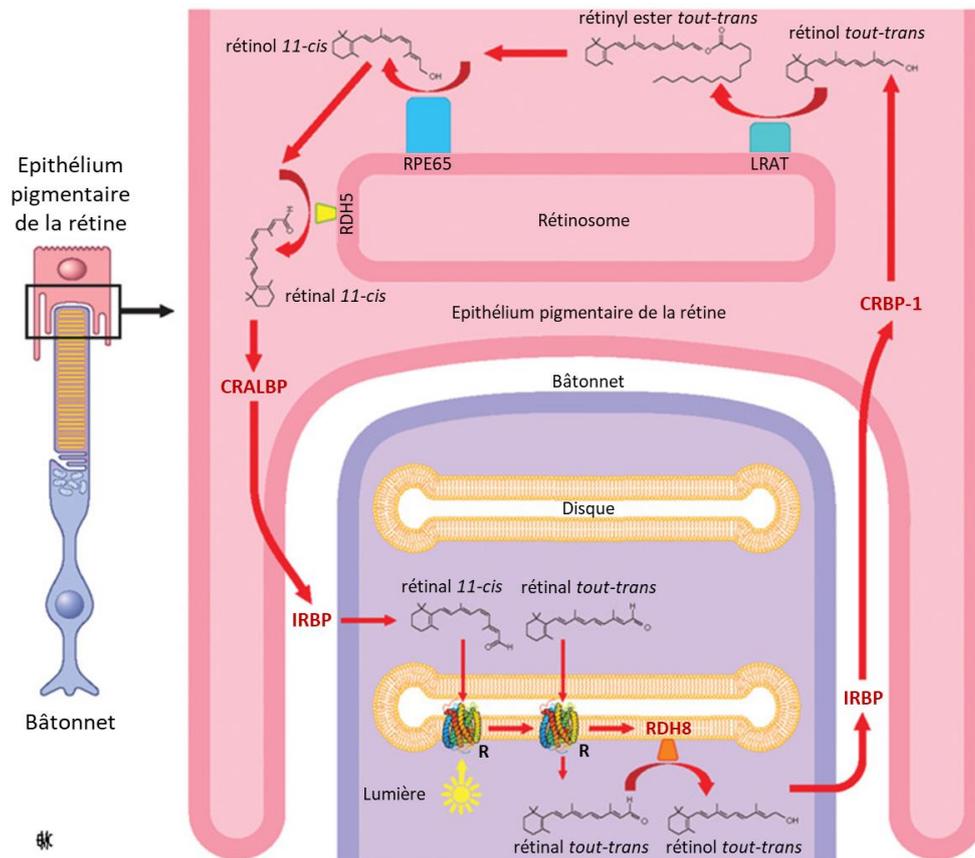
L'EPR est impliqué dans différentes fonctions. Les paragraphes suivants ont pour but de présenter ces fonctions.

- **Le transport transépithélial d'ions, de fluides et de métabolites**

L'EPR permet de maintenir un environnement optimal pour le bon fonctionnement des photorécepteurs en assurant le transport d'eau, d'ions et de nutriments. En effet, la pression intraoculaire qui conduit le liquide extracellulaire vers le fond de l'œil combiné à une forte activité métabolique des photorécepteurs entraînent une augmentation du volume d'eau dans l'espace sous-rétinien. Les cellules gliales de Müller permettent d'acheminer l'eau résiduelle à travers les différentes couches de la rétine jusqu'à l'EPR qui régule ensuite ces mouvements d'eau en évacuant l'eau vers la choroïde à l'aide de canaux spécifiques appelés aquaporine. Le transport d'eau à travers ces pores entraîne un transport transépithélial d'ions chlorure  $\text{Cl}^-$  et potassium  $\text{K}^+$ . Le transport de  $\text{Cl}^-$  de l'espace sous-rétinien vers l'EPR est un transport actif qui requiert de l'énergie fournie par l'ATP (adénosine triphosphate). Cet ATP entre dans les cellules à l'aide des pompes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase situées à la membrane apicale de l'EPR (Marmorstein 2001). Ces échanges aqueux et ioniques sont à l'origine de la différence de potentiel transépithélial. Les cellules de l'EPR présentent également des canaux nécessaires à l'évacuation de produits métaboliques générés par les photorécepteurs comme l'acide lactique (Keeling et al. 2018). En plus des transports ioniques et aqueux, l'EPR délivre des nutriments tels que le glucose, le rétinol, la vitamine A, l'acide ascorbique et des acides gras (Simó et al. 2010). En l'absence de vascularisation, l'absorption du glucose est indispensable et se fait passivement grâce à des transporteurs spécifiques tels que GLUT1 et GLUT3 localisés à la membrane apicale et basale (Rizzolo 2008).

- **Le transport et le stockage de rétinoïdes essentiels pour la maintenance du cycle visuel**

Le cycle visuel est la voie métabolique permettant la synthèse et le recyclage du rétinol *11-cis*, un chromophore dérivé de la vitamine A qui initie la phototransduction. Lorsqu'un photon atteint un photorécepteur, cela induit l'activation de la rhodopsine menant à un changement de conformation du rétinol *11-cis* qui devient du rétinol *tout-trans*. Ce dernier va être libéré par la rhodopsine et réduit en rétinol *tout-trans* (vitamine A) par une rétinol déshydrogénase, la RDH8.



**Figure 4 : Schéma récapitulatif du cycle visuel.** Ce processus ayant lieu dans les photorécepteurs et dans les cellules de l'EPR permet de régénérer la rhodopsine (R). Adapté de Salesse 2017.

Le rétinol *tout-trans* va ensuite être transporté des photorécepteurs vers l'EPR par l'IRBP (*Interstitial Retinol Binding Protein*), une protéine transporteuse. Dans l'EPR, le rétinol *tout-trans* va être pris en charge par la CRBP-1 (*Cellular Retinol Binding Protein*) puis reconnu par la LRAT (*Lecithin Retinol Acetyltransferase*) dont le rôle est de transformer le rétinol *tout-trans* en rétinyl ester *tout-trans*. Ce dernier est stocké dans les rétinosomes et est métabolisé si nécessaire en rétinol *11-cis* par la protéine RPE65. Puis, le rétinol *11-cis* est oxydé en rétinol *11-cis* par la RDH5. Le rétinol *11-cis* est enfin stabilisé par CRALBP (*Cellular Retinaldehyde-Binding Protein*) et amené aux segments externes des photorécepteurs où le cycle visuel pourra redémarrer (Crouch et al. 1996).

- **La phagocytose et la dégradation des segments externes des photorécepteurs**

La phagocytose est l'une des fonctions fondamentales les plus caractéristiques de l'EPR. Ce processus qui a lieu à la membrane apicale, au lieu de contact entre les cellules de l'EPR et les photorécepteurs permet de maintenir l'activité rétinienne en garantissant un renouvellement constant des cônes et des bâtonnets (Bok 1993). Le renouvellement des segments externes des photorécepteurs de la rétine humaine se fait quotidiennement en suivant un rythme circadien au cours duquel les disques des segments externes des cônes sont remplacés en début de journée tandis que ceux des bâtonnets le sont en fin de journée (Kevany et Palczewski 2010; Parinot et al. 2024). Le renouvellement total des photorécepteurs s'effectue en une dizaine de jours. Le processus de phagocytose se déroule en trois étapes : liaison, internalisation et dégradation. Lors de ce processus, les microvilli des cellules de l'EPR englobent les segments externes des photorécepteurs. Ces derniers présentent une accumulation de phosphatidylsérine (PtdSer) à leur extrémité. Cette molécule se lie à d'autres molécules telles que Gas6 et la protéine S qui engagent à leur tour le récepteur MERTK exprimé par les

cellules de l'EPR (Hall et al. 2005). Cela va avoir pour effet la multimérisation et sa transphosphorylation de MERTK et ainsi l'activation de la GTPase Rac. Celle-ci a également un rôle dans l'englobement des segments externes par l'EPR (Kwon et Freeman 2020). Puis, au fur et à mesure de cet englobement, un phagosome de 1-2  $\mu\text{m}$  de diamètre est formé par les cellules de l'EPR. Ce phagosome fusionne avec des endosomes et des lysosomes pour donner un phagolysosome. Au cours de sa maturation le phagolysosome se déplace vers la face basale des cellules et acquiert des enzymes qui lui donnent ses capacités de dégradation. Parmi elles, la V-ATPase qui a pour effet d'acidifier le phagolysosome aidant ainsi à la dégradation et la cathepsine D, une protéase qui permet de dégrader les opsines qui constituent 95% du contenu des segments externes (Papermaster et Dreyer 1974). Ceux-ci renferment également des phospholipides qui sont décomposés par des hydrolases, les phospholipases A<sub>1</sub> et A<sub>2</sub> (Swartz et Mitchell 1973). Tout ce processus donne naissance à des déchets ayant besoin d'être évacués afin de « résoudre » le phagolysosome. Bien que cette « résolution » ne soit pas totalement comprise, elle est essentielle car elle permet de reconstituer le stock de lysosomes dans la cellule. De plus, l'EPR renvoie aux photorécepteurs certaines molécules présentes dans le phagolysosome telles que le rétinol ou le glucose.

- **L'absorption de la lumière concentrée sur la rétine par le cristallin et la protection contre la photo-oxydation**

L'exposition constante de la rétine à la lumière ainsi que sa forte activité métabolique mène à la formation de ROS (*Reactive Oxygen Species* ; dérivés réactifs de l'oxygène) tels que le peroxyde d'hydrogène qui induisent un stress oxydatif délétère pour les cellules (Maurya et al. 2023). Pour contrer l'effet de ces ROS, l'EPR a des mécanismes de signalisation impliquant des antioxydants et des protéines d'oxydoréduction tels que la superoxyde dismutase, le glutathion ou l' $\alpha$ -tocophérol (Newsome et al. 1994).

- **La production de facteurs de croissance**

Les cellules de l'EPR sécrètent du VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor* ; facteur de croissance de l'endothélium vasculaire), du FGF-5 (*Fibroblast Growth Factor 5*), de l'Endothelin I et de la Cystatin C au niveau basolatéral notamment dans le but de maintenir les vaisseaux sanguins de la choroïde en bonne santé (Saint-Geniez et al. 2009). Au niveau apical, les cellules de l'EPR sécrètent de l'acide hyaluronique, de l' $\alpha$ B-cristalline et du PEDF (*Pigment Epithelium-Derived Factor*), un facteur neurotrophique et un inhibiteur de l'angiogenèse (Kay, Yang, et Paraoan 2013).

Les photorécepteurs et l'EPR peuvent être atteints dans un nombre important de maladies oculaires (DMLA, rétinopathie diabétique, rétinite pigmentaire, etc...). Nous allons à présent nous pencher sur une des maladies qui touche l'œil entre autres organes, le syndrome d'Alström.

## **1.2 LE SYNDROME D'ALSTRÖM**

### **1.2.1 Description**

Le syndrome d'Alström (SA) est une maladie monogénique rare causée par des mutations dans le gène *ALMS1*. Décrite pour la première fois en 1959 par Carl Henry Alström, cette maladie a une prévalence estimée à 1 cas sur 1 000 000 (Alstrom et al. 1959; Marshall et al. 2011) bien que ce nombre puisse être sous-évalué en raison de la difficulté à établir un diagnostic fiable. En effet, certains symptômes de cette maladie apparaissent dès la naissance tandis que d'autres émergent au cours de l'enfance. Les premières caractéristiques ayant été décrites sont une dystrophie rétinienne associée à une obésité, une surdité de perception et une résistance à l'insuline (Alstrom et al. 1959). A l'heure actuelle, un diagnostic peut être établi en se basant sur les critères

récapitulés dans la **Table 1** en fonction de l'âge du patient. Bien que les symptômes des patients puissent varier en fonction de l'âge et que le SA présente des variabilités cliniques inter- et intra-familiales, certains symptômes communs sont retrouvés chez un grand nombre de patients, permettant d'établir une liste de phénotypes caractéristiques de la maladie. Les paragraphes suivants ont pour but de présenter ces symptômes.

- **Symptômes ophtalmologiques**

Un des premiers symptômes révélateurs du SA chez le nourrisson est un nystagmus, c'est-à-dire un mouvement saccadé et incontrôlé des yeux ainsi qu'une photophobie, une sensibilité extrême à la lumière allant jusqu'à l'intolérance (Marshall, Beck, et al. 2007). La dégénérescence des photorécepteurs révèle une dystrophie rétinienne dès les premières semaines après la naissance.

Cette dégénérescence entraîne une malvoyance sévère rapide. La dystrophie des cônes survient avant celle des bâtonnets impliquant que la vision des patients dans leur petite enfance provient principalement des bâtonnets. Néanmoins les bâtonnets dégénèrent rapidement après les cônes et commencent à se dégrader vers l'âge de 5 ans (Russell-Eggitt et al. 1998). La perte de la vision est progressive et à l'âge de 9 ans, on estime qu'un tiers des patients sont totalement aveugles, qu'à 12 ans, la moitié d'entre eux le sont pour finalement atteindre 90% des patients à l'âge de 16 ans. La rétine des patients présente des vaisseaux sanguins diminués, une blancheur anormale du disque optique et une atrophie significative de l'EPR.

D'un point de vue histologique, les rétines des patients présentent une hyalose astéroïde, des druses du disque optique et des spicules osseux. Des images obtenues par tomographie en cohérence optique (OCT) sur un patient âgé de 5 ans montrent un amincissement de la macula ainsi qu'un arrêt précoce du développement maculaire

| Age                          | Critères principaux   | Critères additionnels   | Minimum requis  | Autres signes évocateurs  |
|------------------------------|---|---|---|---|
| <b>Naissance à 2 ans</b>     | Présence de deux variants du gène ALMS1 (présentant au moins une mutation perte de fonction)<br><br>Histoire familiale de SA<br><br>Nystagmus/photophobie   | Obésité<br><br>Cardiomyopathie dilatée/insuffisance cardiaque congestive  | <b>2 critères principaux<br/>OU<br/>1 critère principal + 2 critères additionnels</b> | Infections respiratoires récidivantes<br><br>Absence d'anomalie des extrémités<br>Antécédent personnel ou familial de retard des acquisitions   |
| <b>2 ans à 14 ans</b>        | Présence de deux variants du gène ALMS1 (présentant au moins une mutation perte de fonction)<br><br>Histoire familiale de SA<br><br>Troubles visuels : nystagmus, photophobie, baisse de l'acuité visuelle, malvoyance liée à une dystrophie rétinienne (ERG) | Obésité et/ou insulino-résistance et/ou diabète<br><br>Cardiomyopathie dilatée/insuffisance cardiaque congestive<br>Surdité de perception<br>Atteinte hépatique<br><br>Insuffisance rénale  | <b>2 critères principaux<br/>OU<br/>1 critère principal + 3 critères additionnels</b> | Infections respiratoires récidivantes<br><br>Absence d'anomalie des extrémités<br>Retard des acquisitions<br>Hypertriglycéridémie<br>Scoliose<br>Pieds plats<br>Hypothyroïdie<br>HTA<br>Déficit en GH<br>Infections urinaires récidivantes<br>Avance d'âge osseux                         |
| <b>15 ans à l'âge adulte</b> | Présence de deux variants du gène ALMS1 (présentant au moins une mutation perte de fonction)<br><br>Histoire familiale de SA<br><br>Troubles visuels : nystagmus, photophobie, baisse de l'acuité visuelle, malvoyance liée à une dystrophie rétinienne (ERG) | Obésité et/ou insulino-résistance et/ou diabète<br><br>Cardiomyopathie dilatée/insuffisance cardiaque congestive<br>Surdité de perception<br>Atteinte hépatique<br>Insuffisance rénale<br>Petite taille<br>Hypogonadisme chez les hommes<br><br>Oligoménorrhée ou hyperandrogénie chez la femme | <b>2 critères principaux<br/>OU<br/>1 critère principal + 4 critères additionnels</b> | Infections respiratoires récidivantes<br><br>Absence d'anomalie des extrémités<br>Retard de développement<br>Hypertriglycéridémie<br>Cypho-scoliose<br>Pieds plats<br><br>Hypothyroïdie<br><br>HTA<br>Déficit en GH<br>Infections urinaires récidivantes/dysfonction vésicale<br>Alopécie |

**Table 1 : Critères pour le diagnostic du syndrome d'Alström.** Adapté de Marshall, Beck, et al. 2007; Marshall et al. 2013.

avec une organisation structurelle immature de la rétine caractérisée par une couche unique de cônes et de bâtonnets courts et épais ainsi que des segments courts et immatures ne présentant pas de cil connecteur (Vingolo et al. 2010). De plus, des complications annexes peuvent être observées telle qu'une cataracte dont la prise en charge chirurgicale peut permettre une amélioration de la perception de la lumière.

- **Symptômes auditifs**

Dans la première décennie de la vie des patients, 89% d'entre eux développent une surdité de perception (ou neurosensorielle) bilatérale progressive dont l'âge d'apparition et la sévérité sont variables (Welsh 2007). Ces atteintes du système auditif s'accompagnent d'infections du système oto-rhino-laryngologique (ORL) comme des sinusites et des otites séro-muqueuses (Marshall et al. 2005). Ces infections peuvent être à l'origine d'une surdité de transmission transitoire dans la petite enfance, avant que la surdité de perception ne se mette en place. Les surdités de transmission ont pour origine l'oreille externe et/ou moyenne tandis que les surdités de perception ont essentiellement pour origine l'oreille interne.

- **Symptômes cardiaques**

Les patients atteints du SA présentent pour 62% d'entre eux une cardiomyopathie dilatée (DCM : *dilated cardiomyopathy*). Pour 43% de ces patients, la DCM provoque une insuffisance cardiaque (CHF ; *congestive heart failure*) au cours des 16 premiers mois après la naissance (Makaryus et al. 2007) mettant en évidence une dilatation du ventricule gauche et une altération de la fraction d'éjection. Chez de nombreux nourrissons atteints du SA, la fonction cardiaque s'améliore autour de l'âge de 3 ans et reste stable pendant de nombreuses années avec une fonction faiblement altérée mais viable. Chez ces patients une récurrence soudaine a souvent lieu à l'adolescence ou à l'âge

adulte. Chez d'autres patients la défaillance cardiaque est chronique et apparaît pour la première fois plus tardivement. Par ailleurs, les comorbidités associées au SA (diabète de type II, obésité) augmentent la probabilité de complexification des symptômes cardiaques en y ajoutant par exemple un risque de coronaropathie élevé.

- **Obésité**

Bien que le poids à la naissance et l'IMC (indice de masse corporelle) soient considérés comme normaux dans les premiers mois suivants la naissance des patients atteints du SA, une prise de poids rapide est observée entre l'âge de 6 mois et 1 an. L'IMC tend à se stabiliser chez les patients autour de l'adolescence pour donner une silhouette trapue avec des épaules larges et une poitrine « en tonneau ». Une hyperphagie et un trouble de la satiété sont également observés mais le lien entre ces symptômes et le SA n'a pas été prouvé avec certitude (Marshall et al. 2005). Une diminution de l'activité physique liée aux troubles sensoriels est notée et pourrait contribuer à expliquer la prise de poids rapide. D'un point de vue histologique, les tissus adipeux sont répandus sur tout le corps bien que la graisse soit distribuée plus précisément dans les régions sous-cutanées et viscérales.

- **Diabète de type II**

La plupart des patients atteints du SA développent un diabète sucré de type II. En effet, entre 70 et 80% des patients présentent une hyperinsulinémie, une résistance à l'insuline ainsi qu'une intolérance au glucose. Ces trois symptômes peuvent être détectés dès l'âge de 1 an bien que l'âge de leur apparition soit variable avec un âge médian de 16 ans. Outre les symptômes habituels du diabète, un tiers des patients présentent un *acanthosis nigricans*, une pathologie rare de la peau liée au diabète au

niveau du cou et des aisselles. Le diagnostic de diabète de type II suit les mêmes critères que pour la population globale et est effectué par mesure de la glycémie. Bien que la rétinopathie diabétique soit habituellement observée chez des patients atteints de diabète sucré, aucun cas n'a été rapporté chez les patients du SA en raison de la dégénérescence précoce de la rétine. Par ailleurs, il semble que les patients soient préservés de la neuropathie périphérique, un autre symptôme habituellement lié au diabète (Richard B. Paisey et al. 2009).

- **Dyslipidémie et dysthyroïdie**

En raison de la résistance à l'insuline, les patients atteints du SA ont souvent un taux important de triglycérides dès l'enfance. De plus, une augmentation soudaine et rapide du taux de triglycérides peut entraîner une pancréatite aiguë qui doit être surveillée (R. B. Paisey et al. 2004).

Environ 20% des patients présentent une hypothyroïdie primaire caractérisée par une baisse de la sécrétion de la thyroxine libre 4 (FT4) et une augmentation de celle de l'hormone thyroïdienne (TSH).

- **Atteintes rénales et urologiques**

Les patients présentent une insuffisance rénale progressive caractérisée par une glomérulonéphrite et une destruction graduelle des reins. La glomérulonéphrite se traduit par une diminution du débit de filtration glomérulaire ainsi que par une protéinurie. Pour la moitié des patients atteints du SA, l'insuffisance rénale devient terminale et nécessite la mise en place de solutions thérapeutiques telles que des dialyses ou une transplantation rénale. Comme pour les autres caractéristiques du SA, l'âge d'apparition, la vitesse de progression et la sévérité du symptôme varient grandement entre les patients.

Les problèmes urologiques liés au SA peuvent être mineurs tels que l'urgence urinaire, la difficulté à commencer à uriner, de longs intervalles entre les urinations, des urinations incomplètes ou des douleurs abdominales avant ou pendant la miction. Par ailleurs, les symptômes peuvent évoluer de manière surprenante, passant par exemple d'une rétention à une fréquence urinaire importante ou à une incontinence. Les patients hommes et femmes subissent des infections urinaires et des cystites fréquentes. Certains patients peuvent développer des symptômes plus graves tels qu'une fréquence urinaire et une impériosité très importantes, une incontinence et des douleurs périnéales ou abdominales significatives nécessitant une intervention chirurgicale.

- **Atteintes hépatiques**

La quasi-totalité des patients atteints du SA ont une dysfonction hépatique progressant lentement et caractérisée tout d'abord par une élévation des transaminases et de la gamma-glutamyl transpeptidase (GGT) révélant une stéatopathie non-alcoolique (NASH) liée à la résistance à l'insuline (Connolly et al. 1991; Quiros-Tejeira, Vargas, et Ament 2001). Chez ces patients, le foie et la rate sont élargis et un examen ultrasonique peut révéler une stéatose. Dans l'évolution finale de la maladie, on observe une fibrose importante, une cirrhose, une hypertension portale, des varices œsophagiennes, une encéphalopathie et une hémorragie digestive haute pouvant conduire au décès du patient.

- **Hypogonadisme**

Les patients atteints du SA présentent régulièrement des troubles du développement pubertaire. Les hommes présentent des organes génitaux externes de petite taille, un développement excessif des glandes mammaires et une atrophie des testicules présentant une fibrose des tubes séminifères (Marshall et al. 2005). Néanmoins,

des spermatozoïdes peuvent être trouvés dans le liquide séminal bien que leur nombre soit très réduit. Les taux élevés d'hormone de stimulation folliculaire (FSH ; *follicle stimulating hormone*) et d'hormone lutéinisante (LH ; *luteinizing hormone*) combiné à un taux réduit de testostérone indiquent un hypogonadisme primaire (Warren et al. 1987). Chez la plupart des patientes atteintes du SA, le développement sexuel est normal jusqu'à la puberté et les premières menstruations bien que certains cas de puberté précoce et de développement mammaire tardif aient été rapportés. Ces patientes présentent un hyper-androgynisme, un hirsutisme et une alopecie qui peuvent être liés à la résistance à l'insuline (Kocova et al. 2011). Les organes génitaux externes sont de taille normale mais les menstruations sont souvent irrégulières, peu abondantes et sporadiques. Plus de 20% des patients présentent des kystes ovariens présentant des modifications fibreuses denses, des follicules primaires et secondaires réduits et une absence de corps jaunes. Les taux de FSH et de LH apparaissent dans la moyenne. Des grossesses ont pu être menées à terme par des patientes atteintes du SA (Marozio et al. 2022).

- **Atteintes respiratoires**

Les atteintes du système pulmonaire font partie des symptômes les plus fréquents dans l'enfance des patients. Les infections chroniques du système respiratoire se manifestent par des bronchites chroniques, de l'asthme, des rhino-sinusites, des épisodes de pneumonie ainsi que par des rhumes et des gripes plus fréquents que chez la moyenne des enfants. Avec l'âge, les patients souffrent de bronchopneumopathie chronique obstructive et de syndrome de détresse respiratoire aigu. Une hypoxémie chronique est rapportée chez certains patients et des épisodes d'hypoxémie sévère peuvent arriver en cas d'infection et lors d'interventions chirurgicales (Khoo et al. 2009).

- **Troubles du développement**

La plupart des patients présentent une intelligence normale nuancée par un retard d'apprentissage et un décalage des acquisitions probablement dû aux atteintes des appareils visuels et auditifs. Le quotient intellectuel (QI) des patients ne semble pas impacté mais les grandes étapes du développement de la motricité telles que le fait de s'asseoir, se tenir debout, et la marche semblent retardées de 1 à 2 ans. De plus, les patients font preuve d'une difficulté à garder l'équilibre et des problèmes de coordination des mouvements et de la motricité fine ont été rapportés. De rares cas d'autisme, de déficience intellectuelle, de dépression chronique, d'épilepsie, de comportements psychotiques et de perturbations du cycle veille/sommeil ont également été notés. Néanmoins, certains de ces symptômes peuvent être secondaires et dériver des atteintes neurosensorielles.

- **Autres**

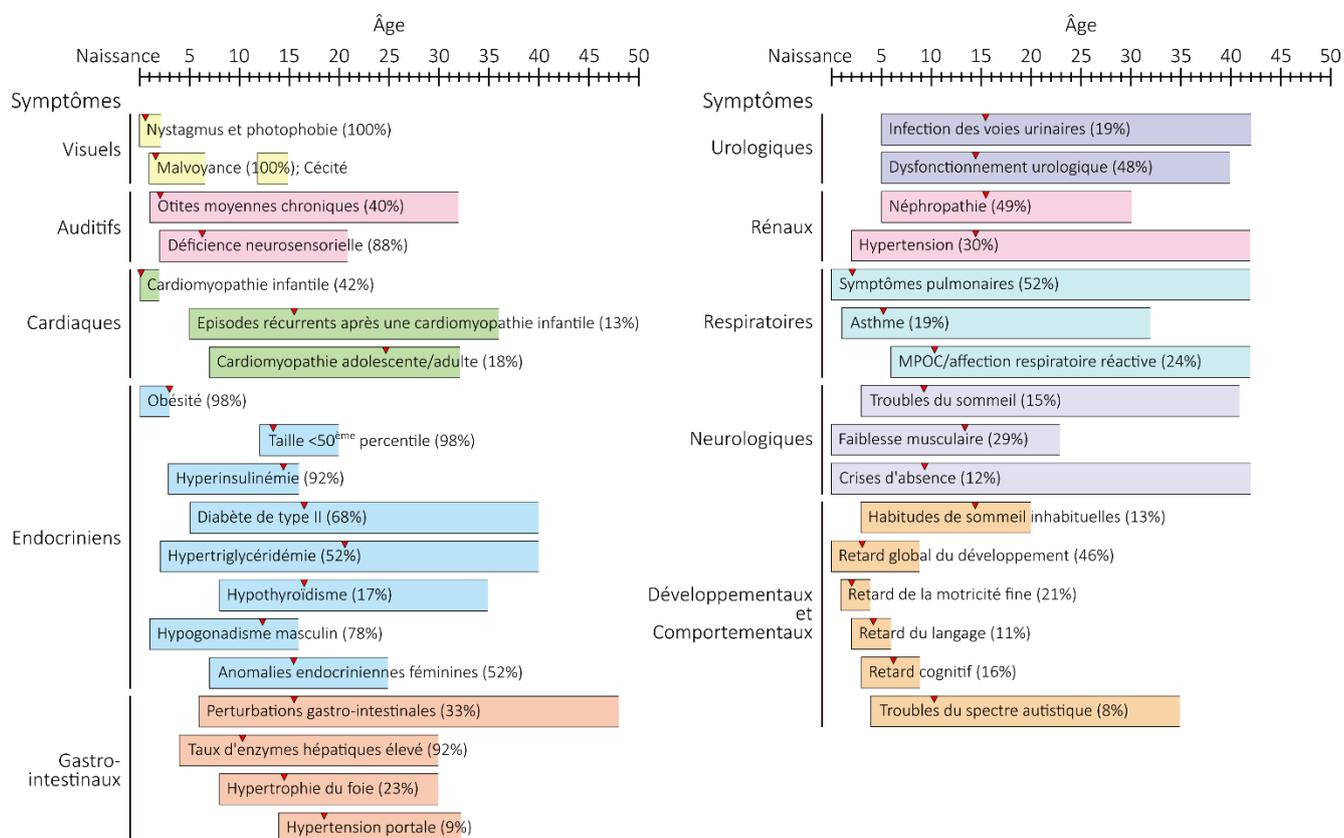
Le SA est également caractérisé par une hypertension, l'observation de pieds plats et une scoliose. Des caractéristiques corporelles telles que les yeux enfoncés, le visage rond, une hyperostose frontale interne, des oreilles épaisses, une calvitie frontale précoce et des cheveux fins peuvent être observées. Enfin, les patients peuvent également présenter des doigts et des orteils raccourcis avec brachydactylie et des anomalies dentaires et gingivales.

Peu d'études comparant de larges cohortes de patients atteints du SA existent dans la littérature, rendant difficiles les analyses globales sur cette maladie. Parmi les raisons qui expliquent cela, on peut citer le fait que les erreurs de diagnostics sont fréquentes en raison de la variabilité des symptômes et des similitudes entre le SA et d'autres maladies, notamment les ciliopathies sur lesquelles nous reviendrons plus tard. Néanmoins, une étude de 2005 comparant les symptômes de 182 patients a permis

d'aider à établir une liste de symptômes communs majoritairement retrouvés chez les patients (Marshall et al. 2005). Selon cette étude, 98% des patients présentent des troubles visuels tel qu'un nystagmus et une photophobie en plus d'une dystrophie des bâtonnets rendant 100% de ces patients légalement aveugles dès la moitié de leur deuxième décennie. Ensuite, les atteintes auditives sont présentes chez 89% des patients. L'obésité infantile est également un point commun à 98% des patients, tout comme l'hyperinsulinémie (92%) et le diabète de type II, qui touche 82% des patients de plus de 16 ans. La cardiomyopathie dilatée concerne 62% des patients et les troubles rénaux mis en évidence par une élévation du taux de transaminase dans le rein touchent 92% des patients. La **figure 5** présente un récapitulatif des symptômes du SA habituellement retrouvés chez les patients ainsi que la tranche d'âge et l'âge moyen auquel ceux-ci se déclenchent.

### 1.2.2 Prise en charge des patients

A l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement curatif spécifique. Les traitements existants visent principalement à traiter les manifestations symptomatiques indépendamment les unes des autres (Marshall, Beck, et al. 2007). C'est pourquoi les enfants atteints du SA nécessitent un suivi approfondi permettant de constater l'étendue des symptômes au fur et à mesure du développement de la maladie afin de pouvoir adapter la prise en charge médicale et anticiper les complications qui pourraient apparaître avec le temps. Les symptômes oculaires ne peuvent pas être traités et aucune méthode ne permet d'empêcher la perte progressive de la vue. Néanmoins, dans les premières années de la maladie, les patients peuvent être aidés grâce à des verres spéciaux teintés de rouge limitant la photosensibilité. Les patients atteints de cataracte peuvent également se voir proposer une opération chirurgicale. Étant donné le caractère inéluctable



**Figure 5 : Récapitulatif des symptômes du SA et âge d'apparition.**  
 Les flèches rouges représentent l'âge moyen d'apparition des symptômes et les nombres entre parenthèses le pourcentage de patients présentant le symptôme en question. Adapté de Marshall et al. 2005.

de la perte de la vision, les patients se voient proposer rapidement d'apprendre à se déplacer sans voir mais également d'apprendre le Braille ainsi que d'autres formes de communication non visuelles.

Tout comme les symptômes oculaires, les symptômes auditifs et ORL ne peuvent être traités de façon durable. Néanmoins, une meilleure audition peut être proposée aux patients à l'aide d'appareils auditifs. Dans certains cas, un implant cochléaire peut être envisagé et permet au patient de gagner en capacités sociales et scolaires (Gheller et al. 2020).

Des échographies cardiaques régulières permettent de suivre le développement et la progression de la maladie et ainsi d'adapter la réponse médicale pour qu'elle soit la plus adéquate possible. Un traitement à long-terme visant à inhiber l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE ; *angiotensin-converting enzyme*) est recommandé pour les patients atteints de cardiomyopathies. D'autres traitements tels que les diurétiques, les digitaliques, les  $\beta$ -bloquants et la spironolactone peuvent avoir un effet positif sur les patients. La transplantation cardiaque peut être envisagée bien qu'elle n'améliore pas les conditions de vie des patients au niveau des autres organes concernés par le SA. Néanmoins, un cas de transplantation cardiaque et pulmonaire réussie a déjà été rapporté chez un patient atteint d'une forme modérée du SA (Goerler et al. 2007).

Comme pour la plupart des patients atteints de troubles métaboliques, il est régulièrement conseillé aux patients atteints du SA de pratiquer une activité sportive adaptée et régulière tel que la marche dans le but d'augmenter l'externalisation des récepteurs GLUT4 au sein des cellules musculaires (Hayashi, Wojtaszewski, et Goodyear 1997). Néanmoins, la mise en place de ces exercices peut être difficile compte tenu des troubles neurosensoriels affectant les patients. Ces exercices sont souvent combinés à une adaptation du régime alimentaire dans le but de réduire le poids des patients et de leur conférer un style de vie plus sain. Ces régimes permettent de corriger au moins en partie plusieurs aspects de la maladie tels que la pression artérielle, le taux sanguin de triglycérides, l'intolérance au glucose ou encore les problèmes de reflux gastro-œsophagiens (Richard B. Paisey et al. 2014)

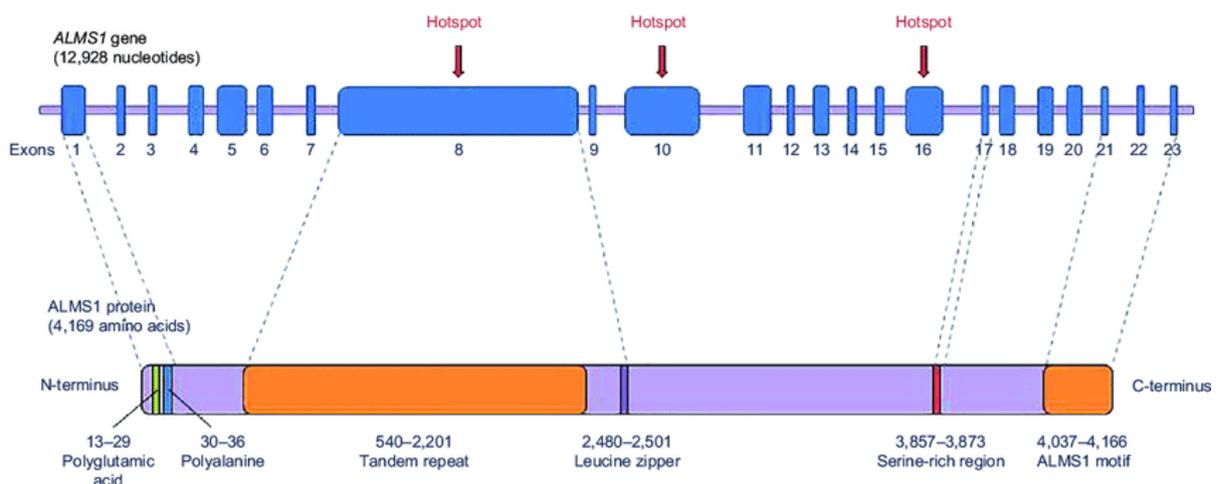
Les cas de diabète de type II liés au SA peuvent être traités avec de la metformine et des glitazones de sorte à pallier à l'intolérance au glucose (Sinha et al. 2007). Néanmoins, une attention particulière doit être apportée aux patients après traitement en raison de la propension de la metformine à aggraver les troubles rénaux et celle des

glitazones à entraîner des cardiomyopathies. De plus, la metformine semble également avoir des effets bénéfiques sur la régulation du cycle menstruel chez les patientes du SA.

### 1.2.3 Génétique du SA

#### 1.2.3.1 Le gène *ALMS1*

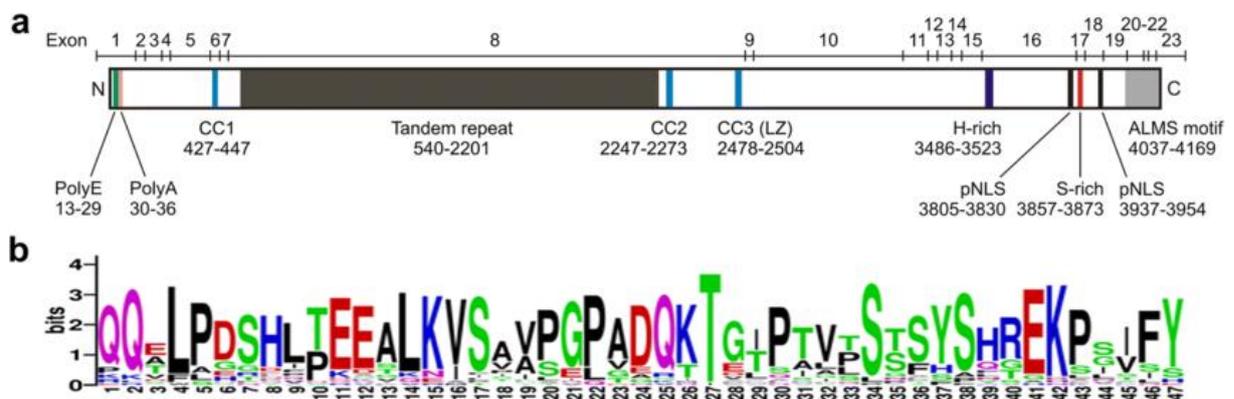
Le SA est une maladie génétique rare de type autosomique récessive due à différentes mutations dans le gène *ALMS1*. *ALMS1* est un gène localisé sur le bras court du chromosome 2, à la position 2p13 et qui a été identifié en 2002 par deux équipes différentes comme étant responsable du SA (Gayle B. Collin et al. 2002; Hearn et al. 2002). *ALMS1* a une taille d'environ 225 000 paires de bases et est organisé en 23 exons (Marshall et al. 2011) (**Figure 6**). Le gène *ALMS1* code pour une protéine de 461,2 kDa et d'une taille de 4169 acides aminés (Marshall, Beck, et al. 2007). Cette protéine est ubiquitaire et a été localisée au centrosome et dans les corps basaux des cellules ciliées (Hearn et al. 2005).



**Figure 6 : Structure du gène *ALMS1*.** *ALMS1* a une taille d'environ 225 000 paires de bases et est composé de 23 exons. Tiré de Álvarez-Satta, Castro-Sánchez, et Valverde 2015.

L'exon 1 d'*ALMS1* contient une extension d'acide glutamique (polyE ; aa13-29) caractérisée par une répétition du trinuécléotide (GAG)<sub>N</sub>GAA(GAG)<sub>3</sub> et est suivie par un segment de sept résidus Alanine (aa30-36). L'exon 8, d'une taille notable de 6kb, présente un grand domaine de répétitions en tandem (TRD) codant 34 répétitions imparfaites de 45 à 50 acides aminés. Cette séquence représente 40% de la protéine et sa séquence consensus est donnée en **figure 7**.

L'extrémité C-terminale de la protéine contient des signaux de localisation nucléaires ainsi qu'un motif conservé à travers l'évolution, le motif ALMS qui est retrouvé dans deux autres protéines centrosomales, CEP295 (aussi connue sous le nom de KIAA1731) et C10orf90 (aussi connue sous le nom de FATS) (Gayle B. Collin et al. 2002; Knorz et al. 2010).



**Figure 7 : Structure de la protéine ALMS1.** L'exon 8 possède un large domaine de répétitions en tandem représentant 40% de la protéine et donc la séquence consensus est donnée. Tiré de Hearn 2019.

### 1.2.3.2 Mutations pathologiques

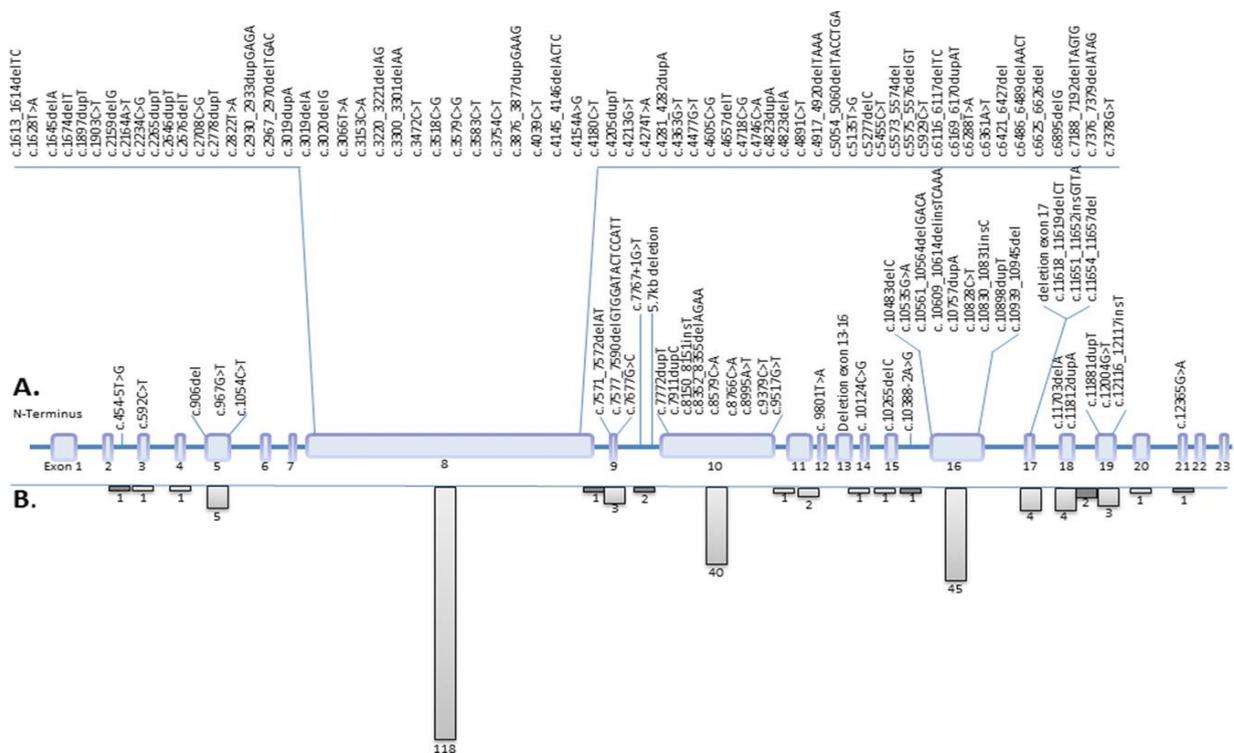
Un grand nombre des mutations pathologiques retrouvées chez les patients atteints du SA se trouvent en amont de l'exon 7 et sont pour la plupart d'entre elles des

mutations entraînant l'apparition d'un codon STOP au sein de la séquence du gène. Ces mutations sont donc à l'origine de protéines tronquées (Marshall, Beck, et al. 2007). Ces mutations peuvent être des mutations non-sens menant au remplacement d'un codon codant un acide aminé par un codon STOP mais également des événements d'insertions et de délétions induisant un décalage du cadre de lecture et menant à l'apparition d'un codon STOP précoce. Au sein du gène *ALMS1*, l'exon 8 semble concentrer un grand nombre de mutations pathologiques (Marshall et al. 2015). Parmi les éléments pouvant expliquer ce phénomène on trouve premièrement le fait que cet exon est le plus grand d'*ALMS1*, couvrant 6108 paires de bases sur 12844, soit près de la moitié de la séquence totale du gène (Bea-Mascato et Valverde 2024), impliquant une plus grande probabilité de contenir une mutation. Historiquement, les premières mutations pathologiques d'*ALMS1* à avoir été identifiées se trouvent dans les exons 8, 10 et 16 (Joy et al. 2007; Marshall, Hinman, et al. 2007; Marshall et al. 2011) ce qui a poussé les chercheurs à se concentrer sur ces exons dans leur recherche de nouvelles mutations. La **figure 8** présente un schéma récapitulatif des mutations pathologiques retrouvées dans les exons d'*ALMS1*.

Les méthodes récentes de séquençage et de génotypage des patients ont plus tard permis d'identifier des mutations pathologiques au sein des exons 5, 11, 12, 18, 20 mais également dans les introns du gène (Richard B. Paisey et al. 2014; Casey et al. 2014; Taşdemir et al. 2013; Marshall, Hinman, et al. 2007; Malm et al. 2008; Bond et al. 2005; Aldahmesh et al. 2009; Ozantürk et al. 2015; Sanyoura et al. 2014).

### 1.2.3.3 Lien génotype-phénotype

Différentes études ont tenté d'établir un lien entre génotype et phénotype concernant le SA. Seulement, la plupart de ces études se basent sur des cohortes de patients assez limitées n'excédant pas une cinquantaine de patients (Minton et al. 2006; Bond et al. 2005; Marshall, Hinman, et al. 2007).



**Figure 8 : Répartition de mutations pathologiques au sein d'ALMS1.**  
L'exon 8 concentre une majorité des mutations responsables du SA compte tenu de sa taille. Tiré de Marshall et al. 2015.

Compte tenu de la rareté du SA et de la difficulté à accéder à un nombre élevé de patients pouvant être suivis de façon adéquate à travers le temps, il est peu probable

que d'autres études se basant sur des cohortes de patients plus importantes puissent voir le jour. C'est pourquoi, des méta-analyses ont été menées plus récemment.

Les méta-analyses sont des études compilant les résultats d'un nombre important d'études de plus petite taille et qui permettent de s'affranchir au moins en partie de la limite imposée par la taille des cohortes de patients atteints de maladies rares (Riley, Lambert, et Abo-Zaid 2010; Stewart et Clarke 1995). De telles analyses ont été menées pour différentes maladies rares (Friede et al. 2017), notamment dans le cas du syndrome de Bardet-Biedl, une ciliopathie et ont permis dans certains cas d'identifier un lien entre génotype et phénotype (Niederlova et al. 2019). Une méta-analyse compilant les données médicales et génétiques de 357 patients atteints du SA a été menée en 2024 et a permis d'identifier cinq mutations parmi les plus fréquemment retrouvées chez les patients (Bea-Mascato et Valverde 2024). De plus, cette étude a permis de déterminer que les patients ayant une mutation pathologique autour de l'exon 10 ont plus de probabilité de cumuler les symptômes du SA et d'avoir une aggravation rapide de la maladie, en comparaison à des patients dont la ou les mutations sont présentes en aval de l'exon 9 ou en amont de l'exon 13 (Bea-Mascato et Valverde 2024). Enfin, bien que Marshall, Hinman et al. aient décrit en 2007 une association entre des altérations génomiques dans l'exon 8 et des atteintes hépatiques, ces observations ne sont pas retrouvées dans les méta-analyses (Marshall, Hinman, et al. 2007; Bea-Mascato et Valverde 2024).

#### *1.2.3.4 Les variants d'ALMS1*

Peu d'études rapportent quels sont les variants les plus communément transcrits chez les patients atteints du SA. Cependant, bien que la littérature ne soit pas très fournie à ce sujet, certains articles mentionnent des détails intéressants. Dans une

étude de 2002, une équipe s'est penchée sur des bases de données publiques et a déterminé que les exons 22 et 23 sont présents dans les transcrits les plus abondants (Gayle B. Collin et al. 2002). Par ailleurs, d'autres études ont constaté que l'exon 2 d'*ALMS1* est fréquemment absent des transcrits (Hearn et al. 2002).

#### 1.2.3.5 Fonctions de la protéine *ALMS1*

Le rôle d'*ALMS1* dans les cellules n'est pas totalement établi mais la littérature mentionne des rôles supposés dans la régulation du cycle cellulaire et dans le transport intra-ciliaire. En effet, dans une étude de 2005, Hearn et al. ont analysé la localisation de la protéine *ALMS1* à l'aide de deux anticorps, le premier ciblant l'extrémité N-terminale de la protéine, le second ciblant le TRD de l'exon 8. Les expériences menées à l'aide de ces anticorps ont permis aux auteurs de déterminer la localisation centrosomale d'*ALMS1* et de conclure à un rôle probable dans l'organisation du centrosome et des microtubules (Hearn et al. 2005). Puis, dans un article publié en 2007, Li et al. ont démontré le rôle d'*ALMS1* dans la ciliogenèse par des expériences de siRNA (*small interfering RNA* ; petits ARN interférents) (G. Li et al. 2007). Ensuite, l'étude de Knorz et al en 2010 a visé à étudier le rôle des différents domaines composant la protéine *ALMS1*. Pour cela, les auteurs ont étudié le rôle de deux autres protéines qui partagent des domaines communs avec *ALMS1*. Cette étude confirme le rôle d'*ALMS1* dans la ciliogenèse et conclue également à son rôle dans le transport intracellulaire ainsi qu'à un rôle structurel dans les centrioles (Knorz et al. 2010). Puis, dans une étude de 2012, Collin et al. ont démontré qu'*ALMS1*, en plus d'interagir avec des composants du cytosquelette, est impliquée dans le trafic endosomal, notamment dans celui de la transferrine, une protéine liée aux processus d'endocytose et de recyclage endosomal (Gayle B. Collin et al. 2012). D'autres études complètent cela avec un rôle dans le trafic endosomal de GLUT4 et de Notch1 (Favaretto et al. 2014; Leitch et al. 2014).

Une étude de 2011 rapporte également qu'ALMS1 est impliqué dans la production de matrice extracellulaire. En effet, Zulato et al. montrent que les fibroblastes issus de patients atteints du SA produisent une plus grande quantité de collagène que des cellules saines. De plus, les auteurs rapportent aussi que des gènes impliqués dans la production de matrice sont régulés à la hausse dans ces mêmes cellules. Puis, cette étude analyse la durée du cycle cellulaire et conclue que les cellules issues de patients ont un cycle cellulaire plus long que des cellules saines et prolifèrent plus lentement (Zulato et al. 2011). L'impact d'ALMS1 sur la régulation du cycle cellulaire est confirmé par d'autres études (Shenje et al. 2014; Louw et al. 2014).

Des expériences de *knockdown* d'ALMS1 à l'aide de siRNA montrent également l'importance d'ALMS1 dans la formation du cil primaire.

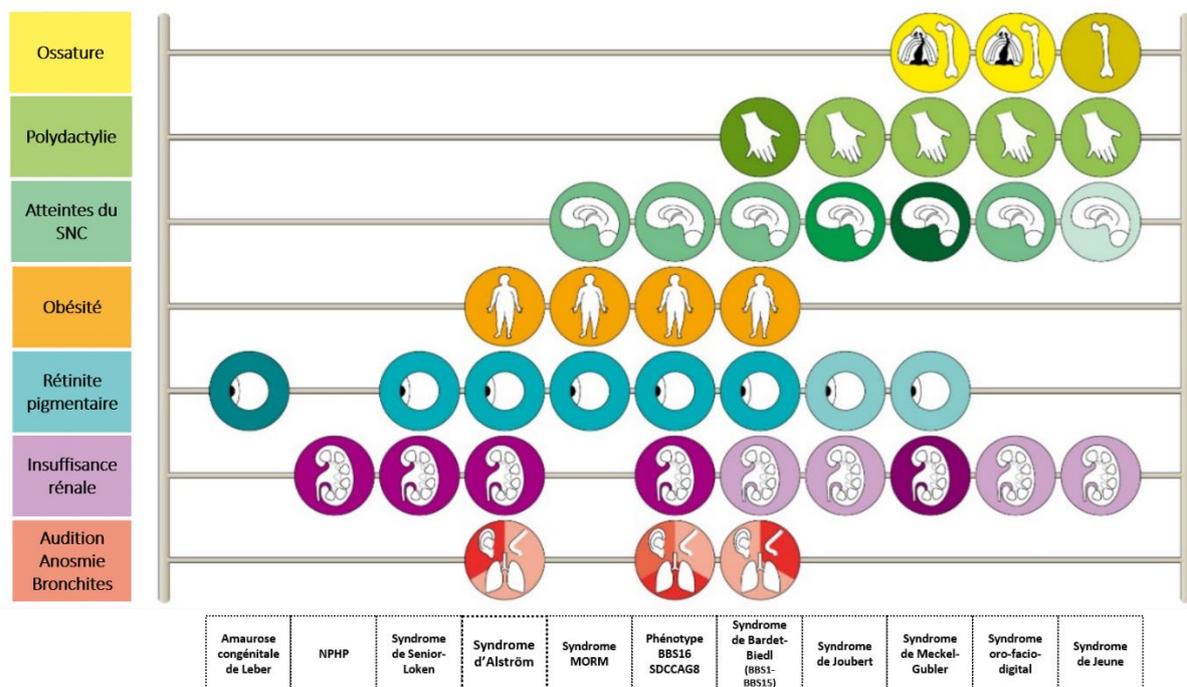
## 1.2.4 Les ciliopathies

### 1.2.4.1 Le syndrome d'Alström, une ciliopathie

Le SA fait partie d'un groupe de pathologies appelé ciliopathies. Les ciliopathies sont des maladies liées à des mutations génétiques qui mènent à l'obtention de protéines dysfonctionnelles entraînant une absence, une malformation ou un dysfonctionnement du cil primaire. Ce dysfonctionnement peut se manifester par une large palette de symptômes tels que la dégénérescence rétinienne, des atteintes rénales ou des anomalies cérébrales. Un certain nombre de ces symptômes sont communs à plusieurs ciliopathies ce qui peut complexifier le diagnostic précis des patients atteints de ciliopathies. Notamment, dans le cas du SA, compte tenu de la variabilité des symptômes d'un patient à l'autre et de la similarité entre le SA et d'autres ciliopathies, un mauvais diagnostic peut être apporté par les médecins. Les diagnostics différentiels de l'Alström peuvent être l'Amaurose Congénitale de Leber (LCA), l'achromatopsie, les pathologies

idiopathiques d'un défaut de la mitochondrie, le syndrome d'Usher, le syndrome de Bardet-Biedl (BBS) et le syndrome de Wolfram avec lesquelles le SA partage des signes cliniques. La **figure 9** présente les symptômes principaux de plusieurs ciliopathies. Il est à noter que les atteintes visuelles sont retrouvées dans un nombre important de ces maladies.

Les ciliopathies étant dues à des dysfonctionnements du cil primaire, le prochain chapitre sera consacré à cette structure.



**Figure 9 : Comparaison des symptômes de plusieurs ciliopathies.** Le SA est principalement caractérisé par une obésité, une rétinite pigmentaire, une insuffisance rénale et des symptômes neurosensoriels. Ces symptômes sont partagés avec d'autres ciliopathies. Adapté d'un document du Pr. H. Dollfus.

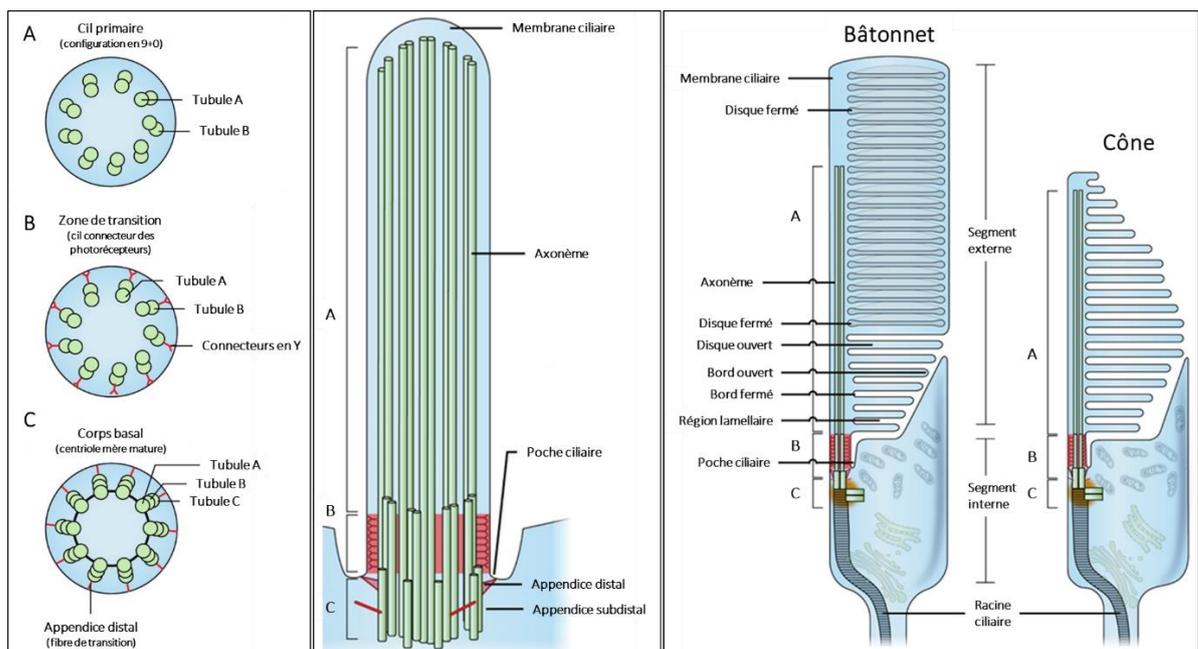
#### 1.2.4.2 Description du cil primaire

Le cil primaire est un organite retrouvé à la surface des cellules (C. Sun, Zhou, et Meng 2021) et qui a été observée dès le 18<sup>e</sup> siècle (Muller 1786; Dobell 1933) puis plus précisément caractérisée en 1968 (S. P. Sorokin 1968; P. Satir 1995). Contrairement aux cils motiles (ou vibratiles) ayant un rôle de moteur et présents en grand nombre dans les cellules épithéliales, les cils primaires sont immobiles et sont considérés comme solitaires, c'est-à-dire qu'ils ne sont présents qu'en un seul exemplaire par cellule (Peter Satir et Christensen 2007).

Le cil primaire est présent à la surface de la plupart des cellules eucaryotes (Wheatley 1995) et est caractérisé par une forte activité de transport intra-flagellaire permettant d'acheminer des cargos au sein et à l'extérieur du cil (Kozminski et al. 1993). D'un point de vue structurel, le cil primaire a une taille comprise entre 1 et 10 µm tandis que son diamètre est de l'ordre de 250-300 nm (Breslow et Holland 2019; T. T. Yang, Chong, et Liao 2016). Le cil primaire est composé d'un squelette qui lui est propre appelé axonème (S. Sorokin 1962) et d'une membrane ciliaire qui est continue avec la membrane plasmique de la cellule (Ishikawa et Marshall 2011).

Le centriole est un organite impliqué dans l'organisation du fuseau mitotique et dans le déroulement de la division cellulaire (Salisbury et al. 2002). Le centre organisateur des microtubules (MTOC ; *microtubule organizing center*) est composé d'un centrosome constitué d'une paire de centrioles, le centriole « mère » et le centriole « fille » liés entre eux de façon perpendiculaire par des fibres d'interconnexion. Autour du centrosome se trouve un réseau amorphe de protéines appelé matière péri-centriolaire (PCM).

Le cil primaire prend racine dans la cellule au niveau du corps basal qui est en réalité un centriole mère mature. Le corps basal est composé de 9 triplets de microtubules (tubules A, B et C), chaque triplet étant lié à un appendice distal et à un nombre variable d'appendices subdistaux. Comme pour les centrioles, les triplets de microtubules constitutifs du corps basal s'organisent sous forme de tonneau hélicoïdal présentant une répétition des triplets de microtubules selon un axe de symétrie radiaire (J. T. Wang et Stearns 2017) (**Figure 10**). L'extrémité proximale des corps basaux est ancrée dans la cellule par des racines ciliaires striées composées de polymères de roolettine, une protéine similaire aux filaments intermédiaires (J. Yang et al. 2002) qui apporte un support structural au cil primaire.



**Figure 10 : Structure du cil primaire.** Les photorécepteurs possèdent un cil connecteur qui est une adaptation de la zone de transition des cils primaires. Adapté de H. Y. Chen et al. 2021.

A l'extrémité distale des corps basaux se trouve la zone de transition, une région où la composition moléculaire de la membrane change, marquant la transition entre la membrane plasmique et la membrane du cil. Dans la zone de transition, les 9 triplets de microtubules deviennent les 9 doublets de microtubules (tubules A et B) qui composent l'axonème et qui sont ancrés à la membrane ciliaire par des connecteurs « en Y » (Reiter, Blacque, et Leroux 2012). Dans les photorécepteurs, la zone de transition est appelée cil connecteur et lie le segment interne au segment externe (**Figure 10**).

L'axonème est la partie centrale du cil primaire. Etant donné sa position distale par rapport au corps basal, comme la zone de transition, il est composé de 9 doublets de microtubules (A et B) selon une configuration appelée « 9+0 ». Cette configuration le distingue du cil motile qui a une configuration en « 9+2 » contenant une paire de microtubules centraux en plus des 9 doublets périphériques. Certains cils primaires possèdent une paire centrale de microtubules, bien qu'immobiles. C'est le cas par exemple de certains cils sensoriels comme les kinocils des cellules ciliées cochléaires ou les neurones sensoriels olfactifs (Ringers, Olstad, et Jurisch-Yaksi 2019; Falk et al. 2015).

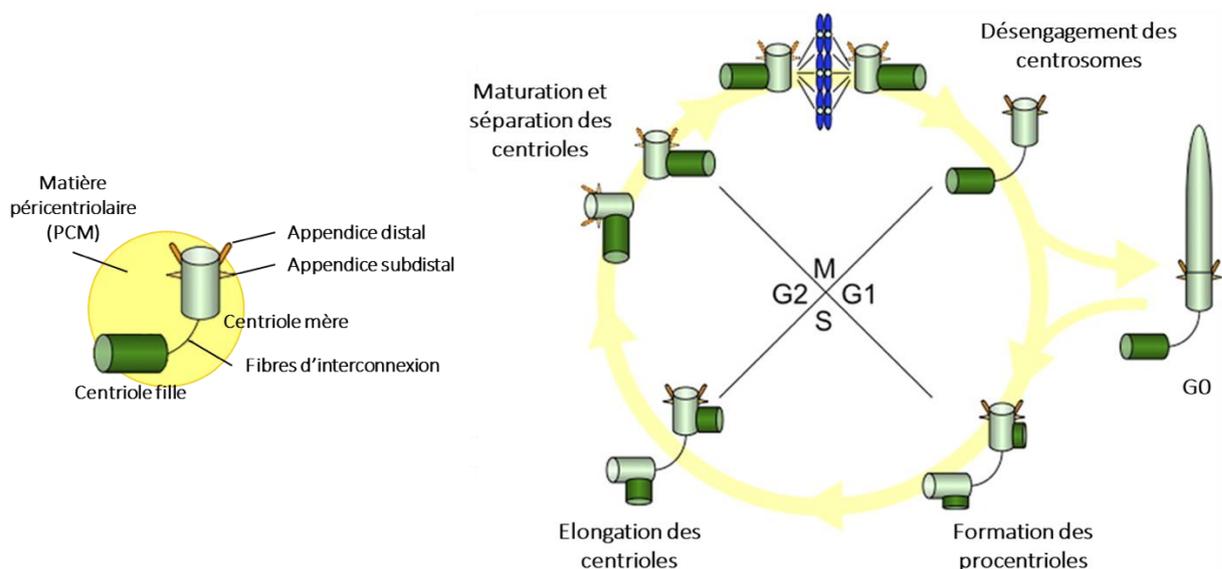
#### *1.2.4.3 Ciliogenèse et désassemblage du cil*

##### *1.2.4.3.1 La ciliogenèse*

La ciliogenèse peut suivre deux voies distinctes, la voie extracellulaire, dans le cas où l'élongation débute à la surface de la cellule et la voie intracellulaire, dans le cas où l'élongation débute dans le cytoplasme (S. Sorokin 1962). La voie extracellulaire a été observée au sein des cellules épithéliales polarisées rénales et pulmonaires tandis

que la voie intracellulaire concerne la plupart des autres cellules, y compris les photorécepteurs (Sedmak et Wolfrum 2011; L. Wang et Dynlacht 2018). Dans la suite de ce chapitre, nous nous attarderons sur la voie intracellulaire d'assemblage du cil primaire.

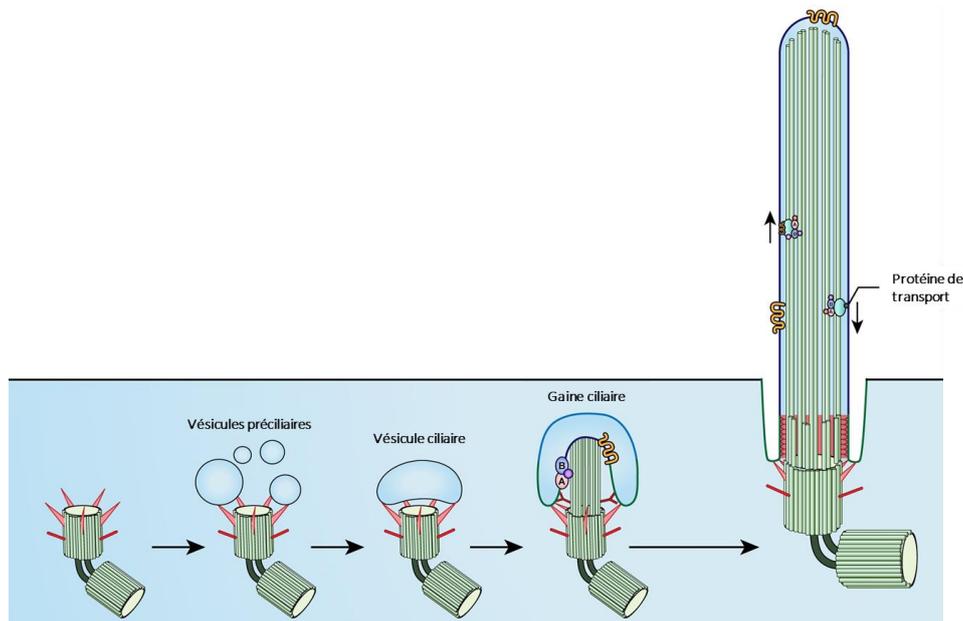
La formation du cil primaire est intrinsèquement liée au cycle cellulaire. La ciliogenèse débute par la maturation du centriole mère en corps basal. Cette étape se déroule lors de la transition des phases G1/S lors de laquelle les centrioles se dupliquent (**Figure 11**). Lors de cette phase, l'assemblage des nouveaux centrioles (procentrioles) est initié à l'extrémité proximale des centrioles mère et fille résultant en l'obtention de deux paires de centrioles (L. Wang et Dynlacht 2018).



**Figure 11 : Cycle cellulaire et ciliogenèse.** Le centrosome est composé de centrioles mère et fille et d'une matrice protéique appelée matière péricentriolaire (PCM). Les procentrioles s'assemblent durant la phase S et continuent leur élongation en phase G2. Les centrioles se séparent et le centriole fille d'origine acquiert des appendices distaux et subdistaux. Après la mitose, les centrioles appariés se désengagent. Lors de la phase G0, le centriole mère migre à la membrane plasmique pour devenir un corps basal et le cil primaire se forme. Adapté de Kobayashi et Dynlacht 2011.

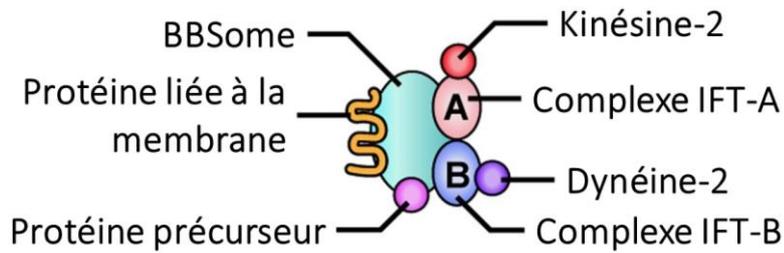
Ces procentrioles poursuivent leur élongation jusqu'à la phase G2 du cycle suivant. Il faut donc 1,5 cycle pour qu'un centriole complète sa maturation (Kobayashi et Dynlacht 2011). Entre la fin de la phase G2 et la phase M, les paires de centrioles se séparent et le centriole fille d'origine complète sa maturation en centriole mère en acquérant des appendices distaux et subdistaux. Les appendices distaux lui permettent de s'ancrer à la membrane plasmique après avoir migré du centre de la cellule vers la surface cellulaire en sortie de mitose, lors de la phase G0 (Tanos et al. 2013).

La première étape de la ciliogenèse à proprement parler se déroule lors de la sortie d'une cellule du cycle cellulaire. A ce moment, le centriole mère de cette cellule engage sa maturation en corps basal. Parallèlement, des vésicules préciliaires (PCV ; *preciliary vesicles*) issues de l'appareil de Golgi et des endosomes de recyclage sont produites et s'amarrent aux appendices distaux (Sánchez et Dynlacht 2016). Après ancrage, ces PCV fusionnent entre elles pour donner naissance à une vésicule ciliaire plus grande (**Figure 12**) (Lu et al. 2015). Ces vésicules contiennent des protéines nécessaires à la maturation du centriole mère en corps basal telles que ARL13B, la protéine à domaine F-BAR Pacsin ou les composants de la cascade GTPase RAB8 et RAB11 (Knödler et al. 2010; Insinna et al. 2019). Ces éléments permettent également de favoriser la croissance de la membrane ciliaire nécessaire à la croissance du cil (Minton et al. 2006; Mukhopadhyay et al. 2017; Schmidt et al. 2012). En plus de l'ancrage de la vésicule ciliaire sur les appendices distaux, les microtubules du centriole mère se retrouvent libérés de CP110, une protéine qui joue le rôle de capuchon sur l'extrémité distale des microtubules pour moduler la ciliogenèse (Yadav et al. 2016).



**Figure 12 : Déroulement de la ciliogenèse.** La ciliogenèse est initiée par l'arrimage de vésicules préciliaires aux appendices distaux des corps basaux. Ces vésicules fusionnent pour donner la vésicule ciliaire. La zone de transition émerge, l'axonème s'allonge et une gaine ciliaire se forme autour du cil en formation. Après élongation du cil, la gaine ciliaire fusionne avec la membrane plasmique, exposant le cil à l'environnement externe. Adapté de H. Y. Chen et al. 2021.

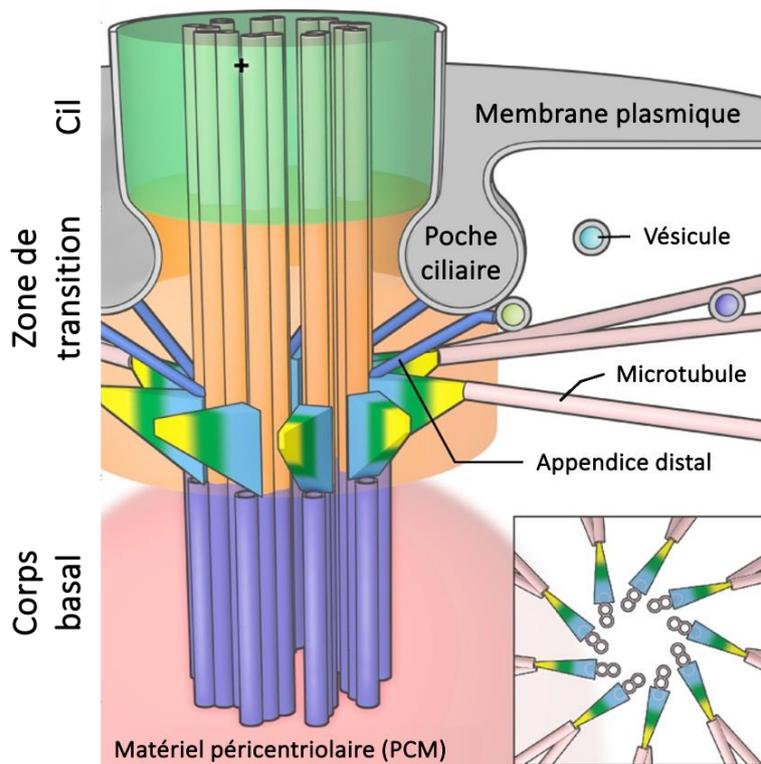
En parallèle à ce phénomène, les complexes protéiques responsables du transport intra-flagellaire (IFT ; *intraflagellar transport*) (**Figure 13**) contenant les protéines motrices dynéine-2 et kinésine-2 et la tubuline sont recrutés aux appendices distaux (Lu et al. 2015). Peu après le recrutement des complexes IFT, la zone de transition du cil primaire apparaît, caractérisée par les connecteurs en Y qui l'ancrent à la membrane ciliaire (Gilula et Satir 1972). Les connecteurs en Y sont des fibres bifides reliant chaque doublet de microtubules à la membrane ciliaire adjacente (Williams et al. 2011; Jensen et al. 2015). Les coupes transversales de connecteurs en Y démontrent l'attache entre une de leur extrémité à l'interface entre les tubules A et B tandis que les deux autres extrémités trouvent leur attache à la membrane ciliaire (Garcia-Gonzalo et Reiter 2017).



**Figure 13 : Composition des complexes IFT.**

*Adapté de H. Y. Chen et al. 2021.*

Peu après la formation de la zone de transition, les microtubules de l'axonème s'allongent avec le transport des protéines ciliaires et des éléments constitutifs de l'axonème tels que la tubuline. La vésicule ciliaire prend la forme d'une gaine ciliaire qui suit la croissance du cil primaire. Enfin, lorsque l'axonème a atteint une taille suffisante, la gaine ciliaire fusionne avec la membrane plasmique exposant ainsi le cil primaire obtenu à l'environnement extracellulaire. Une invagination de la membrane plasmique au niveau de la zone de transition mène à la naissance de la poche ciliaire (**Figure 14**). La croissance de l'axonème se poursuit grâce à l'entrée abondante de tubuline dans le cil en provenance du cytoplasme. Cette entrée se fait par capillarité ainsi que grâce au système de transport intraflagellaire. Ce système peut être de deux formes différentes. Le complexe IFT-A est couplé à la kinésine-2 et permet un transport rétrograde des protéines cargos, c'est-à-dire partant du corps basal et dirigé vers la pointe du cil. Le complexe IFT-B en revanche, est couplé à la dynéine-2 et permet le transport antérograde de la pointe du cil vers le corps basal.



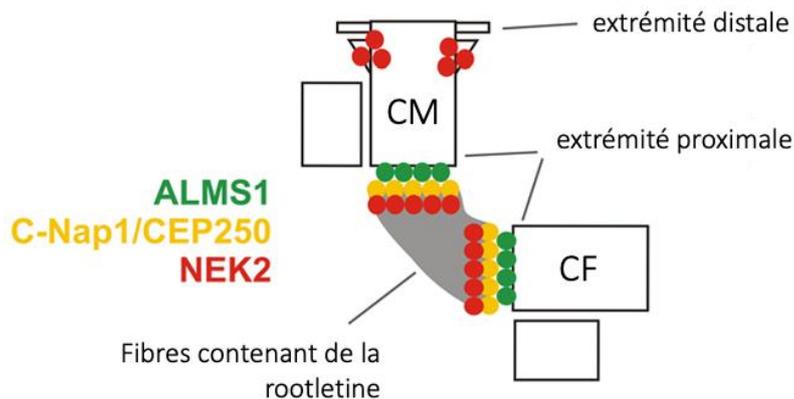
**Figure 14 : Schéma de la zone de transition.**

*Adapté de H. Y. Chen et al. 2021.*

Au niveau du centrosome, la protéine ALMS1 joue un rôle d'ancrage d'autres protéines telles que CEP250 et CEP135 à l'extrémité proximale des centrioles mères et filles (Knorz et al. 2010; K. Kim et al. 2008) (**Figure 15**). L'absence d'ALMS1 entraîne un défaut de cohésion du centrosome mettant en exergue son rôle dans la construction du centrosome (Hearn 2019).

#### 1.2.4.3.2 Le désassemblage du cil primaire

Avant que la cellule n'entre à nouveau dans la phase G1 du cycle cellulaire, le cil primaire doit être désassemblé. Parmi les mécanismes responsables de ce désassemblage on peut tout d'abord citer la déstabilisation et la dépolymérisation des microtubules constituant l'axonème. Ce processus est pris en charge par la kinase mitotique Aurora A et l'histone déacétylase HDAC2 (Pugacheva et al. 2007; Kobayashi et al. 2017).



**Figure 15 : Localisation de la protéine ALMS1 au centrosome.** ALMS1 joue un rôle de protéine d'ancrage à l'extrémité proximale des centrioles. Adapté de Hearn 2019.

Un autre processus impliqué dans le désassemblage du cil est le remodelage de la membrane ciliaire, processus qui se fait principalement au niveau de la poche ciliaire, structure riche en actine et fortement impliquée dans l'endocytose (Phua et al. 2017). En plus de la poche ciliaire, l'extrémité distale du cil subit également une forte activité de remodelage accompagnée d'un événement de « décapitation » du cil. L'endroit précis de la décapitation du cil est déterminé par la distribution du phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate qui induit la polymérisation de l'actine. L'extrémité distale du cil décapité est libérée sous la forme d'ectosomes, des microvésicules produites par ectocytose. Ces ectosomes contiennent les éléments du transport intraflagellaire avec une préférence pour IFT-B comparé à IFT-A. Ceci peut être expliqué par le fait que le retrait d'IFT-B du cil empêche la repousse du cil et donc participe au désassemblage de ce dernier (Phua et al. 2017).

#### 1.2.4.4 Rôles du cil primaire

Contrairement à certains cils motiles qui jouent un rôle de moteur cellulaire et qui permettent à la cellule de se déplacer dans le milieu extracellulaire, le cil primaire ne possède pas la machinerie nécessaire au déplacement de la cellule, notamment la paire centrale de microtubules au milieu des 9 doublets/triplets de microtubules. Jusqu'à récemment, trois hypothèses étaient suggérées quant au rôle du cil primaire. La première hypothèse statue que le cil est vestigial et ne remplit aucun rôle précis au sein de la cellule. Cette hypothèse a été invalidée expérimentalement en montrant que l'absence du cil est à l'origine de différents défauts cellulaires et des ciliopathies. La deuxième hypothèse est que le cil permet de séquestrer le centriole et empêche ainsi la cellule de se diviser. Le cil primaire permettrait donc d'agir comme un régulateur du cycle cellulaire. Cette hypothèse est vraie en un sens puisque la majorité des cellules comportant un cil primaire sont des cellules différenciées sorties du cycle cellulaire ou bien des cellules souches au stade G0 du cycle. Avant de ré-entrer dans le cycle cellulaire et de se diviser, la cellule doit subir le désassemblage de son cil. Néanmoins, la régulation du cycle cellulaire n'est pas la fonction principale du cil primaire et la troisième hypothèse fait du cil primaire une structure sensorielle cellulaire avant tout. En effet, le cil primaire est très impliqué dans les processus de signalisation cellulaire, notamment en raison du nombre important de récepteurs, de canaux à ions et de protéines de transport localisées dans le cil. Cette signalisation permet de coordonner des processus clés du développement mais également de participer au maintien de l'homéostasie en régulant la migration cellulaire, la différenciation, la division ou l'apoptose des cellules. Les stimuli auxquels répondent les cils primaires peuvent être de type mécanique dans le cas où le cil est courbé par l'environnement extracellulaire ou chimique lorsque les récepteurs situés dans le cil sont au contact d'un ligand spécifique

tel qu'un facteur de croissance, une hormone ou un morphogène (Spasic et Jacobs 2017; Peter Satir, Pedersen, et Christensen 2010). Les cils primaires peuvent activer des voies de signalisation telles que les voies Hedgehog ou Wnt. En effet, il a été montré que les cils primaires peuvent inhiber la voie Wnt (Anvarian et al. 2019) et que des protéines du cil, notamment le complexe IFT-A sont nécessaires à la voie Wnt (Niehrs, Silva, et Seidl 2024). De plus, plusieurs protéines impliquées dans la transduction de signaux dans la voie Wnt telles que DVL et GSK3 sont localisées au cil primaire (Anvarian et al. 2019). Les cils primaires peuvent également réagir à des stimuli lumineux, notamment dans le cas des photorécepteurs (Insinna et Besharse 2008), à des changements de température (Kuhara et al. 2008) ou d'osmolarité (Christensen et al. 2005) et encore à des variations de gravité (Moorman et Shorr 2008).

## **1.3 LES MODELES D'ETUDE DU SYNDROME D'ALSTRÖM**

### **1.3.1 Les modèles animaux du SA**

#### *1.3.1.1 Les modèles murins du SA*

L'étude des patients atteints du SA présente un nombre important de limitations. Notamment, la rareté de la maladie rend difficile la réunion d'un échantillon suffisamment grand pour des études de recherche significatives. Des méta-analyses ont été menées comme vu à la partie 1.2.3.4 mais ces études présentent elles-mêmes des limitations. L'hétérogénéité et la complexité du SA rendent également difficile la caractérisation précise de la condition et la compréhension de l'ensemble de ses effets. Enfin, comme pour un nombre important de maladies rares, l'obtention de ressources permettant d'étudier le SA représente un défi.

C'est pourquoi, la recherche nécessite l'usage de modèles récapitulant l'organisation du corps humain ainsi que les principales caractéristiques des maladies. La souris (*Mus musculus*) s'est imposée comme un modèle de qualité compte tenu des similarités entre sa physiologie et celle de l'Homme. En effet, la souris partage 70% des gènes codants des protéines chez l'Homme. Dans le contexte de notre étude, il est intéressant de noter que le génome de la souris possède un gène *Alms1* orthologue au gène *ALMS1* humain. De plus, c'est un petit animal ayant un temps de génération court et une durée de vie accélérée ce qui apporte un avantage logistique certain. Enfin, les techniques actuelles permettent de créer presque toutes les mutations possibles et de les intégrer au sein du génome murin (Norris et Grimes 2012).

A l'heure actuelle, il existe 6 modèles murins du SA. La première lignée ayant été produite est la lignée *Alms1<sup>GT(pGT1Lxf)/Pjn</sup>* (parfois dénommée *Alms1<sup>Gt(XH152)Byg</sup>*) (G.B. Collin et al. 2005). Cette lignée a été obtenue par « piégeage de gène » (*gene trapping*), une technique visant à introduire des mutations d'insertion au sein du génome d'un organisme (Stanford, Cohn, et Cordes 2001). Dans le cas de ces souris, l'insertion se trouve dans l'intron 13, à 1,97kb en aval de l'exon 13. Cette mutation mène à l'obtention d'une protéine tronquée et mime donc les mutations les plus fréquemment retrouvées chez les patients, à savoir les mutations entraînant une terminaison prématurée de la protéine. Les souris *Alms1<sup>Gt(XH152)Byg</sup>* présentent une obésité caractérisée par une masse corporelle plus élevée que les souris *Alms1<sup>WT/WT</sup>* et une quantité plus importante de tissu adipeux blanc. Par ailleurs, les souris mâles sont atteintes de diabète de type II tandis que les femelles en sont épargnées. Le foie de ces souris est également plus lourd et présente des dépôts de lipides micro- et macro-vésiculaires. De plus, ces souris présentent un hypogonadisme et une atrophie des tubes séminifères. Les reins de ces souris sont élargis et présentent une dilatation des tubes proximaux rénaux ainsi qu'une inflammation et une vacuolisation du rein. Ensuite, les souris *Alms1<sup>Gt(XH152)Byg</sup>*

présentent une dégénération de la rétine caractérisée par un amincissement de la CNE, un raccourcissement des segments internes et externes des photorécepteurs et une baisse de la réponse à des stimuli lumineux. La rhodopsine est localisée au niveau des noyaux des photorécepteurs dans la CNE au lieu d'être localisée dans les segments externes au niveau de la couche des photorécepteurs. De plus, des vésicules s'accumulent au niveau du cil connecteur, dans la partie distale des segments internes des photorécepteurs. Il est à noter que les cils cellulaires de ces souris semblent être structurés normalement. Les souris *Alms1<sup>Gt(XH152)Byg</sup>* récapitulent donc bien certains symptômes du SA tels que l'obésité, l'hypogonadisme et la dégénérescence de la rétine. Néanmoins, ce modèle murin présente certaines limitations, notamment le fait que seules les souris mâles présentent un diabète de type II ou encore le fait que l'obésité n'apparaissent qu'à partir de 8 à 12 semaines tandis que chez l'humain, ce symptôme est l'un des tous premiers à se manifester. De plus, en dehors de l'hypogonadisme qui est mentionné, les recherches menées sur *Alms1<sup>Gt(XH152)Byg</sup>* ne détaillent pas les atteintes des capacités reproductives des souris, du poids des appareils génitaux ou des niveaux des hormones reproductrices.

Par la suite, une autre lignée de souris modèle a été développée, la « *fat aussie* » (*Alms1<sup>foz/foz</sup>*) (Arsov et al. 2006). Contrairement à *Alms1<sup>Gt(XH152)Byg</sup>* qui est le fruit d'une manipulation génétique volontaire, *Alms1<sup>foz/foz</sup>* est la résultante d'une mutation récessive spontanée ayant eu lieu au sein d'une colonie de souris diabétiques non obèses. Un séquençage d'*Alms1<sup>foz/foz</sup>* a permis d'identifier une délétion de 11 paires de bases dans l'exon 8 d'*ALMS1*. Cette délétion entraîne un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon STOP précoce, éliminant ainsi les deux tiers de la protéine à l'extrémité C-terminale. Comme les souris *Alms1<sup>Gt(XH152)Byg</sup>*, les souris de la lignée *Alms1<sup>foz/foz</sup>* développent une hyperphagie et par conséquent ont une masse corporelle plus importante que les souris *Alms1<sup>WT/WT</sup>*. Les souris mâles et femelles développent

un diabète de type II et une hyperglycémie bien que dans le cas des souris femelles, l'apparition du diabète soit légèrement plus tardive que pour les mâles. Toutes les souris *Alms1<sup>foz/foz</sup>* ont un niveau de cholestérol plus élevé de moitié comparé aux lignées de souris non mutées. Les analyses histologiques de ces souris dévoilent des foies élargis et blanchâtres ainsi qu'une stéatose hépatique. Les testicules des souris *Alms1<sup>foz/foz</sup>* mâles sont réduits aux deux tiers et toute tentative de reproduction des souris mâles est vaine. En revanche, les jeunes souris *Alms1<sup>foz/foz</sup>* femelles sont fertiles bien que la taille de leurs portées soit réduite. Les souris femelles deviennent stériles avec l'apparition du diabète. Enfin, une atteinte auditive est constatée chez les souris *Alms1<sup>foz/foz</sup>* les plus âgées. Une autre étude réalisée sur les souris *Alms1<sup>foz/foz</sup>* a montré que ces dernières présentent une réduction du nombre de neurones hypothalamiques ciliés (Heydet et al. 2013). Cette lignée de souris modèle récapitule donc bien les symptômes du SA liés au métabolisme, notamment le diabète. Une étude de 2019 rapporte que bien que les souriceaux *Alms1<sup>foz/foz</sup>* âgés de 1 mois ne présentent pas de différence au niveau de la rétine comparés avec des souriceaux sains, à 1 an, les souris *Alms1<sup>foz/foz</sup>* ont une rétine amincie, notamment au niveau des segments externes et internes des photorécepteurs et de la CNE (Brun et al. 2019). Cette observation est accompagnée d'ERG plats chez les souris *Alms1<sup>foz/foz</sup>* âgées d'un an et indique une dégénération rétinienne lente chez ces souris. Des analyses au microscope électronique à transmission ont révélé un épaissement des segments externes des photorécepteurs et la présence de vacuoles au sein du cytoplasme de ces cellules. De plus, le cil connecteur des photorécepteurs des souris *Alms1<sup>foz/foz</sup>* ne semble pas présenter de défaut structurel et compte tenu de la présence de rhodopsine dans les segments externes des photorécepteurs, les auteurs de l'étude concluent que le transport de la rhodopsine dans le cil connecteur n'est pas altéré.

Une autre lignée de souris modèle, la lignée *Alms1*<sup>L2131X/L2131X</sup> a été identifiée par criblage d'une population traitée à l'ENU (*N-ethyl-N-nitrosourea* ; N-nitroso-N-éthylurée) (G. Li et al. 2007). L'ENU est un agent mutagène utilisé pour induire des mutations ponctuelles chez la souris (Russell et al. 1979; Stottmann et Beier 2014). Dans le cas de la lignée *Alms1*<sup>L2131X/L2131X</sup>, la mutation obtenue par cette méthode est une mutation non-sens située dans l'exon 10 d'*Alms1*. Cette mutation non-sens est censée mener à l'obtention d'une protéine tronquée d'une taille de 2131 acides aminés au lieu des 4169 acides aminés de la protéine sauvage. Les souris de la lignée *Alms1*<sup>L2131X/L2131X</sup> présentent une obésité caractéristique du SA, un diabète de type II, une malformation des spermatozoïdes et une stéatose rénale. Les atteintes auditives des souris *Alms1*<sup>L2131X/L2131X</sup> n'ont pas été explorées mais ces souris présentent néanmoins une déficience visuelle notamment due à un transport défectueux de la rhodopsine.

La lignée de souris modèle *Alms1*<sup>flin/flin</sup> a été obtenue plus récemment à l'aide du système Cre-LoxP. Le système de recombinaison Cre-LoxP est une technique de génie génétique qui utilise l'enzyme Cre pour induire des réarrangements précis de l'ADN en ciblant des séquences spécifiques appelées sites Lox (Metzger et Chambon 2001). Dans le cas de la lignée *Alms1*<sup>flin/flin</sup>, ce système a été utilisé pour intégrer une cassette contenant le gène codant la  $\beta$ -galactosidase, le gène de résistance à la néomycine, une séquence de recombinaison FRT et des sites LoxP entre les exons 6 et 7 d'*Alms1* (Geberhiwot et al. 2021). Les souris de cette lignée deviennent obèses dans leurs 3 premiers mois et présentent une hyperglycémie à jeun, une hypertrophie des adipocytes, une intolérance au glucose et une résistance à l'insuline. Si les atteintes métaboliques ont été explorées dans cette lignée, ce n'est pas le cas des atteintes neurosensorielles, rénales, hépatiques ou cardiaques. De plus, les études menées sur cette lignée n'ont pas permis d'élucider les mécanismes permettant de comprendre comment la perte de fonction d'*Alms1* provoque l'obésité (Kang 2021).

Enfin, le programme de recherche «*Translational Vision Research Models* » (modèles de recherche translationnelle sur la vision ; TVRM) visant à produire un nombre important de lignées de souris modélisant des pathologies oculaires a permis de générer la lignée *Alms1<sup>tvrm102</sup>* parmi d'autres lignées modèles (Krebs et al. 2017). Comme la lignée *Alms1<sup>L2131X/L2131X</sup>*, la lignée *Alms1<sup>tvrm102</sup>* a été obtenue par administration d'ENU à des souris C57BL/6, une lignée communément utilisée comme modèle de maladies humaines. Ce traitement à l'ENU provoque une mutation T→C dans le site donneur d'épissage de l'exon 6. Cette mutation permet de démasquer un site cryptique 120 bases en aval. Un site cryptique est un site d'épissage qui n'est pas détectable dans le pré-ARNm de type sauvage à moins qu'une mutation ailleurs dans le gène vienne le démasquer et lui permette d'être sélectionné (Roca, Sachidanandam, et Krainer 2003). Les souris *Alms1<sup>tvrm102</sup>* présentent une prise de poids anormale qui débute entre 8 et 12 semaines après la naissance. En dehors des symptômes relatifs à l'obésité, ces souris ont majoritairement été étudiées pour leurs atteintes visuelles. En effet, ces souris présentent un EPR anormalement granuleux et incluant des petites taches blanches. La CNE de la rétine des souris *Alms1<sup>tvrm102</sup>* est amincie et les photorécepteurs dégénèrent progressivement jusqu'à ce que seuls 25% des photorécepteurs ne subsistent à 18 mois. De plus, ces souris présentent une mauvaise localisation de la rhodopsine dans les photorécepteurs. Ces souris semblent donc être un modèle adéquat pour l'étude des symptômes visuels du SA sans pour autant exclure les autres symptômes tel que l'obésité.

L'article décrivant la lignée *Alms1<sup>tvrm102</sup>* fait aussi mention de la lignée *Alms1<sup>m1Btlr</sup>*, une lignée mutée par traitement à l'ENU. La mutation observée chez ces souris est une mutation non-sens dans l'exon 8 d'*ALMS1* (« *Alms1<m1Btlr> Chemically induced Allele Detail MGI Mouse (MGI:5619129)* », s. d.) Aucune information n'a été trouvée dans la littérature concernant la caractérisation de cette lignée.

Le rat (*Rattus norvegicus*) est une autre espèce utilisée en tant que modèle de recherche. Bien qu'environ dix fois plus grand que la souris, le rat est un animal de petite taille, physiologiquement proche de l'Homme et donc particulièrement adapté aux études sur les maladies génétiques (Lee, Sung, et Baek 2018).

Dans un article de 2018, une équipe a généré une lignée de rat *ALMS1*-KO en injectant des nucléases à doigt de zinc ciblant l'exon 1 du gène *ALMS1* au sein d'embryons de rats (Jaykumar et al. 2018). Cette édition mène à une délétion de 17 paires de bases et à un décalage du cadre de lecture entraînant l'apparition d'un codon STOP précoce dès l'exon 2 et donc à un arrêt de la synthèse d'*ALMS1*. Les rats ainsi obtenus ne présentent pas de différence notable avec des rats non mutés avant l'âge de 12 semaines. Plus tardivement, ces rats présentent une hypertension et une plus grande sensibilité à une forte consommation de sel comparé aux rats sauvages.

#### 1.3.1.2 Les modèles félins du SA

Le sphynx est une race de chat (*Felis catus*) domestique peu commune caractérisée par une quasi-absence de fourrure. Bien que cette race ait principalement été étudiée pour les maladies de la peau et pour la dystrophie musculaire, des études portant sur des maladies cardiaques telles que la cardiomyopathie hypertrophique ont été rapportées (Chetboul et al. 2012). Les cardiomyopathies étant un des symptômes majeurs du SA, des études plus récentes ont cherché à établir un lien entre des mutations dans le gène *Alms1* félin et des défauts cardiaques chez le sphynx. Une première étude a permis d'identifier une mutation ponctuelle G>C dans l'exon 12 du gène *Alms1* félin, équivalent de l'exon 13 humain (Meurs et al. 2021). Cette mutation a été associée à la présence d'une cardiomyopathie hypertrophique dans la population de sphynx étudiée. Ceci peut être expliqué par une activité nucléaire proliférative des myocytes plus

importante chez les chats porteurs de la mutation comparée à celle des chats contrôles. Étant donné le rôle supposé d'*Alms1* dans la régulation du cycle cellulaire, il semblerait que la cardiomyopathie hypertrophique soit due à une altération de l'arrêt du cycle cellulaire des myocytes. Néanmoins, les limites de cette étude résident dans le fait que les patients SA développent une cardiomyopathie dilatée et non hypertrophique comme les sphynx. De plus, bien que le SA soit une maladie multi-systémique, les sphynx porteurs de la mutation ne semblent présenter que des atteintes cardiaques et non des atteintes visuelles, auditives, etc... Il est important de préciser que ces chats sont porteurs de cette mutation de façon hétérozygote tandis que les patients humains sont homozygotes. Cette différence de contexte génétique peut expliquer la différence de phénotype observée chez ces chats. D'autres études sur des populations de sphynx ont permis d'identifier d'autres variants d'*ALMS1* causant des symptômes cardiaques similaires au SA (Turba et al. 2023). Une étude récente démontre que les mutations responsables des symptômes similaires à ceux du SA chez le chat ne sont pas exclusives au sphynx mais peuvent être retrouvées dans d'autres races tels que le Scottish Fold et l'Exotic Shorthair (Akiyama et al. 2023).

#### 1.3.1.3 *Le poisson-zèbre modèle du SA*

Le poisson-zèbre (*Danio rerio*) est un petit poisson couramment utilisé comme organisme modèle de maladies génétiques. Il apparaît comme un modèle privilégié pour l'étude du SA en raison des techniques simples pour altérer ses gènes qui permettent de créer des modèles reproduisant des mutations pathologiques retrouvées chez l'humain. De plus, sa transparence à l'état larvaire facilite l'observation des organes internes, offrant ainsi un aperçu direct des manifestations pathologiques. Enfin, le cycle de vie court du poisson-zèbre et sa reproduction rapide sont des atouts pour

la recherche, tandis que sa facilité de manipulation et de maintenance en laboratoire en font un modèle pratique pour la recherche (Irion, Krauss, et Nüsslein-Volhard 2014; Howe et al. 2013). Une lignée de poisson-zèbres modélisant le SA a été obtenue en injectant la protéine Cas9 et des ARN guides ciblant l'exon 4 du gène *alms1*, équivalent d'*ALMS1* humain chez le poisson-zèbre dans des embryons au stade unicellulaire (Nesmith et al. 2019). La lignée de poisson-zèbres choisie est une lignée transgénique dont les cellules  $\beta$ , des cellules endocrines, expriment la protéine fluorescente mCherry sous l'action du promoteur de la préproinsuline, un précurseur de l'insuline. Le système CRISPR/Cas9 provoque une délétion de 7 paires de bases dans l'exon 4 d'*alms1* menant à un décalage du cadre de lecture induisant un codon STOP précoce. Les poissons *alms1*<sup>-/-</sup> ainsi obtenus survivent jusqu'au stade adulte et peuvent donner naissance à des progénitures viables. Néanmoins, ces progénitures présentent une queue recourbée caractéristique des poisson-zèbres mutés dans les gènes du cil primaire. Les poissons *alms1*<sup>-/-</sup> présentent des cœurs de plus petite taille que ceux des poissons contrôles ainsi que des œdèmes cardiaques. La rétine des poissons *alms1*<sup>-/-</sup> est nettement dégradée et amincie, notamment au niveau de la couche des photorécepteurs. Les électrorétinogrammes (ERG) réalisés sur les poissons *alms1*<sup>-/-</sup> montrent que les photorécepteurs ne réagissent pas aux stimuli lumineux autant que des photorécepteurs de poissons contrôles. De plus, les poissons *alms1*<sup>-/-</sup> manifestent une mobilité réduite et une baisse de la recherche de nourriture, deux signaux d'une perte de la vue. Les reins des poissons *alms1*<sup>-/-</sup> sont également atteints puisqu'ils présentent une dégradation et une dilatation des tubules proximaux et distaux. Les poissons *alms1*<sup>-/-</sup> manifestent également des troubles métaboliques mis en évidence par une prise de poids anormale, par des dépôts de graisse excessifs et par une hypertrophie hépato-pancréatique. Enfin, les réponses moléculaires à l'insuline et au glucose sont impactées chez les poissons *alms1*<sup>-/-</sup>. En conclusion, le poisson-zèbre *alms1*<sup>-/-</sup> semble récapituler un nombre

important de symptômes du SA et pourrait permettre d'approfondir nos connaissances sur la mécanique moléculaire de la maladie.

#### 1.3.1.4 La drosophile modèle du SA

La mouche du vinaigre ou mouche drosophile (*Drosophila melanogaster*) est un insecte fréquemment utilisé comme modèle pour étudier divers processus biologiques et pathologiques, y compris les maladies génétiques humaines.

La drosophile possède deux gènes homologues à *ALMS1*, CG12179 (*alms1a*) et CG12184 (*alms1b*). Une étude de 2020 visant à élucider le rôle d'*alms1* dans la duplication des centrioles chez la drosophile a permis de mettre au point plusieurs lignées de drosophiles mutées dans *alms1a* (C. Chen et Yamashita 2020). La première lignée de cette étude est *UAS-alms1<sup>RNAi</sup>* dont l'expression d'*alms1a* est éteinte par un ARN interférent. La duplication des centrioles est compromise dans les cellules germinales des drosophiles de cette lignée les rendant ainsi stériles. Deux autres lignées, *UAS-alms1a-EGFP* et *UAS-alms1a-VNm9* permettent de suivre l'expression d'*alms1a* dans différents types cellulaires.

Une seconde étude présente un modèle de drosophile dans lequel *alms1a* et *alms1b* sont ciblés par CRISPR/Cas9 entraînant de larges délétions au sein de ces deux gènes. Le mutant KO ainsi obtenu est appelé *alms1<sup>2</sup>* (Hou, Wu, et Wei 2023). Les mouches *alms1<sup>2</sup>* sont viables et se déplacent en volant et en marchant de façon normale contrairement à ce qui est habituellement observé chez les mouches ayant des défauts du cil. De plus, les mouches *alms1<sup>2</sup>* ne présentent pas d'atteintes de la vision, du toucher ou de l'odorat. Contrairement aux mouches *UAS-alms1RNAi*, les cellules germinales des mouches *alms1<sup>2</sup>* ne présentent pas de perte du centrosome. Néanmoins, les paires de centrioles mère-fille sont anormalement « désengagées » dans les spermatocytes des mouches *alms1<sup>2</sup>* en méiose. De même, des fuseaux multipolaires et

une mauvaise séparation des chromosomes sont également observés dans les spermatocytes des mouches modèles. Par ailleurs, la fertilité des drosophiles mâles est atteinte compte tenu de défauts de construction du flagelle des spermatozoïdes, une structure ressemblante au cil primaire. La même étude de 2023 mentionne la création de deux souches de drosophiles mutantes auxquelles on retire uniquement l'extrémité C-terminale des protéines codées par les gènes *alms1a* et *alms1b*. Ces mouches modèles sont appelées *Alms1a*ΔCT-GFP et *Alms1b*ΔCT-GFP et permettent de mesurer l'importance du motif ALMS situé à l'extrémité C-terminale des protéines *alms1*. La souche *Alms1a*ΔCT-GFP présente une expression d'*alms1a* correctement localisée mais fortement réduite tandis que la souche *Alms1b*ΔCT-GFP présente dans 50% des cas des aberrations telles qu'une distribution irrégulière dans le centriole, une faible intensité de signal voire une perte totale de la localisation centriolaire.

Le tableau donné en annexe récapitule les différents animaux modèles du SA et leurs atteintes au niveau de plusieurs organes.

### 1.3.2 Les cellules permettant l'étude du SA

#### 1.3.2.1 Les cellules non-humaines

Dans un premier temps nous allons nous pencher sur des cellules d'origine animale qui permettent d'éclairer les mécanismes sous-jacents au SA.

Tout d'abord, une étude de 2014 s'est intéressée à l'impact d'un *knockdown* d'*Alms1* au sein de cardiomyocytes de souris néonatales, de fibroblastes cardiaques de souris et de cellules dérivées de cellules souches embryonnaires murines (mESC ; *murine embryonic stem cells*) (Shenje et al. 2014). Dans cette étude, le *knockdown* d'*Alms1*

entraîne une augmentation de la prolifération des cardiomyocytes et une augmentation du cycle cellulaire mis en évidence par une hausse du nombre de cellules en phase G2/M.

Deux autres études, datant de 2008 et de 2010 se sont penchées sur des lignées de préadipocytes de souris. L'une de ces études s'est intéressée à l'expression de différents gènes dont *Alms1* dans la lignée de préadipocytes de souris 3T3-L1 (Romano et al. 2008) tandis que la seconde s'est intéressée à l'effet d'un *knockdown* d'*Alms1* réalisé à l'aide de *short hairpin RNAs* (shRNA ; petit ARN en épingle à cheveux) ciblant les exons 4 et 10 d'*Alms1*, toujours au sein des 3T3-L1 (Huang-Doran et Semple 2010). Les résultats de cette étude montrent que les préadipocytes mutés ont une plus faible capacité à se différencier en adipocytes comparé aux cellules saines. Les mécanismes de cette caractéristique ne sont pas établis mais l'étude émet l'hypothèse que le gène *Alms1* murin joue un rôle dans la modulation de l'adipogenèse. *Alms1* est fortement exprimé dans les préadipocytes et son expression décline lors de la différenciation en adipocytes matures et c'est ce déclin qui permet la prolifération des adipocytes. Ainsi, l'absence du gène chez les souris mutées dérégule l'adipogenèse et contribue alors au développement de l'obésité.

Enfin, une dernière étude s'est intéressée à l'impact d'une extinction d'*ALMS1* à l'aide de siRNA au sein d'une lignée murine de cellules de rein utilisée pour l'étude de la ciliogenèse et des voies de signalisation du cil primaire (G. Li et al. 2007). En plus de la perte d'expression d'*Alms1* endogène, les cellules mutées présentent un cil primaire morphologiquement différent des cellules saines. En effet, ceux-ci affichent une accumulation d'acétyl-tubuline à la membrane ainsi qu'une élongation accrue lorsque les cellules arrivent à confluence.

En conclusion, assez peu d'études se sont penchées sur l'analyse de lignées cellulaires non-humaines dans le contexte du SA. Néanmoins, en plus de ces études, la

littérature fait état de plusieurs types cellulaires issus de patients ayant été caractérisés dans le but d'étudier le SA. Le paragraphe suivant a pour but de présenter ces différentes études.

#### 1.3.2.2 *Les cellules humaines*

Une première étude de 2005 décrit l'étude de fibroblastes issus de patients atteints du SA (Hearn et al. 2005). Cette étude a mis en évidence l'absence d'expression d'*ALMS1* dans ces cellules à l'aide d'expériences d'immunofluorescence utilisant un anticorps ciblant le domaine de répétitions en tandem (TRD). Toujours par des expériences d'immunofluorescence, cette étude montre que les fibroblastes de patients expriment l' $\alpha$ -tubuline, la  $\gamma$ -tubuline et l' $\alpha$ -tubuline acétylée de façon comparable aux fibroblastes issus d'individus sains prouvant ainsi que le cil primaire se forme normalement. De plus, cette étude a mis en évidence le fait que l'appareil de Golgi n'est pas altéré dans les cellules de patients et que ces dernières ne présentent pas une dérégulation des mécanismes d'apoptose.

Une seconde étude de 2017 a permis de comparer les fibroblastes issus d'une cohorte de 23 patients atteints du SA et présentant différentes mutations pathologiques. Ces dernières sont des mutations non-sens, des mutations provoquant un décalage du cadre de lecture et des mutations faux-sens (J. Chen et al. 2017). Dans cette étude, l'expression d'*ALMS1* est variable en fonction des mutations de chaque patient. En revanche, les fibroblastes des patients étudiés partagent tous le fait de présenter un cil primaire normalement développé ainsi que des voies de signalisation Hedgehog et PDGFA non altérées.

Enfin, l'étude de Eintracht et al. en 2021 confirme que le cil n'est pas détérioré dans les fibroblastes de patients. En revanche les fonctions liées au cil primaire telles

que le transport intra-flagellaire et le trafic de protéines sont altérées comme le prouve l'absence d'expression d'*IFT88* et de *SSTR3* dans les fibroblastes de patients. Cette étude identifie deux composés permettant de restaurer l'expression d'*ALMS1*, d'*IFT88* et de *SSTR3* dans les cellules de patients, pavant la voie à une potentielle thérapie future.

Dans un article publié en 2023, une équipe s'est intéressée aux cellules souches et aux progéniteurs hématopoïétiques (*hematopoietic stem/progenitor cells* ; HSPC) circulants (Dassie et al. 2023). Ces types cellulaires ont une responsabilité dans les symptômes du diabète et dans les atteintes cardiaques et du métabolisme (Fadini et al. 2010; Fadini et Albiero 2022; Rigato, Avogaro, et Fadini 2016). Cette étude a mis en évidence que les patients SA ont une réduction notable du nombre de HSPC circulants dans leur sang et que cette réduction s'accroît avec le temps. Ce phénotype peut expliquer la détérioration du métabolisme chez les individus atteints par le SA.

Une étude de 2017 portant sur des lignées de cellules du lymphome de Hodgkin (HL) a montré que ces cellules présentent une expression génique différentielle comparées à des HSPC (Braune, Volkmer, et Staeger 2017). Le gène *ALMS1* se trouvant dans la liste des gènes exprimés de façon différentielle, son expression a été étudiée plus en profondeur. Les résultats de cette étude montrent que les différentes lignées HL expriment des variants d'*ALMS1* se distinguant par la présence ou l'absence de certains exons tels que les exons 1, 2 et 13. Notamment, cette étude met en évidence qu'aucun variant d'*ALMS1* ne comporte à la fois l'exon 1 et l'exon 2 du gène, suggérant l'existence d'un promoteur alternatif en amont de l'exon 2 comme l'indique une analyse effectuée à l'aide de l'outil *Neural Network Promoter Analysis tool*.

Dans une étude de 2022, une équipe a réalisé un KO (*knock-out*) d'*ALMS1* dans des cellules HeLa en ciblant les exons 1 et 3 du gène à l'aide de CRISPR/Cas9 (Bea-Mascato et al. 2022). Ce modèle cellulaire humain a permis d'observer que la déplétion

d'*ALMS1* entraîne un arrêt du cycle cellulaire, une résistance à l'apoptose accrue ainsi qu'une réduction de la capacité migratoire des cellules HeLa.

Dans une première étude publiée en 2007, une équipe s'est intéressée aux effets d'une déplétion par siRNA de plusieurs gènes impliqués dans la ciliogenèse dans une lignée humaine immortalisée de cellules de l'EPR, les hTERT-RPE1 (Graser et al. 2007). Selon cette étude, la déplétion d'*ALMS1* mène à la formation de cils allongés et à la morphologie anormale. Ces résultats ont été confirmés par une seconde étude, publiée en 2021 (Álvarez-Satta et al. 2021). Cette étude met également en évidence une mauvaise régulation de la voie de signalisation TGF- $\beta$  dans les hTERT-RPE1 traitées avec les siRNA.

Le rôle d'*ALMS1* a ensuite été étudié dans un autre article paru en 2024. Pour ce faire, l'équipe de recherche a inséré une étiquette GFP (*green fluorescent protein* ; protéine fluorescente verte) dans la partie C-terminale de la protéine *ALMS1* au sein de cellules de la lignée hTERT-RPE1 ainsi que dans des cellules HEK293T (*human embryonic kidney* ; cellules de rein embryonnaire humain) dans le but d'étudier les interactions d'*ALMS1* avec d'autres protéines (Woerz et al. 2024). Ces expériences ont établi qu'*ALMS1* interagit avec la protéine CEP70. Cette étude présente également une expérience de KO d'*ALMS1* dans les hTERT-RPE1. Contrairement à ce qui a été publié dans les papiers précédents, les chercheurs ont observé un léger raccourcissement du cil primaire dans les cellules mutées.

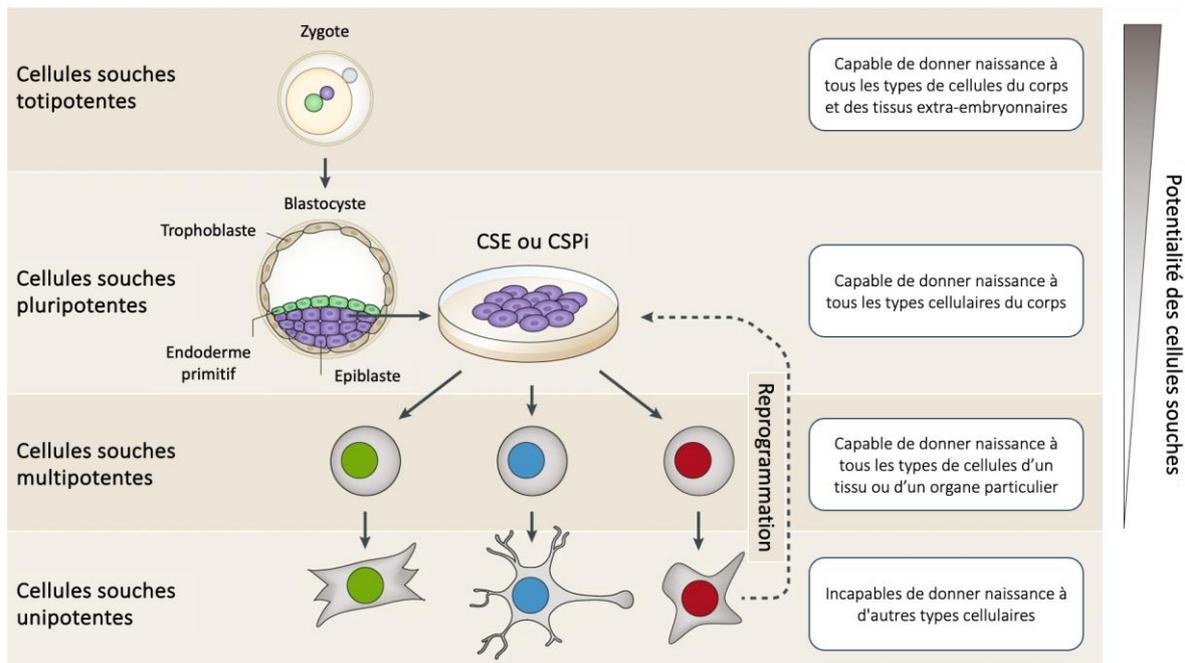
Il est important de noter que certaines des études présentées dans les paragraphes précédents entrent en contradiction avec d'autres. Notamment, si plusieurs d'entre elles observent un cil primaire normalement constitué (Hearn et al. 2005; J. Chen et al. 2017; Eintracht et al. 2021), d'autres concluent à une malformation du cil qui est plus allongé dans le cas de (Álvarez-Satta et al. 2021) et raccourci dans le cas de (Woerz et al. 2024).

### 1.3.2.3 Les modèles basés sur les CSpH

#### 1.3.2.3.1 Les CSpH

Les cellules souches sont des cellules indifférenciées répondant à deux propriétés principales : la capacité à s'auto-renouveler et la capacité à se différencier en cellules spécialisées. L'auto-renouvellement est le processus par lequel les cellules souches se divisent de façon symétrique ou asymétrique afin de produire de nouvelles cellules, permettant ainsi de perpétuer la population de cellules souches au cours de la vie (He, Nakada, et Morrison 2009). Les cellules souches pluripotentes, peuvent se différencier en tous les types cellulaires issus des trois feuilletts embryonnaires : l'endoderme, qui produit le tube digestif et ses glandes annexes, le mésoderme, qui produit les muscles, le squelette et les vaisseaux sanguins et enfin l'ectoderme, qui produit le système nerveux et la peau.

Il existe à ce jour deux types de cellules souches pluripotentes : les cellules souches pluripotentes embryonnaires (CSE) et les cellules souches induites à la pluripotence (ou cellules souches pluripotentes induites ; CSPi). Les CSE sont issues de la masse cellulaire interne ou de l'épiblaste d'un embryon au stade de blastocyste (**Figure 16**). Les CSPi en revanche, sont reprogrammées génétiquement en laboratoire à partir de cellules somatiques. Les premières dérivations de cellules souches embryonnaires murines ont été réalisées au début des années 1980 (Evans et Kaufman 1981; Martin 1981). Après des expérimentations effectuées sur différents mammifères (Brook et Gardner 1997; Thomson et al. 1995), la culture des CSE a été adaptée à l'humain afin d'obtenir les premières lignées de cellules souches embryonnaires humaines (CSEh) (Thomson et al. 1998).



**Figure 16 : Hiérarchie des cellules souches.** Les cellules souches pluripotentes humaines (CSPh) peuvent être de deux types : cellules souches embryonnaires (CSEh) et cellules souches induites à la pluripotence (CSPi). Adapté de Tewary, Shakiba, et Zandstra 2018.

Etant donné que ces cellules sont issues de blastocystes humains récupérés à la suite d'une fécondation *in vitro* (FIV), leur utilisation soulève des questions éthiques ayant mené à différentes lois encadrant leur exploitation. Le statut des CSEh a changé en 2004 lorsqu'une évolution de la loi a permis de passer d'une interdiction formelle à une interdiction avec dérogation délivrée par l'Agence de la Biomédecine pour une durée de 5 ans permettant ainsi à des laboratoires de les utiliser. Une évolution plus récente de cette loi a permis en 2021 de passer d'une demande de dérogation à une autorisation soumise à une déclaration préalable du projet de recherche. Néanmoins, l'accès aux CSEh reste très encadré et leur utilisation est synonyme de contraintes éthiques et réglementaires strictes (variables d'un pays à l'autre).

Afin de pallier aux obstacles inhérents à l'obtention des CSEh, l'équipe japonaise du Pr. YAMANAKA a mis en évidence en 2006 la capacité des cellules somatiques (cellules différenciées) à être reprogrammées en cellules souches induites à la pluripotence (CSPi). D'abord démontrée sur des fibroblastes de souris (Takahashi et Yamanaka 2006), puis sur des fibroblastes humains (Takahashi et al. 2007) cette méthode consiste à introduire un cocktail de 4 facteurs de transcription associés à la pluripotence (Oct3/4, Sox2, C-myc et Klf4) via des rétrovirus. Les cellules ainsi obtenues peuvent être différenciées en des types cellulaires dérivés des trois feuillets embryonnaires et sont donc comparables aux CSE. Elles se distinguent de celles-ci par certains avantages significatifs notamment en ce qui concerne leur origine et les considérations éthiques qui y sont associées.

Le domaine des CSPi est en constante évolution et de nouvelles techniques sont mises au point régulièrement afin de le perfectionner. Notamment, des méthodes permettant de se passer de l'utilisation de rétrovirus pour la reprogrammation ont été publiées. Notamment, des protocoles de reprogrammation utilisant des vecteurs épisomaux non intégratifs (A. Y. L. Wang et Loh 2019). Un épisome est un brin d'ADN circulaire non chromosomique qui peut s'intégrer dans l'ADN chromosomique de la cible cellulaire. En effet, les épisomes possèdent certains gènes supplémentaires codant la synthèse d'enzymes de restriction qui permettent leur intégration aux chromosomes cellulaires ou bactériens par une recombinaison épisomale. Néanmoins, ils ne sont pas considérés comme faisant partie du génome chromosomique.

Les CSPi se présentent donc comme un outil de choix pour la modélisation cellulaire étant donné leur capacité à se différencier en une large palette de types cellulaires. Ceci combiné aux nouvelles techniques d'édition du génome permet d'imaginer un nombre important d'expériences pouvant être mises en place. Le chapitre suivant

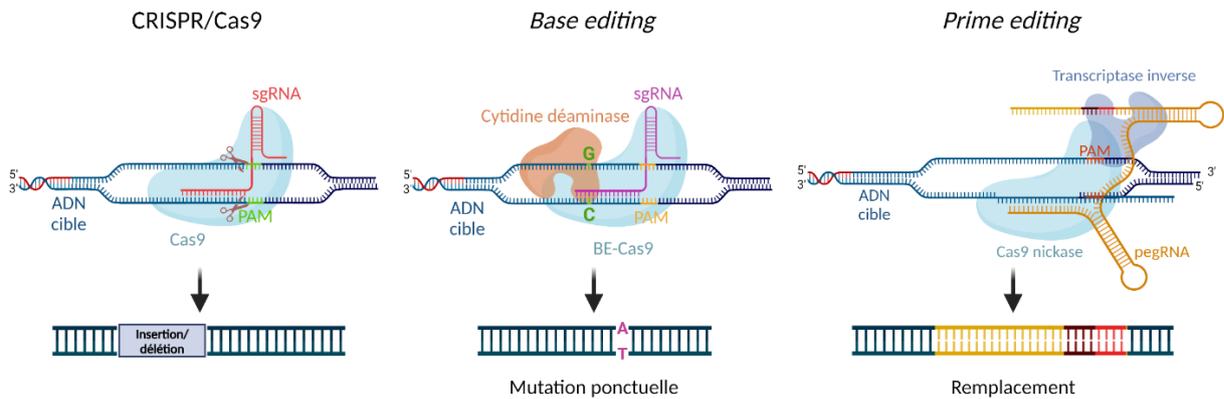
visé à présenter les différentes techniques d'édition du génome, notamment CRISPR/Cas9.

#### 1.3.2.3.2 Les techniques d'édition du génome

Les premiers outils permettant l'édition du génome humain sont les *Zinc Finger Nucleases* (nucléases à doigt de zinc ; ZFN) (Urnov et al. 2010) et les *Transcription Activator-Like Effector Nucleases* (Nucléase effectrice de type activateur de transcription ; TALEN) (N. Sun et Zhao 2013). Ces deux outils permettent de cibler et de couper spécifiquement des séquences d'ADN dans le génome d'un organisme. Les ZFN reposent sur l'utilisation de protéines à doigt de zinc pour cibler une séquence spécifique d'ADN tandis que les TALENs utilisent des *Transcription activator-like effectors* (TALE) qui sont des domaines de liaison à l'ADN dans le même but.

Le domaine de l'édition génomique a été bouleversé par la découverte et la mise au point du système d'édition CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/associated protein 9*) en 2013 (Jinek et al. 2013; Cho et al. 2013; Hwang et al. 2013). Ce système dérivé d'un système de défense bactérien couple l'utilisation d'une nucléase, la Cas9 (*CRISPR associated protein 9*) et d'un ARN guide (sgRNA ; *single guide RNA*). L'ARN guide permet de cibler une région précise de l'ADN identifiée par un site PAM (*protospacer adjacent motif*) qui est une courte séquence d'ADN située à quelques nucléotides de la zone cible. Une fois que l'ARN guide identifie un PAM et se couple à la séquence cible à laquelle il est complémentaire, un changement de conformation rendant la Cas9 active entraîne une cassure du double brin d'ADN (Y. Ma, Zhang, et Huang 2014). Ces cassures ciblées permettent l'inactivation d'un gène où l'introduction de séquences d'ADN exogènes à l'aide des mécanismes de

réparation tels que la jonction d'extrémités non-homologues (*Non-homologous End Joining* ; NHEJ) ou la recombinaison homologue (**Figure 17**).



**Figure 17 : Différentes méthodes d'édition génomique.** Le système CRISPR/Cas9 permet de modifier le génome en insérant des séquences d'ADN exogènes ou la délétion de gènes à l'aide des mécanismes de réparation de l'ADN. Le base editing est une technique basée sur CRISPR/Cas9 qui permet d'éditer une base sans faire de cassure du double brin d'ADN. Le prime editing permet quant à lui de faire des modifications du génome en induisant une cassure simple brin de l'ADN, réduisant les risques de mutations hors de la zone ciblée. Créé avec BioRender.

Depuis sa découverte, le système CRISPR/Cas9 a suscité beaucoup d'intérêt et de nombreuses équipes ont cherché à le rendre plus spécifique, plus performant et adapté à une palette d'applications plus large (Hryhorowicz, Lipiński, et Zeyland 2023). Notamment, une modification du système CRISPR/Cas9 permet de faire de l'édition de base sans induire de cassure du double brin d'ADN, faisant baisser le risque d'erreurs au cours de la réparation de l'ADN. Une de ces méthodes nécessite l'utilisation d'une Cas9 modifiée couplée à une cytosine désaminase, une hydrolase catalysant la réaction de conversion d'une cytosine en uridine. Au niveau de l'ADN, cette enzyme permet donc d'éditer une cytosine (base C) en thymine (base T) (Carrington, Weinstein, et Sood

2020). D'autres Cas9 modifiées permettant de faire les éditions G→A, A→G et T→C ont également été publiées (Komor et al. 2016; 2017).

De plus, le système CRISPR/Cas9 étant en perpétuelle évolution, des améliorations sont régulièrement apportées et de nouvelles versions sont publiées. Parmi ces nouveautés, le *prime editing* est une technique utilisant une enzyme de fusion qui combine une version modifiée de la protéine Cas9, appelée Cas9 nickase, avec une transcriptase inverse, et un ARN guide spécial (pegRNA) (Anzalone et al. 2019). Contrairement à CRISPR/Cas9, qui crée des cassures double brin de l'ADN, le *prime editing* induit des coupures simple brin, réduisant ainsi les erreurs indésirables. La transcriptase inverse utilise le pegRNA comme matrice pour insérer les modifications souhaitées directement dans le génome. Cette méthode offre une précision et une versatilité accrues, permettant d'introduire divers types de modifications génétiques tout en minimisant les risques de mutations hors de la zone ciblée.

Le système CRISPR/Cas9 a d'ores et déjà été utilisé dans la recherche sur le syndrome d'Alström, notamment pour corriger des mutations retrouvées chez des patients (Ji et al. 2020). En ciblant une mutation pathologique à l'aide d'un sgRNA, les auteurs de cette étude ont réussi à corriger le phénotype cellulaire de cellules mononucléées sanguines périphériques (PBMC ; *peripheral blood mononuclear cell*).

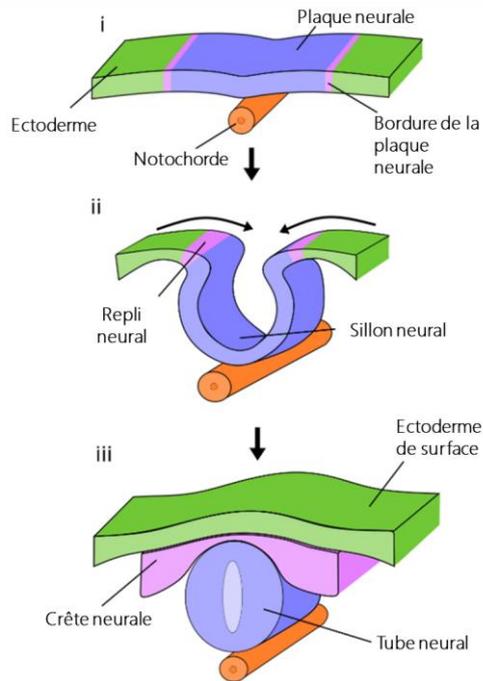
#### **1.4 DIFFERENCIATION DE CSPH EN CELLULES DE LA RETINE**

Nous avons vu que les CSPh sont des outils de choix pour l'étude de pathologies humaines car elles permettent d'obtenir un nombre virtuellement illimité de cellules spécialisées. Notamment, dans le cas des pathologies oculaires, les CSPh peuvent être différenciées en plusieurs types cellulaires de l'œil humain en suivant des protocoles établis s'inspirant du développement embryonnaire de l'œil. Dans la partie suivante,

nous allons nous pencher plus en détail sur quelques éléments de ce développement embryonnaire.

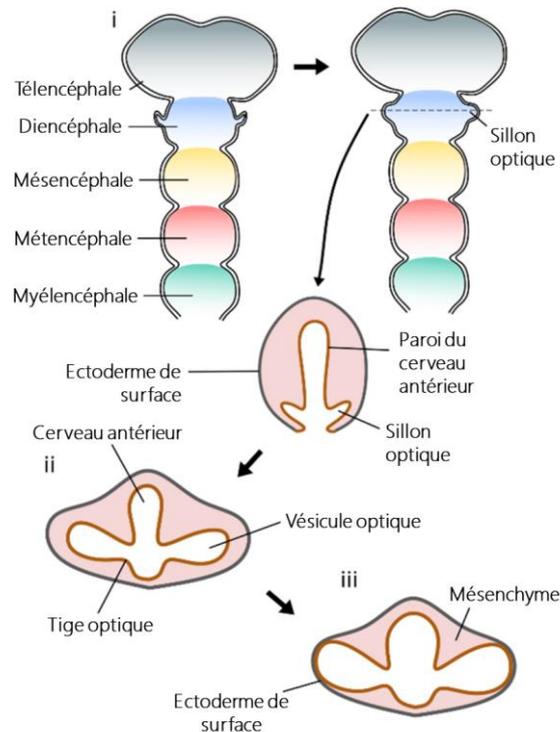
#### 1.4.1 Éléments du développement embryonnaire de l'œil humain

Le développement de l'œil humain peut se diviser en quatre étapes majeures : le développement du tube neural, la formation de la vésicule optique, l'invagination de la double couche de la cupule optique et le développement de la rétine différenciée. Dans un premier temps, la formation du tube neural est induite par le développement de la notochorde le long de l'axe antéropostérieur de l'embryon. La notochorde sécrète des facteurs de croissance permettant la différenciation de l'ectoderme situé juste au-dessus d'elle en ectoderme neural en activant les voies de signalisation Hedgehog, BMP et Wnt (Wu et al. 2021). Cet ectoderme neural s'épaissit ensuite pour donner la plaque neurale (**figure 18**). Cette structure va ensuite subir la neurulation primaire lors de la quatrième semaine du développement embryonnaire et au cours de laquelle la plaque neurale va se replier sur elle-même et ainsi former le tube neural qui est le précurseur du cerveau, de la moelle épinière et enfin, de l'œil.



**Figure 18 : Première étape de l'embryogenèse de l'œil : formation du tube neural.** La notochorde stimule l'attraction de la plaque neurale vers l'intérieur à partir de l'ectoderme (i) puis les replis neuraux se rejoignent et fusionnent pour donner le tube neural et la crête neurale (ii et iii). Adapté de Wagstaff et al. 2021.

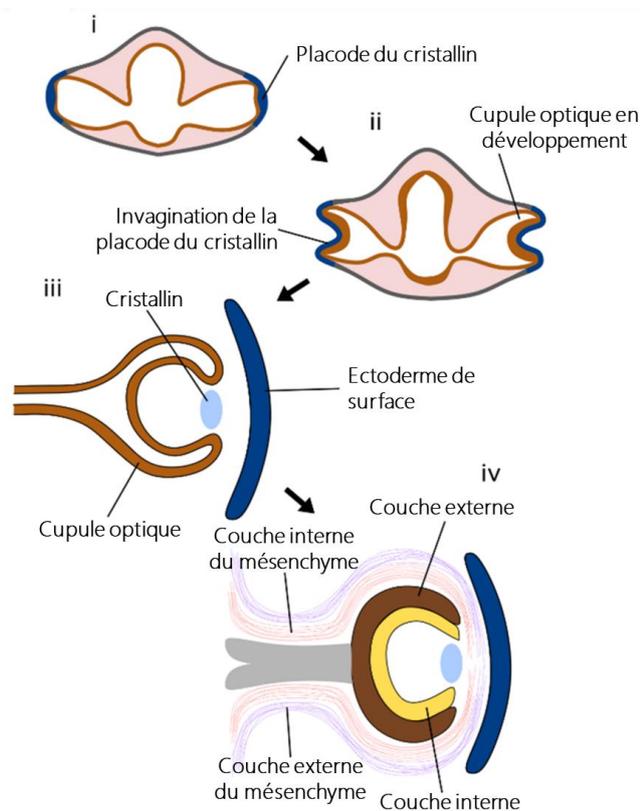
Après la formation du tube neural, cinq vésicules secondaires apparaissent au niveau de la partie rostrale du tube. Ces cinq vésicules sont le télencéphale, le diencéphale, le mésencéphale, le métencéphale et le myélocéphale (**Figure 19**). Ces vésicules donnent naissance au cerveau antérieur, au tronc cérébral et au cervelet.



**Figure 19 : Deuxième étape de l'embryogenèse de l'œil : formation de la vésicule optique.** Le tube neural se développe en cinq vésicules secondaires (i). Le sillon optique se développe de façon latérale à partir du diencéphale en élargissant la zone distale pour former la vésicule optique et pinçant la zone proximale pour former la tige optique (ii). Le sillon optique poursuit sa croissance jusqu'à atteindre l'ectoderme de surface (iii). Adapté de Wagstaff et al. 2021.

Puis, la zone à la base du diencéphale à la limite du mésencéphale s'épaissit de façon bilatérale marquant le début de la séparation du tissu optique et forme les sillons optiques au 22<sup>ème</sup> jour du développement embryonnaire (Quinn et Wijnholds 2019). Au 24<sup>ème</sup> jour du développement, la zone distale du sillon optique s'élargit pour former la vésicule optique tandis que la zone proximale se réduit et forme la tige optique. La vésicule optique croît de façon latérale jusqu'à ce qu'elle touche la couche externe d'ectoderme qui entoure le tube neural (Lachke et Maas 2010).

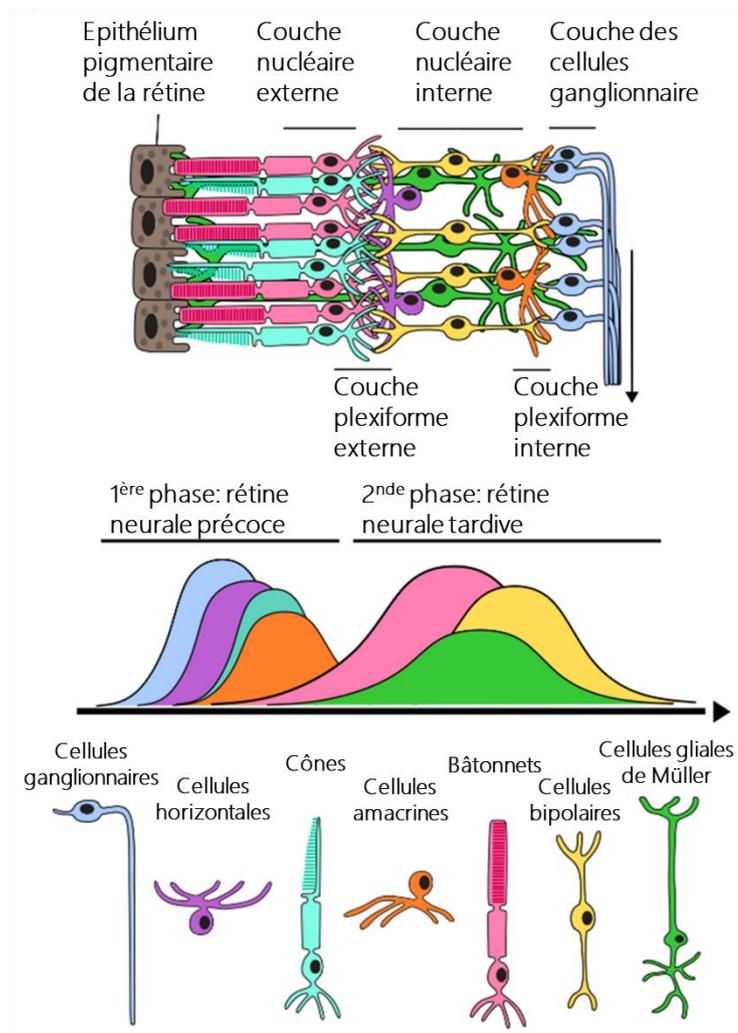
Ensuite, la troisième étape est l'invagination de la vésicule optique et le développement des structures majeures de l'œil (**Figure 20**). Lorsque la vésicule optique rencontre la couche externe de l'ectoderme, la zone d'ectoderme de surface s'épaissit et forme la placode du cristallin qui, tout en continuant à s'épaissir, se déplace vers l'intérieur de la vésicule optique, se pliant pour former le puits du cristallin.



**Figure 20 : Troisième étape de l'embryogenèse de l'œil: développement des structures oculaires.** La zone de l'ectoderme de surface en contact avec la vésicule optique s'épaissit et forme la placode du cristallin (i) qui s'invagine et se détache de l'ectoderme de surface pour donner le cristallin (ii). L'invagination mène à une structure à deux couches: la cupule optique (iii). La couche externe deviendra l'EPR, tandis que la couche interne se développe en rétine neurale. Le mésenchyme environnant contribue à la formation de structures telles que la cornée, la choroïde et le corps ciliaire (iv). Adapté de Wagstaff et al. 2021.

Au 32<sup>ème</sup> jour du développement, la vésicule optique commence alors également à s'invaginer et forme une structure à deux couches appelée cupule optique (Bryan et al. 2020). Le puits du cristallin se détache de l'ectoderme de surface devenant une structure distincte qui terminera son développement pour donner le cristallin de l'œil. Le mésenchyme, structure entourant le tube neural et la vésicule optique au cours du développement est composé de deux couches, une couche fibreuse externe qui forme la cornée au pôle antérieur et la sclérotique au pôle postérieur ainsi que d'une couche vasculaire interne forme la choroïde et une partie du corps ciliaire, tous deux au pôle postérieur (Gage et al. 2005).

Enfin, la rétine se développe en deux parties, l'EPR et la rétine neurale. L'EPR est formé à partir de la paroi externe de la cupule optique qui reste une simple couche cuboïdale de cellules (Aavani et al. 2017). La rétine neurale en revanche est formée de la paroi interne de la cupule optique qui prolifère et se différencie formant les différentes couches et types cellulaires de la rétine selon plusieurs phases de développement (**Figure 21**). La première phase se caractérise par la génération des cellules ganglionnaires, des cellules horizontales, des cônes et des cellules amacrines. La seconde phase se caractérise par le développement des bâtonnets, des cellules gliales de Müller et des cellules bipolaires. Toutes ces cellules sont décrites dans la partie 1.1.2.1 de cette thèse.



**Figure 21 : Embryogenèse de la rétine.** Les différents types cellulaires de la rétine se divisent en neurones précoces et neurones tardifs. Les neurones précoces comprennent les CGR, les cellules horizontales, les cônes et les cellules amacrines. Les neurones tardifs comprennent les bâtonnets, les cellules bipolaires et les cellules gliales de Müller. Adapté de Wagstaff et al. 2021.

#### 1.4.2 Les protocoles de différenciation en cellules de l'EPR

Les CSPh ont la caractéristique de se différencier spontanément après retrait du *basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) du milieu de culture (Ferguson et al. 2015). Le

bFGF est une molécule utilisée pour maintenir l'état de pluripotence des cellules souches lors de leur culture (Xu et al. 2005). Dès 4 semaines de culture sans bFGF, on peut distinguer des cellules de l'EPR parmi les cellules en différenciation grâce à leur morphologie en pavés hexagonaux et leur pigmentation caractéristique (Blenkinsop et al. 2013). Ces propriétés permettent de les identifier et facilitent leur sélection au sein d'une population cellulaire mixte contenant différents types de cellules en voie de différenciation. Après 8 à 12 semaines de différenciation, les zones pigmentées sont suffisamment grandes pour être isolées manuellement à l'aide d'un scalpel ou d'une aiguille et sont ensuite amplifiées.

Bien que des cellules de l'EPR obtenues par différenciation spontanée de CSEh (Ben M'Barek et al. 2017; da Cruz et al. 2018; Schwartz et al. 2012) ou de CSPih (Sharma et al. 2019) soient déjà utilisées dans des essais de thérapie cellulaire, leur obtention reste longue, laborieuse et avec un taux d'efficacité relativement faible (Regent et al. 2019). C'est pourquoi, des équipes de recherche se sont attelées à développer des protocoles dits « dirigés » utilisant différentes molécules telles que des cytokines afin d'améliorer l'efficacité de la différenciation.

Certains protocoles dirigés passent par une étape de formation de corps embryoides qui sont des amas de cellules cultivés en suspension (Muñiz et al. 2015). Ces corps embryoides sont cultivés dans un milieu d'induction neural traité avec du N2 [supplément contenant des hormones et des facteurs définis et favorisant la différenciation neuronale (Bottenstein et Sato 1979)] puis ceux-ci sont remis en adhérence dans des plaques de culture recouvertes de matrigel ou de laminine avec un milieu contenant du B27 [supplément riche en nutriments, antioxydants, vitamines, hormones et facteurs de croissance favorisant la survie, la croissance et la différenciation des neurones (Romijn, van Huizen, et Wolters 1984)] (Meyer et al. 2009; Phillips et al. 2012). D'autres études rapportent que les organoïdes de rétine contiennent des cellules de

l'EPR dans leur partie la plus externe bien que dans des proportions très faibles (Nakano et al. 2012).

D'autres protocoles dirigés ne passent pas par la formation de corps embryoides. Le paragraphe suivant présente différents protocoles dirigés en 2D.

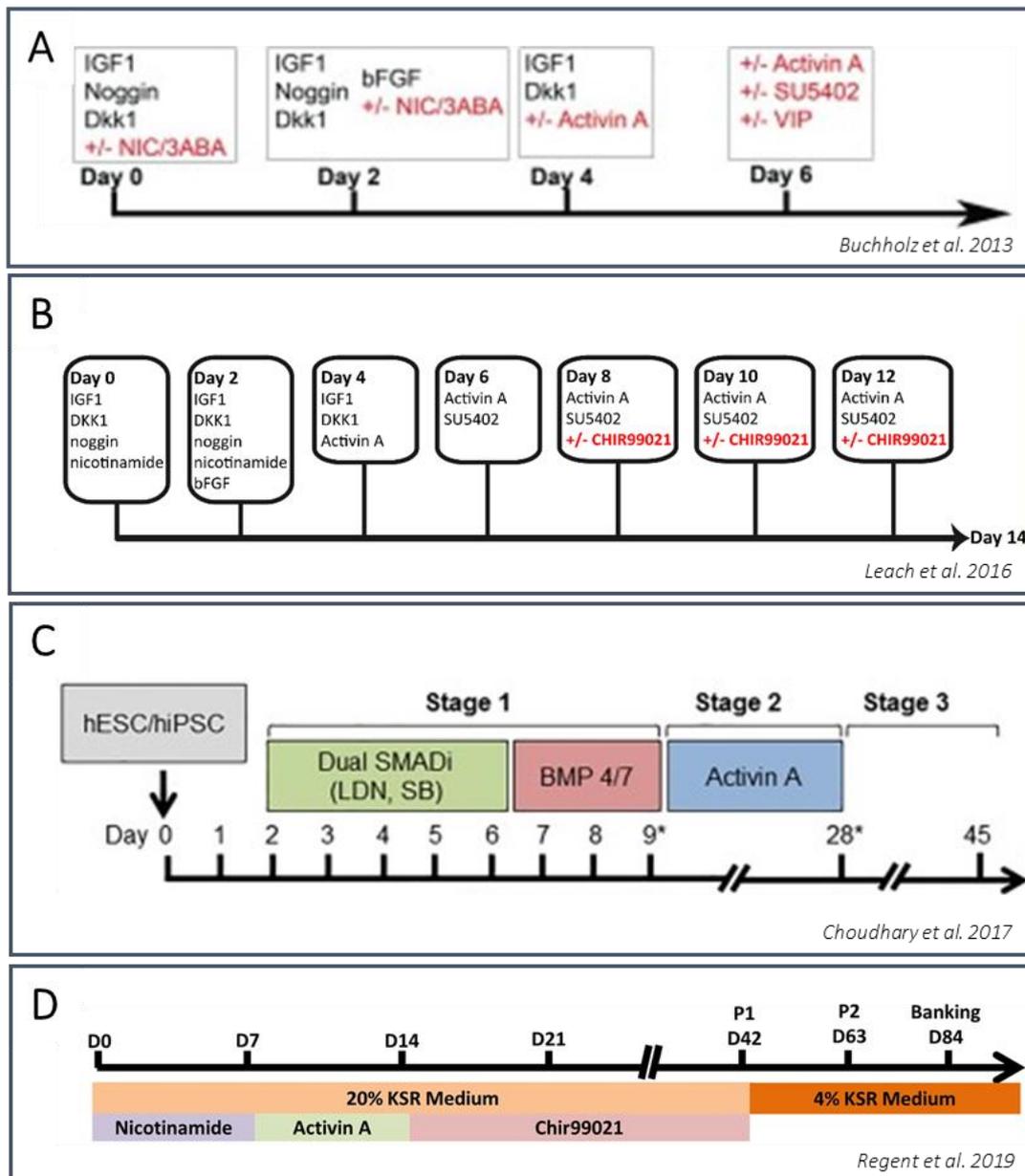
Une étude de 2013 présente un protocole combinant l'effet de Noggin, de Dkk1, d'IGF1, du nicotinamide, du 3-aminobenzamide, du bFGF, de l'activine A, du SU-5402 et du VIP (*vasoactive intestinal peptide*) sur la différenciation de CSEh et de CSPih. (**Figure 22A**). Ce protocole inclue une étape de « grattage » manuel des cellules non différenciées avant de détacher et de dissocier de façon enzymatique les cellules de l'EPR (Buchholz et al. 2013).

Une autre étude parue quelques années après s'est basée sur ce même protocole mais en ajoutant du Chir99021 au milieu de culture au 8<sup>ème</sup> jour de différenciation (Leach et al. 2016) (**Figure 22B**). L'ajout de cette cytokine a pour effet d'augmenter la pigmentation des cellules de l'EPR obtenues mais également d'accroître le nombre de ces cellules. Ce protocole nécessite également de passer par une étape de purification manuelle suivie par une dissociation enzymatique.

Ensuite, une étude parue en 2017 décrit un protocole de différenciation en 3 phases (Choudhary et al. 2017). La première phase de ce protocole implique l'utilisation de LDN-193189, de SB-431542 et de BMP4/7 dans le milieu de culture (**Figure 22C**). Lors de la seconde phase, les cellules sont traitées à l'activine A et la troisième phase n'implique aucune cytokine particulière. Entre les phases, les cellules sont dissociées de façon enzymatique à l'aide d'acutase.

Enfin, notre équipe a publié un protocole permettant d'obtenir des cellules de l'EPR matures en 84 jours (Regent et al. 2019). Ce protocole nécessite de traiter les cellules pendant leur différenciation avec du nicotinamide, de l'activine A et du

Chir99021 avant de dissocier les cellules pigmentées obtenues à l'aide de TrypLE (Figure 22D).



**Figure 22 : Comparaison de plusieurs protocoles dirigés pour la différenciation de CSpH en cellules de l'EPR.** Adaptés de Buchholz et al. 2013; Leach et al. 2016; Choudhary et al. 2017; Regent et al. 2019.

Ce protocole ne requiert donc que trois composés et ne passe pas par une étape de culture en trois dimensions ce qui permet de l'automatiser. D'autres équipes ont également publié des protocoles permettant la différenciation de larges quantités de cellules de manière automatisée (Matsumoto et al. 2019; Truong et al. 2021). De même, une étude plus récente a permis d'améliorer les protocoles de différenciation en couplant un système automatisé à une intelligence artificielle, testant 143 conditions différentes en 111 jours (Kanda et al. 2022). Le **tableau 2** présente une liste plus détaillée des protocoles de différenciation des CSPh en cellules de l'EPR (Morizur et al. 2020).

| References                                | Type of hPSC  | Culture conditions   | Duration   | Efficiency   | Markers of RPE lineage (immunofluorescence)         | Functional assays                                     |
|---|---------------|--|------------|--|---|---|
| <b>3D aggregates / Suspension culture</b> |               |  |            |  |   |   |
| Osakada et al., 2008                      | hESCs         | <i>Directed differentiation – SFEB culture</i><br>D0-D20: Dkk-1, Lefty-A<br><i>Adherent culture after D20</i>  | 60 days    | 30.6% MITF+/Pax6+ cells (D50)<br>34.7% ZO-1+ cells (D120)                            | Pax6, MITF (D50), ZO-1 (D120)                       | Phagocytosis  |
| Meyer et al., 2009                        | hESCs, hiPSCs | <i>Spontaneous differentiation - 3D aggregates</i><br>D0-D6: neural induction medium (N2, heparin)<br><i>Adherent culture after D6 (B27)</i>   | 40 days    | hESC: 25% MITF+ cells (D40)<br>hiPSC: 19% MITF+ cells (D21-28)                       | Pax6, MITF, ZO-1 (D30-40)                           | No data   |
| Idelson et al., 2009                      | hESCs         | <i>Directed differentiation – Cluster floating</i><br>D0-D7: Nicotinamide<br><i>Adherent culture after D7</i><br>D21-D35: Nicotinamide, Activin A  | 6 weeks    | 33.4% of pigmented cells (6 weeks)   | MITF, Pax6, ZO-1, RPE65, CRALPB, BEST1 (9-15 weeks) | Transplantation in dystrophic RSC rats, phagocytosis  |
| Osakada et al., 2009                      | hESCs, hiPSCs | <i>Directed differentiation – SFEB culture</i><br>D0-D21 : CK1-7, SB431542<br><i>Adherent culture after D21</i>  | 40-60 days | hESC: 22.8% MITF+ total cells (D30)<br>hiPSC: 22.1% MITF+ total cells (D35)          | Pax6, MITF (D35), ZO-1 (D90-100)                    | Phagocytosis  |
| Hirami et al., 2009                       | hiPSCs        | Same as Osakada 2008   | 40 day     | 29.8% MITF+/Pax6+ total colonies (D35)   | Pax6, MITF (D35)                                    | No data   |
| Kokkinaki et al., 2011                    | hiPSCs        | <i>Directed differentiation – EBs</i><br>D1-D21: Nicotinamide<br>D21-D35: Nicotinamide, Activin A, SB431542<br><i>Adherent culture on the 6<sup>th</sup> week (nicotinamide for 3-5 weeks)</i> | 35 days    | 37% of pigmented clusters (4-6 weeks)<br>>90% by the end of the 8 <sup>th</sup> week | ZO-1, Best1, RPE65 (10 weeks)                       | Phagocytosis, VEGF secretion, electrophysiology (D80) |
| Nakano et al., 2012                       | hESCs         | <i>Directed differentiation – SFEB culture</i><br>D0-D18: Matrigel, IWR1e, FBS, SAG<br>D15-D18: CHIR99021  | 25-40 days | No data  | MITF  | No data   |

|                       |               |  |                    |   |  |   |
|-----------------------|---------------|--|--------------------|---|--|---|
| Phillips et al., 2012 | hiPSCs        | <i>Spontaneous differentiation - 3D aggregates</i><br>D0-D6: neural induction medium (N2, heparin)<br><i>Adherent culture after D6 (B27)</i>   | 40-50 days         | No data   | MITF (D49), Ezrin, Best1, ZO-1 (D66),            | No data   |
| Singh et al., 2013    | hiPSCs        | <i>Spontaneous differentiation - 3D aggregates</i><br>D0-D6: neural induction medium (N2, heparin)<br><i>Adherent culture after D6 (B27)</i>   | 30-40 days         | No data   | ZO-1, Ezrin and BEST1 (P1/P3)                    | Phagocytosis, PEDF/VEGF secretion, TER measurements, calcium responses (P1/P2)  |
| Zhu et al., 2013      | hESCs, hiPSCs | <i>Directed differentiation - 3D aggregates</i><br>D0-D5: neural induction medium (N2B27)<br><i>Adherent culture after D5 (Activin A)</i>  | 30 days            | hESC: 95.7% pigmented cells (D30)<br>hiPSC: 48% pigmented cells (D30) | Pax6, MITF (D22), ZO-1 (D30), RPE65, BEST1 (D40) | Phagocytosis, TER measurements (D8-D50), transplantation in dystrophic RSC rats |
| Zhong et al., 2014    | hiPSCs        | <i>Spontaneous differentiation - 3D aggregates</i><br>D0-D6: neural induction medium (N2, heparin)<br><i>Adherent culture after D7 (B27; after D16: B27)</i>   | 30 days            | 19% MITF+ cells (D21-D28)   | Pax6, MITF                                       | No data   |
| Limnios et al., 2021  | hESCs         | <i>Spontaneous differentiation - 3D aggregates</i><br>D0-D8: SB43218, CKI, nicotinamide<br><i>Adherent culture after D8</i><br><i>Directed differentiation - 3D aggregates</i><br>D0-D5: SB43218, LDN193189, CKI, nicotinamide<br><i>3D aggregates after D5 (CHIR99021, IDE-2, SB43218, LDN193189)</i> | 38 days<br>16 days |   | MITF, PMEL17, RPE65, ZO-1, CRALBP, MERTK         | Phagocytosis, TEER  |
|                       |               |  |                    |   |  |   |

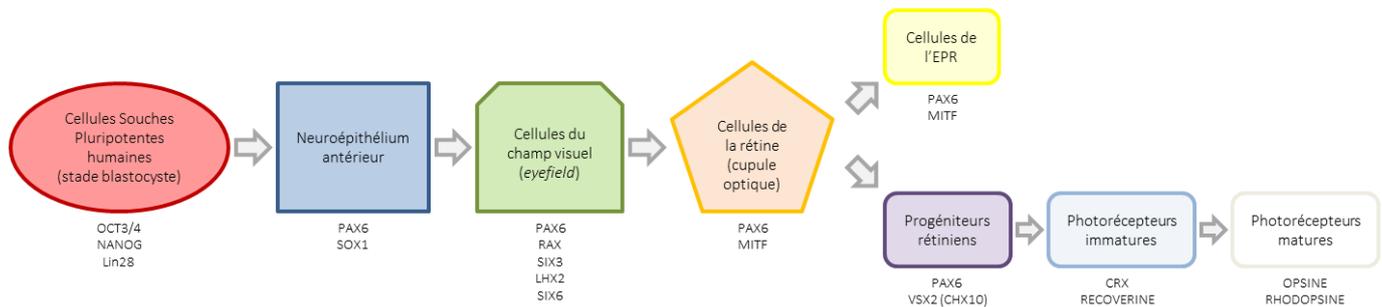
| <b>Adherent culture</b> |               |  |               |  |  |  |
|-------------------------|---------------|--|---------------|--|--|--|
| Vugler et al., 2008     | hESCs         | <i>Spontaneous differentiation</i><br>bFGF removal, manual enrichment  | 6-7 weeks     | No data  | OTX1/2, Pax6, PMEL17, MITF, CRALBP, RPE65, ZO-1, BEST1 (6-7 weeks) | Phagocytosis, transplantation into RCS rats                              |
| Carr et al., 2009       | hESCs, hiPSCs | <i>Spontaneous differentiation</i><br>bFGF removal + manual enrichment   | 4-6 weeks     | No data  | OTX2, Pax6, RPE65, PMEL17, MITF (6-8 weeks)                        | Phagocytosis, transplantation into RCS rats                              |
| Zahabi et al., 2012     | hiPSCs        | <i>Directed differentiation</i><br>D0-D6: bFGF, Noggin or SB431542<br>D6-D12: bFGF, retinoic acid<br>D12-D18: bFGF, SHH<br>Manual enrichment (D30)   | 40-60 days    | 57.4% MITF+ cells<br>39.3% BEST1+ cells<br>39.7% RPE65+ cells<br>30.5% CRALBP+ cells (D60) | MITF, PAX6, OTX2, and ZO1 (D40), RPE65 (D60), BEST1                | No data  |
| Krohne et al., 2012     | hiPSCs        | <i>Directed differentiation</i><br>D0-D21: Nicotinamide<br>D21-D35: Nicotinamide, activin A<br>After D35: Nicotinamide<br>Manual enrichment (D42)  | 6-10 weeks    | No data  | BEST1, CRALBP, RPE65, ZO-1 (8 weeks)                               | Phagocytosis, PEDF/VEGF secretion, transplantation into RCS rats         |
| Buchholz et al., 2013   | hESCs, hiPSCs | <i>Directed differentiation</i><br>D0-D2: Noggin, Dkk1, IGF1, Nicotinamide<br>D2-D4: same with bFGF<br>D4-D6: IGF1, Dkk1, Activin A<br>D6-D14: Activin A, VIP, SU5402<br>Manual enrichment (D14) | 14 days       | 78.5% (hESC), 63% (hiPSC) PMEL17+ cells (D14)  | Pax6, MITF, OTX2, PMEL17, ZO-1 (D14)                               | Phagocytosis (D44)   |
| Maruotti et al., 2013   | hESCs, hiPSCs | <i>Spontaneous differentiation</i><br>Progressive enrichment by serial passage   | 50-115 days   | 16% RPE65+ cells (D50)<br>>96% MITF+, >97% RPE65+ cells (D115, hESC)                       | MITF, OTX2, BEST1, ZO-1, RPE65 (P1)                                | Phagocytosis, VEGF secretion, transplantation into albinos NOD-scid mice |
| Reichman et al., 2014   | hiPSCs        | <i>Spontaneous differentiation</i>   | 30 to 45 days | No data  | MITF, ZO-1 (D45)   | Phagocytosis   |

|                         |               |  |            |  |  |  |
|-------------------------|---------------|--|------------|--|--|--|
|                         |               | bFGF removal + manual enrichment (D14)   |            |  |  |  |
| Leach et al., 2015      | hESCs         | <i>Directed differentiation</i><br>D0-D2: Noggin, IGF1, Dkk1, Nicotinamide<br>D2-D4: same with bFGF<br>D4-D6: IGF1, Dkk1, Activin A<br>D6-D8: Activin A, SU5402<br>D8-D14 : CHIR99021, Activin A, SU5402 | 14 days    | 97,77% PMEL17+ cells (D14)   | OTX2, MITF, PMEL17, RPE65, ZO-1 (D134)       | Phagocytosis, PEDF/VEGF secretion (D134)                                     |
| Maruotti et al., 2015   | hESCs, hiPSCs | <i>Directed differentiation</i><br>D0-D14: nicotinamide, chetomin  | 35-63 days | 45-60% PMEL17+ cells (D35)<br>>95% MITF+, >92% PMEL17+ cells (D63)     | MITF, PMEL17, ZO-1 (D65), BEST1, RPE65 (D95) | Phagocytosis, VEGF/PEDF secretion, transplantation into NOD-SCID albino mice |
| Lidgerwood et al., 2016 | hESCs, hiPSCs | <i>Directed differentiation</i><br>Taurine, hydrocortisone, triiodothyronine, IGF1, Dkk1, Noggin, bFGF   | 40-60 days | >90% PMEL17+ cells (D90)   | MITF, PMEL17, RPE65, BEST1, ZO-1 (D90)       | Phagocytosis, functional K+ transport  |
| Choudhary et al., 2017  | hESCs, hiPSCs | <i>Directed differentiation</i> (passage D9 and D28)<br>D2-D6: LDN-193189, SB-431542<br>D6-D9: BMP4-7<br>D9-D28: Activin A   | 45 days    | >90% CRALBP+ cells (D48)   | PMEL17, Best1, ZO-1, MERTK, CRALBP (D42)     | Phagocytosis, VEGF/PEDF secretion (7-10 weeks)                               |
| Régent et al., 2019     | hESCs         | <i>Directed differentiation</i><br>D0-D7: Nicotinamide<br>D7-D14: Activin A<br>D14-D42: CHIR99021  | 42 days    | 82.2% (D42), 94.7% (D83) Pax6+/MITF+ cells<br>96.8% TYRP1+ cells (D83) | MITF, Pax6, Ezrin, ZO-1, BEST1, MERTK (D83)  | Phagocytosis, VEGF secretion   |
| Michelet et al., 2020   | hESCs, hiPSCs | <i>Directed differentiation</i><br>- passage around D30-35<br>D7-D18/21: activin A   | 60-90 days | 35-40% pigmented cells (D30-35)  | ZO-1   | Phagocytosis, VEGF secretion, TER measurements (D65-75)                      |

**Tableau 2 : Tableau récapitulatif des protocoles de différenciation des CSPh en cellules de l'EPR.** Ces protocoles peuvent être séparés dans différentes catégories : protocole spontané ou dirigé et protocole passant par de la culture d'agrégats/suspensions cellulaires ou protocole en culture adhérente. Adapté de Morizur et al. 2020.

### 1.4.3 Les protocoles de différenciation en cellules de la neuro-rétine

La différenciation des CSPh en cellules de la neuro-rétine et notamment en photorécepteurs suit la même voie de développement qu'un embryon. Chaque étape développementale de cette voie est caractérisée par l'expression de gènes spécifiques permettant de caractériser à quel stade du développement se trouvent les cellules (**Figure 23**). Les protocoles de différenciation de CSPh en photorécepteurs peuvent être des protocoles en 2 dimensions adaptés à un tapis cellulaire ou des protocoles en 3 dimensions passant par une étape de corps embryonnaires ou d'organoïdes.



**Figure 23 : Gènes impliqués dans le développement des photorécepteurs et cellules de l'EPR.** Le développement de ces cellules à partir de CSPh suit des étapes séquentielles. Sous chaque étape figure une liste de marqueurs pouvant être utilisés pour les distinguer. Adapté de Ben M'Barek et Monville 2019.

#### 1.4.3.1 Les protocoles en 2 dimensions

Le premier protocole de différenciation des CSP en photorécepteurs a été publié en 2006. Ce protocole part de CSEh cultivées dans un milieu contenant un inducteur du champ visuel (*eye field*), l'IGF-1, un inhibiteur des BMP, Noggin et un antagoniste de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine Dkk1 (Lamba et al. 2006). Après 3 semaines de différenciation, ce protocole permet d'obtenir 86% de progéniteurs rétiniens exprimant les gènes *PAX6* et *VSX2*. Seulement, sur ces cellules différenciées, uniquement 12% donnent naissance à des photorécepteurs immatures exprimant CRX et une part minime de ces cellules (inférieure à 0,01%) deviennent des photorécepteurs matures exprimant l'opsine ou la rhodopsine (Fuhrmann 2008). C'est pourquoi les chercheurs ont mis au point des protocoles plus efficaces passant par des étapes en 3 dimensions.

#### 1.4.3.2 Les protocoles en 3 dimensions

Le premier protocole de ce type ayant été développé a été publié en 2008. Ce protocole implique la génération de corps embryoïdes à l'aide d'antagonistes des voies Wnt et Nodal dans le milieu de culture pendant 20 jours avant de passer à une culture des cellules en 2 dimensions (Osakada et al. 2008; 2009). A ce stade, les cellules sont mises en présence de facteurs favorisant l'induction des bâtonnets tels que l'acide rétinique, la taurine, le FGF2 et Shh. En 35 jours, 35% des cellules obtenues sont des progéniteurs rétiniens mais néanmoins, 20% des progéniteurs obtenus donnent des photorécepteurs immatures au bout de 170 jours de différenciation. Après 200 jours de culture, 8,5% des photorécepteurs immatures expriment la rhodopsine et les opsinines M, L et S.

Un autre protocole publié en 2009 utilise une approche combinant la différenciation en 3 dimensions avec celle en 2 dimensions et reproduisant les étapes du développement de la rétine *in vivo* (Meyer et al. 2009). Cette méthode a ensuite été améliorée de sorte à obtenir des agrégats cellulaires, plus tard appelés « organoïdes » contenant plusieurs types de cellules neuronales au sein de structures décrites comme des « rosettes » (Völkner et al. 2016; Meyer et al. 2011). Ainsi, au 80<sup>ème</sup> jour de différenciation, 56% des cellules obtenues expriment CRX prouvant leur identité de photorécepteurs immatures. Néanmoins, ce protocole ne permet pas d'obtenir des cônes et des bâtonnets matures présentant les caractéristiques typiques des photorécepteurs tels que les disques de rhodopsine dans leur segment externe.

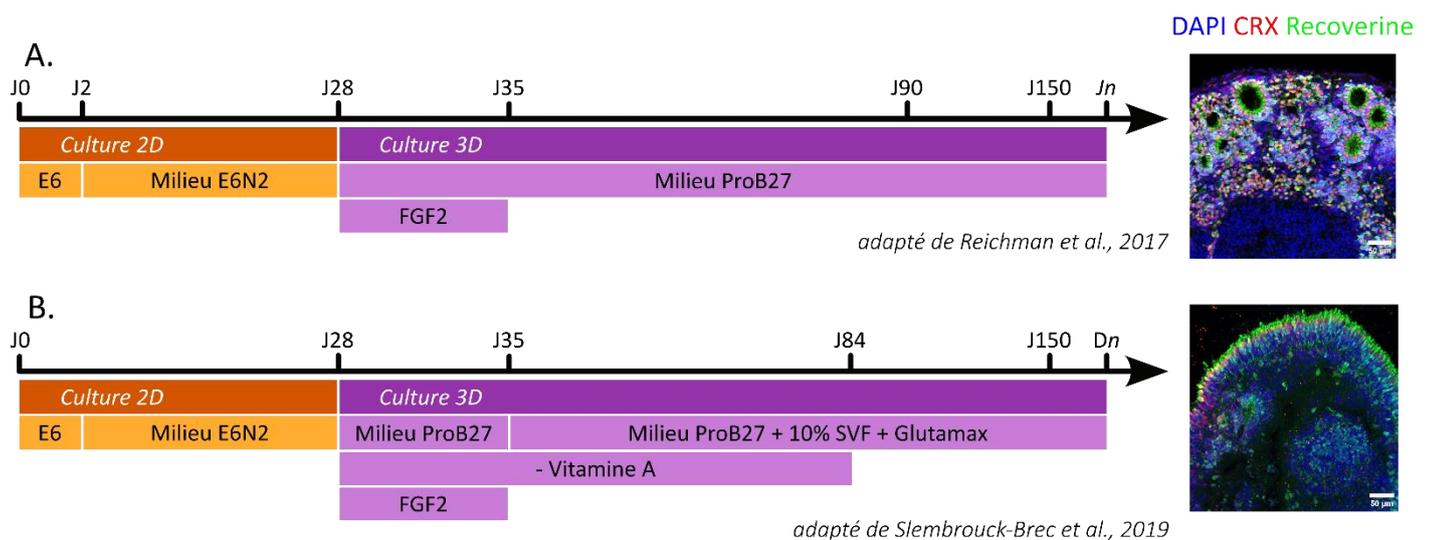
A partir de ce constat, d'autres équipes ont cherché à développer des protocoles en 3 dimensions menant à l'obtention de photorécepteurs plus matures. Dans une étude de 2012, une équipe a démontré que des CSEh étaient en mesure de produire

des organoïdes similaires à des cupules optiques bicouches et auto-organisées se différenciant ensuite en une neuro-rétine pluristratifiée contenant entre autres des cônes et des bâtonnets présentant des segments internes et des cils connecteurs développés (Nakano et al. 2012). Ce protocole nécessite de compléter le milieu de culture avec 20% de remplacement de sérum KnockOut (KSR ; *KnockOut Serum Replacement*) et avec des cytokines telles que l'IWR1e (inhibiteur de la voie Wnt) et le SAG (*Sonic Hedgehog Signaling Agonist* ; agoniste de Shh).

En se basant sur le protocole de Meyer et al. publié en 2009, une autre équipe a démontré en 2014 que les CSPih étaient également capable de s'organiser en structures tridimensionnelles similaires aux cupules optiques et contenant tous les types cellulaires de la neuro-rétine (Zhong et al. 2014). Dans ce protocole, les cellules sont cultivées en 3 dimensions dans un milieu supplémenté en N2, puis passent par une étape en 2 dimensions lors de laquelle le N2 est remplacé par du B27 et après une reprise de la culture en 3 dimensions, le milieu de culture est supplémenté en acide rétinoïque et en taurine. Ainsi, les photorécepteurs obtenus au sein de ces organoïdes présentent au bout de 27 semaines de différenciation des segments externes contenant des disques de rhodopsine et capables de répondre à un stimulus lumineux mettant en évidence une certaine fonctionnalité de ces photorécepteurs.

L'équipe du Dr. GOUREAU à l'Institut de la Vision a mis au point un autre protocole permettant de différencier des CSPih adhérentes en organoïdes de neuro-rétine. A partir de 28 jour de différenciation ces organoïdes contiennent majoritairement des progéniteurs rétiniens et à 28 jours, ceux-ci s'organisent en rosettes où les photorécepteurs se trouvent au centre (Reichman et al. 2014; 2017). Ce protocole nécessite d'ajouter du N2 dans le milieu de culture du 2<sup>ème</sup> au 28<sup>ème</sup> jour de différenciation (lors de la phase en 2D) puis de compléter le milieu avec du B27 lors de la phase en 3D tout en ajoutant du FGF2 lors de la première semaine de cette phase (**Figure 24A**). Les

photorécepteurs issus de ces organoïdes ont été caractérisés et leur fonctionnalité a été démontrée à 200 jours de culture par des expériences de patch-clamp (Gagliardi et al. 2018). Une amélioration de ce protocole a été apportée en 2019 et permet d'obtenir des organoïdes où les photorécepteurs se trouvent à la périphérie de la structure et non dans des rosettes (Slembrouck-Brec et al. 2019). Ceci permet d'obtenir des structures mimant une rétine pluristratifiée similaire à la rétine humaine. Pour cela, les chercheurs ont ajouté 10% de sérum de veau fœtal et du Glutamax à partir du 35<sup>ème</sup> jour de différenciation (lors de la phase en 3D) et ont retiré la vitamine A du milieu entre les jours 28 et 84 du protocole (**Figure 24B**).



**Figure 24 : Comparaison de deux protocoles de différenciation de CSpH en organoïdes de neuro-rétine.** Le premier protocole donne des organoïdes où la rétine s'organise en structures appelées « rosettes » et où les photorécepteurs se développent dans la lumière de ces rosettes. Le deuxième protocole permet d'obtenir des organoïdes où la rétine se s'organise en couches et où les photorécepteurs se développent en périphérie. Adaptés de Reichman et al. 2017 et Slembrouck-Brec et al. 2019.

Le **tableau 3** présente une liste plus exhaustive des protocoles de différenciation en photorécepteurs existants dans la littérature.

| References                    | Culture conditions   | Observations (PR marker detection, efficiency)  | <i>In vivo</i> functional assays   |
|-------------------------------|--|---|--|
| Lamba et al., 2006            | 10%KSR B27+ <i>Noggin</i> / <i>Dkk1</i> / <i>IGF1</i> followed by B27/N2 + <i>Noggin</i> / <i>Dkk1</i> / <i>IGF1</i> / <i>FGF2</i>   | 80% PAX6+/VSX2+ at 3weeks<br>12% CRX precursors, Rhodopsin and S-opsin detections   | Evaluated in rodent (ERG response)   |
| Osakada et al., 2008          | <i>LeftyA</i> or SB431542<br><i>Dkk1</i> or <i>CKI-7</i><br>Retinoic acid (RA) and taurine   | 20% CRX precursors<br>8.5% Rhodopsin PRs<br>Rhodopsin, NRL, Opsin detections  | No data  |
| Meyer et al., 2011            | 20%KSR<br>Then N2<br>Then B27<br><i>Noggin</i> or <i>dorsomorphin</i><br><i>Dkk1</i> or XAV939   | 90% VSX2 in vesicular structures<br>56% CRX precursors at D80<br>Rhodopsin, Recoverin, NRL, Opsin detections<br>PR with signs of electrophysiological functions                               | No data  |
| Nakano et al., 2012           | 20% KSR IWR1e<br>then N2 10%FBS / <i>Chir99021</i> / <i>SAG</i>  | CRX, Rhodopsin, Recoverin, NRL, Opsin detections  | Evaluated in rodent and monkey (integration, survival but no functional response)  |
| Tucker et al., 2013           | 10%KSR B27 N2 + <i>Noggin</i> / <i>Dkk1</i> / <i>IGF1</i> / <i>FGF2</i><br>Then addition of DAPT and aFGF  | Clinically compatible protocol<br>10-25% Recoverin at D90   | No data  |
| Boucherie et al., 2013        | B27 N2<br>After d10 : <i>SHH</i> / <i>T3</i> / <i>FGF1</i> / <i>FGF2</i> / <i>RA</i> / <i>taurine</i>  | D30 NRL / CRX / Rhodopsin detections<br>60% CRX+ cells at D10<br>Rod PR differentiation   | No data  |
| Zhu et al., 2013              | B27 / N2   | D10 : VSX2 / MITF detection<br>99% of VSX2+ / PAX6+ at D20<br>D60 : high number of CRX  | No data  |
| Zhong et al., 2014            | N2 / Heparin / <i>Blebbistatin</i><br>Then B27 10%FBS RA taurine   | D20: 62-88% VSX2+ retinal progenitors<br>Week 21: rod opsin detected (rod dominant protocol)<br>PR with advanced maturation after 27 weeks, photosensitivity (few responses to light flashes) | Evaluated in rodent (optokinetic response, survival up to 10 months)               |
| Reichman et al., 2014         | N2<br><i>FGF2</i> between D14 D21<br>DAPT between D28-D35  | D42: CRX, Recoverin detection<br>D35-D50: CD73<br>Rhodopsin, and opsins detections at D112  | Evaluated in rodent (cells located in subretinal space, survival up to 2.5 months) |
| Wang et al., 2015             | N2<br>Then 14% KSR Nicotinamide<br><i>FGF2</i> starting from d21   | D42: 82% of cell spheres VSX2+<br>CRX expression at 6-7 weeks   | No data  |
| Mellough et al., 2015         | Reduced KSR concentration from 20 to 10%<br>+ B27 / <i>IGF1</i> / <i>Dkk1</i> <i>Noggin</i> <i>LeftyA</i> , <i>SHH</i> , <i>T3</i><br>Then N2 B27 <i>IGF1</i> +<br><i>Dkk1</i> <i>Noggin</i> , <i>SHH</i> , <i>T3</i> , <i>FGF2</i> , <i>RA</i> , <i>taurine</i> | Rod and cone like inner and outer segments<br>At 6.5weeks: phototransduction related functional responses   | No data  |
| Zhou et al., 2015             | 10%KSR B27+ <i>IGF1</i><br>followed by B27/N2 + <i>IGF1</i>  | At D90: CRX+ and Recoverin+ cells   | No data  |
| Singh et al., 2015            | B27/N2 + <i>Noggin</i><br>Later addition of bFGF, <i>Dkk1</i> / <i>IGF1</i> , <i>FGF9</i>  | At 6 weeks: CRX+ and Recoverin+ cells<br>Rhodopsin+   | No data  |
| Barnea-Cramer et al., 2016    | B27/N2 + <i>Insulin</i> + <i>Noggin</i><br>Then B27/N2 + <i>Noggin</i><br>Then B27/N2 + <i>BDNF</i> / <i>CNTF</i> / <i>RA</i> / <i>DAPT</i>  | 90% PAX6+ and RX1+ at d18<br>95% PAX6+ and VSX2+ at d30<br>95% rod like PR (CRX+, Rhodopsin, PDE6 $\alpha$ ) at D114  | Evaluated in rodent (optokinetic response)   |
| Gonzalez-Cordero et al., 2017 | N2 then B27<br>Addition of 10% FBS and taurine and later RA  | Week 17: 34% Recoverin+ and CRX+<br>Connecting clia; inner and outer segment-like<br>Expression cone opsins and rhodopsin.  | Evaluated in rodent (cells located in subretinal space)                            |
| Wahlin et al., 2017           | Under hypoxia:<br>B27+ E6 (at 2x)+ IWR1e replaced by SAG<br>Under normoxia:<br>B27+ 10% FBS+ SAG then RA with a pulse of<br>DAPT d28-d42 and taurine   | Rhodopsin and cone opsin, Arrestin detected<br>D160: POS like structures<br>D300: visual pigment compartmentalized to the POS   | No data  |
| Reichman et al., 2017         | E6 then E6 + N2<br>B27 + <i>FGF2</i> then B27  | D49: CRX+, OTX2+, Recoverin+<br>D100: Rhodopsin+, Blue Opsin+, R/G Opsin+<br>D140: CD73+  |  |
| Capowski et al., 2019         | N2+ heparin with addition of BMP4 D6-D16<br>Then B27 then RA 5% FBS taurine, lipid supplement  | ONL like structures with cones and rods<br>Outer plexiform layer like in organoids at D220<br>Metabolically active inner segments and maturing outer segments                                 | No data  |
| Slembrouck-Brec et al., 2019  | E6 then E6 + N2<br>B27 - vitamin A + <i>FGF2</i><br>B27 - vitamin A + 10% FBS + <i>Glutamax</i><br>B27 + 10% FBS + <i>Glutamax</i>   | D56: BRN3A+, CRX+, Recoverin, PAX6+<br>D100: progression of two separated layers assumed to be the ONL and INL  |  |

|                         |  |   |         |
|-------------------------|--|---|---------|
| Matsushita et al., 2024 | 10%KSR + SB431542 + LDN193189<br>Then 10%KSR + BMP4<br>Then 10%KSR<br>Then 10%FBS + N2 + taurine + SAG + activin<br>A + RA<br>Then 10%FBS + N2 + taurine + SAG | D10: clusters of RAX+ and VSX2+ cells<br>From D20: CRX + cells<br>D70: Rhodopsin+, L/M Opsin+<br>D80: Recoverin+, NRL+, PKC $\alpha$ +, | No data |
|-------------------------|--|---|---------|

**Tableau 3 : Tableau récapitulatif des protocoles de différenciation des CSPh en cellules de la neuro-rétine.**

*Adapté de Morizur et al. 2020.*

En conclusion, nous avons introduit jusqu'ici le contexte général du syndrome d'Alström, une ciliopathie qui touche entre autres organes, l'œil humain. Cette maladie génétique ne possède à l'heure actuelle aucun traitement et peu d'outils permettent son étude. A l'aide des connaissances présentées dans cette introduction nous allons maintenant présenter les objectifs de cette thèse.

## 2 OBJECTIFS

---

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, le SA se caractérise, entre autres symptômes, par des atteintes du système visuel. Celles-ci ne sont que très peu étudiées, notamment en raison d'un manque d'outils adéquats tels que des modèles cellulaires humains pertinents. Au cours de ma thèse, j'ai donc cherché à mieux comprendre les mécanismes à l'origine de ces atteintes visuelles.

Ainsi, le premier objectif a été de générer des lignées cellulaires du SA à partir de CSPih puis de les caractériser. Pour cela, je me suis appuyé sur différentes méthodes récentes d'édition du génome de sorte à reproduire des mutations pathologiques retrouvées chez certains patients. Pour ce faire, il a fallu affiner les méthodes d'isolation de clones édités génétiquement par CRISPR/Cas9.

Ensuite, une fois les lignées cellulaires du SA obtenus, le second objectif a été d'obtenir des cellules de la rétine à partir de ces différentes lignées CSPih. Ces cellules de la rétine sont obtenues par des méthodes de différenciation cellulaire en organoïdes neuro-rétiniens et en cellules de l'EPR déjà établies au laboratoire.

Enfin, le troisième et dernier objectif a été d'identifier un phénotype pathologique lié à la mutation sur le gène *ALMS1*. Pour y arriver, j'ai recherché des anomalies au niveau du cil primaire et de la quantité/qualité des cellules constituant les organoïdes et notamment les photorécepteurs à différents stades de développement. Je me suis également intéressé à la mortalité cellulaire.

## 3 RESULTATS

---

### 3.1 ETUDE 1 : DEVELOPPEMENT D'UNE METHODE SEMI-AUTOMATISEE POUR L'ISOLATION DE CLONES ISSUS D'EXPERIENCES D'EDITION GENOMIQUE DE CSPH PAR CRISPR/CAS9 ET GENERATION DE NOUVELLES LIGNEES CELLULAIRES MODELISANT LE SYNDROME D'ALSTRÖM

#### 3.1.1 Introduction

Le SA est une maladie génétique rare caractérisée par une atteinte de différents organes et notamment par des troubles de la vision (Marshall, Beck, et al. 2007). Ces troubles sont dus à une dystrophie des photorécepteurs et, comme dans beaucoup de ciliopathies, à une rétinite pigmentaire, une atteinte de l'EPR. Le SA est dû à des mutations dans le gène *ALMS1*, un gène de 23 exons situé sur le chromosome 2. Ce gène code pour une protéine ubiquitaire de 461,2 kDa localisée au centrosome et au corps basal de cellules ciliées et a un rôle supposé dans la régulation du cycle cellulaire, le transport intra-ciliaire, la production de matrice extracellulaire et la migration cellulaire (Hearn et al. 2005). A l'heure actuelle, aucun traitement n'est disponible et bien que des modèles animaux existent, aucun modèle cellulaire humain ne permet de comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires responsables des symptômes visuels du SA.

Au cours des dernières décennies, les cellules souches pluripotentes humaines (CSPh) se sont imposées comme un outil de choix pour la modélisation de maladies rares dans un contexte de humain car elles présentent l'avantage de s'auto-renouveler, permettant ainsi un accès virtuellement infini à une source de cellules modèles (He, Nakada, et Morrison 2009). Ces cellules se caractérisent également par leur capacité à être différenciées en un nombre important de types cellulaires, permettant l'étude de

cellules issus d'organes jusque-là difficilement accessibles. Ainsi, la littérature fait état de protocoles de différenciation de CSPh en cellules de l'EPR (Regent et al. 2019) et en organoïdes neuro-rétiniens, une structure tridimensionnelle récapitulant les différents types cellulaires de la rétine, y compris les photorécepteurs (Reichman et al. 2014; 2017). Par conséquent, obtenir des CSPh modèles du SA permettrait d'observer l'effet de mutations pathologiques sur différents types cellulaires tels que l'EPR et les photorécepteurs.

Les avancées récentes dans le domaine de l'édition génomique ont ouvert de nouvelles possibilités de modification précise des gènes. Ainsi, le système d'édition CRISPR/Cas9 permet d'introduire des insertions et des délétions au sein d'une séquence ciblée par un ARN guide spécifique (Y. Ma, Zhang, et Huang 2014). Ces insertions et délétions permettent de créer des décalages du cadre de lecture et peuvent mener à l'apparition de codons STOP précoces. Seulement, bien que cette méthode permette de créer des mutations non-sens, elle ne permet pas de reproduire des mutations pathologiques retrouvées chez des patients. Pour cela, de nouvelles formes de CRISPR/Cas9 ont été mises au point. Ces nouveaux systèmes utilisent des Cas9 modifiées et couplées à des enzymes induisant des modifications de bases sans provoquer de cassure du double brin d'ADN (Komor et al. 2017). Notamment, l'utilisation d'une cytidine désaminase permet de catalyser la désamination d'une Cytidine en une Uridine, une base qui possède les mêmes propriétés d'appariement que la Thymidine. Lors de la transcription de l'ADN en ARNm, la Thymidine est remplacée par une Uridine. Ainsi, au niveau de l'ADN, cette réaction permet donc de modifier une Cytidine en Thymidine sans briser le double brin d'ADN. Dans le cas de la modélisation du SA, ce système présente un intérêt certain car, bien que les mutations responsables du SA soient variées, un certain nombre d'entre elles sont des mutations C→T. Ainsi, le système CRISPR/Cas9 et sa version spécialisée dans la modification de base représentent

un outil de choix pour l'obtention de lignées de CSpH modélisant le SA avec les mêmes mutations que celles décrites comme pathologiques chez les patients.

A l'heure actuelle, un des inconvénients des expériences de CRISPR/Cas9 réside dans le fait que ces expériences mènent à l'obtention de population cellulaires mixtes contenant à la fois des cellules éditées à la position génétique souhaitée et des cellules éditées à d'autres positions ou encore des cellules non éditées. Il est donc nécessaire de passer par une étape d'isolation habituellement réalisée par dilution clonale. Seulement, cette étape est manuelle, longue, fastidieuse et faiblement efficace.

Dans l'étude présentée ci-dessous, nous avons développé une nouvelle méthode semi-automatisée pour l'isolation de clones issus de populations cellulaires mixtes, notamment des cellules obtenues lors d'expériences de CRISPR/Cas9. Cette méthode se base sur une plateforme robotisée liée à un logiciel dédié et associée à des plaques de culture spéciales dont le fond des puits est recouvert de nanopuits. Ceux-ci permettent l'ensemencement et la croissance des cellules dans des espaces isolés mais tout en étant baigné dans un milieu commun. Dans un premier temps, nous avons démontré l'efficacité et la fiabilité de cette méthode en montrant qu'il est possible d'isoler des cellules au sein d'une population mixte, de suivre la croissance de ces cellules et de les collecter à l'aide du bras robotique. Ensuite, nous avons démontré l'intérêt de ce système pour l'isolation de cellules issues d'une expérience de CRISPR/Cas9 « classique » visant à induire des événements d'insertion et de délétion au sein du gène *ALMS1* mais également après une expérience d'édition de base visant à reproduire une mutation pathologique, toujours au sein d'*ALMS1*.

Ces résultats ont fait l'objet d'un article publié en avril 2023 dans la revue ***Stem Cell Research & Therapy*** présenté dans la section suivante.

### 3.1.2 Résultats (publication scientifique à partir de la page suivante)

METHOD

Open Access

# Semi-automated optimized method to isolate CRISPR/Cas9 edited human pluripotent stem cell clones



Elie Frank<sup>1,2</sup>, Michel Cailleret<sup>1,2</sup>, Constantin Nelep<sup>3</sup>, Pascal Fagner<sup>1,2,4</sup>, Jérôme Polentes<sup>1,2,4</sup>, Elise Herardot<sup>1,2</sup>, Lina El Kassar<sup>1,2,4</sup>, Karine Giraud-Triboulet<sup>1,2,4</sup>, Christelle Monville<sup>1,2\*</sup> and Karim Ben M'Barek<sup>1,2,4\*</sup> 

## Abstract

**Background** CRISPR/Cas9 editing systems are currently used to generate mutations in a particular gene to mimic a genetic disorder in vitro. Such “disease in a dish” models based on human pluripotent stem cells (hPSCs) offer the opportunity to have access to virtually all cell types of the human body. However, the generation of mutated hPSCs remains fastidious. Current CRISPR/Cas9 editing approaches lead to a mixed cell population containing simultaneously non-edited and a variety of edited cells. These edited hPSCs need therefore to be isolated through manual dilution cloning, which is time-consuming, labor intensive and tedious.

**Methods** Following CRISPR/Cas9 edition, we obtained a mixed cell population with various edited cells. We then used a semi-automated robotic platform to isolate single cell-derived clones.

**Results** We optimized CRISPR/Cas9 editing to knock out a representative gene and developed a semi-automated method for the clonal isolation of edited hPSCs. This method is faster and more reliable than current manual approaches.

**Conclusions** This novel method of hPSC clonal isolation will greatly improve and upscale the generation of edited hPSCs required for downstream applications including disease modeling and drug screening.

**Keywords** CRISPR/Cas9, Gene edition, Human pluripotent stem cell, Clonal isolation

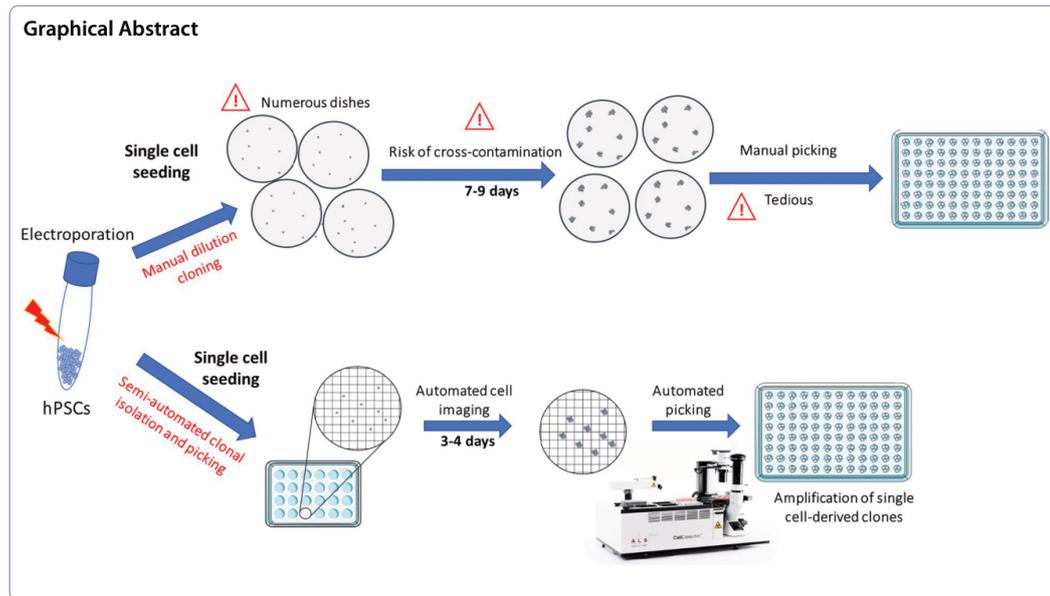
\*Correspondence:

Christelle Monville  
cmonville@istem.fr  
Karim Ben M'Barek  
kbenmbarek@istem.fr

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2023. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.



## Introduction

Disease modeling of human pathologies *in vitro* using human pluripotent stem cells (hPSCs) is exponentially increasing in the scientific community [15, 22]. While retaining self-renewal capacity allowing large-scale expansion, these cells hold the potential to give rise to any differentiated cell type of the adult body if appropriate signaling cues are provided [25]. Thus, hPSCs allow obtaining adult differentiated cells and tissues that would be difficult to obtain otherwise. Indeed, sampling specific cells or tissues from a patient can be traumatic or impossible to perform without taking the risk to cause irreparable damages (e.g., brain areas and retina). Moreover, some organs contain non-proliferating cells that cannot be cultured and amplified after sampling (e.g., neurons).

A variety of differentiation protocols from hPSCs *in vitro* were already developed to generate different adult cell types such as retinal pigment epithelial cells [20], photoreceptors [10], keratinocytes [13] or cardiomyocytes [29]. A drawback of hPSC disease modeling is the need for several genetic disease patient and control cell lines to decipher molecular pathological mechanisms of a specific gene. Gene edition technology overcomes these obstacles and isogenic hPSC models have been generated through gene edition to study the contribution of a specific mutation to a pathology in a controlled genetic background.

Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) and its CRISPR-associated protein Cas9 is a bacterial mechanism of adaptive immunity that can be used to edit DNA within living cells [1, 16]. Cas9 protein forms a complex with a selected guide RNA to induce a double-stranded break at a targeted locus. DNA repair processes engender a variety of insertions and deletions (indels) at the DNA cleavage site. These indels can result in the knockout of a selected gene. Alternatively, when a homologous DNA template is added concomitantly with CRISPR/Cas9-guide RNA complexes, DNA repair through homology-directed repair elicits a desired modification contained in the DNA template to correct a gene mutation or introduce a novel sequence. More recently, Komor et al. developed a base editor combining catalytically impaired Cas protein associated with a deaminase [18]. Such system allows precise base substitutions to mimic or correct point mutations associated to a pathology. Although recent updates of the CRISPR/Cas9 edition system have been published [23], this method is still limited by its maximum efficiency rate [21, 28]. Indeed, this rate can be variable and depends on guide RNA [23], on the type of Cas9 [17] as well as its delivery method [24, 28]. Therefore, following the gene edition of a cell population, isolation of clones is required to separate non-edited and different types of edited cells [7]. The standard approach consists of manual selection and harvesting of clones in culture dishes plated

with very low cell densities (dilution cloning) [12]. Such approach is time-consuming and labor intensive. In addition, there is a risk that clones could be a mixture of more than one cell. A risk that can be mitigated by two successive dilution clonings.

To overcome these limitations, we developed a novel approach to isolate single cells from a mixed cell population following CRISPR/Cas9 gene edition and to pick colonies derived from these isolated single cells. Our method relies on a semi-automated robotic platform (CellSelector™), which combines an epifluorescence microscope setup associated with a dedicated software allowing automated single cell identification and clonal follow-up, and a robotic arm to collect identified clones. We first showed that this semi-automated method is reliable to isolate single cell-derived clones without mixing cells during cell culture using dedicated Cellselector nanowell culture plates. Then, we demonstrated how this method could be applied for a CRISPR/Cas9 gene editing experiment in hiPSCs in order to model a genetic disorder: the Alström Syndrome (AS). This novel method is robust, easier and faster than standard dilution cloning and may be up scaled to generate various gene edition experiments at the same time.

## Methods

### hiPSCs culture

Wild-type hiPSCs PC056c2 were derived by Phenocell (Grasse, France) from human primary fibroblasts using Sendai vectors [2] and cultured with StemMACS iPS-Brew XF medium (Miltenyi Biotec) in vitronectin (Gibco-coated dishes). Culture medium was changed three times a week. Cells were passaged following gentle harvesting with EDTA 0.25 mM (Invitrogen every 5–7 days). For CRISPR/Cas9 editing experiments, hiPSCs were pretreated with a rock inhibitor (Y-27632; Tocris) at least one-hour prior transfection and harvested with an enzymatic treatment (Stempro Accutase cell dissociation reagent; Life technologies). Following amplification of single cell-derived clones, cells were banked using CryoStor CS10 (Sigma-Aldrich).

### CRISPR/Cas9 gene editing

For p.Glu192fs mutation, guide RNA (gRNA) was selected based on CRISPOR.org predictions [8]. Twenty possible gRNAs were proposed of which 18 gRNAs with a required MIT specificity score superior to 50. Of these 18 gRNAs, we selected one with both the higher Lindel score (prediction probability of frameshift) and the higher Doench'16 score (predicted cleavage efficiency). One hundred thirty-seven off-targets were predicted with up to four mismatches with the original guide sequence. Of these, the top 15 off-targets were not localized into

an exon. Integrated DNA Technologies (Iowa, USA) synthesized selected gRNA. hiPSCs were plated in 24-well plates at 80–120,000 cells per well. Lipid-based transfection was performed the next day with 15 μM of ribonucleoprotein (RNP) complexes (gRNA, SpCas9 protein), according to the manufacturer's protocol (Lipofectamine Stem Transfection Reagent, ThermoFisher Scientific). SpCas9 purified protein is a gift from Jean-Paul Concordet (MNHN-CNRS UMR 7196/INSERM U1154).

After enzymatic dissociation with Stempro Accutase (Life technologies), 150,000 hiPSCs in 7.5 μL of resuspension buffer (Neon Transfection Kit, Invitrogen) were mixed with 7.5 μL of RNP complexes. The mix was then electroporated at 1200 V/20 ms/2 pulses using 10 μL Neon Tips. For limiting dilution cloning experiments, the cell suspension was plated in several 100-mm culture dishes at different concentrations (1000/2000/5000/10,000 cells/dish). For semi-automated cell picking, cells were seeded in 6-well plates or directly seeded following electroporation in a vitronectin-coated nanowell plate at a density of 3000 cells per well.

For the base editing strategy, different pathogenic nonsense mutations were identified within *ALMS1* using the ClinVar database (NCBI). Among the identified mutations, we selected the p.Gln3613Ter mutation as it consists in a C→T nonsense mutation. A gRNA targeting this position was then designed using CRISPR RGEN Tools and synthesized by Integrated DNA Technologies (Iowa, USA).

After enzymatic dissociation with Stempro Accutase (Life technologies), 150,000 hiPSCs in 10 μL of resuspension buffer (Neon Transfection Kit, Invitrogen) were mixed with 10 μL of RNA AncBE4max (pCMV\_AncBE4max\_P2A\_GFP was a gift from David Liu (Addgene plasmid # 112100; <http://n2t.net/addgene:112100>; RRID: Addgene\_112100)) and 2.5 pmol gRNA. The mix was then electroporated using the same protocol. For semi-automated cell picking, cells were seeded in a vitronectin-coated nanowell plate at a density of 3,000 cells per well.

### Sequence analysis

Genomic DNA was extracted with QuickExtract DNA extraction solution (Lucigen) according to the manufacturer's instructions. PCR amplification corresponding to the edited DNA sequence (p.Glu192fs: forward primer: TATACACTGGCAGCGGCG; reverse primer: TCTGTAGAGACCTACTCAGAGGG; p.Gln3613Ter: forward primer: CCCGTACACCTACCAAGTGA; reverse primer: CATCATCGAGCTGGGAGGTC) was subjected to Sanger sequencing (Genewiz, Germany). To evaluate edition rates, decomposition of quantitative sequence

trace data was based on TIDE [4]. Sequence analysis was performed using Snapgene software (Insightful Science).

#### CellCelector clonal isolation

24-well nanowell plates (ALS, Germany) were coated with vitronectin (Gibco) and centrifugated for 5 min at 1258 g (to eliminate micro-bubbles) prior to incubation at 37 °C for 1 h. Approximately 3000 cells were seeded per well (4300 square-shaped nanowells in total in a well of a 24-well plate). Seeded cells are randomly distributed in nanowells following Poisson distribution resulting in ~30% of nanowells occupied with single cells.

After cell seeding, plates were centrifuged again for 3 min at 100 g to allow all cells to be captured in nanowells. Nanowells with seeded cells were automatically scanned on the CellCelector system (ALS, Germany) on D0 just after cell seeding. Identification of single cell nanowells on D0 was performed using a specific image analysis algorithm using CellCelector software (v3.1) including gating with single cell size and sphericity. At time of picking on D3-5, the nanowell plate was scanned again and the system automatically selected single cell-derived colonies based on their outgrowth. Selected single cell-derived colonies were detached with Stempro Accutase (Life technologies) just prior to picking run. Single-use CellCelector glass capillaries (ALS, Germany) with internal diameter of 80 µm with aspiration volume of 0.5 µL were used for picking. The tip of the capillary was calibrated at the height of approximately 80 µm from the bottom of nanowells. Colonies were deposited in a vitronectin-coated 96-well plate with 200 µL of StemMACS iPS-Brew XF medium (Miltenyi Biotec) containing rock inhibitor. Cell growth was followed using INCUCYTE S3 (Sartorius).

#### Flow cytometry

Cells were dissociated with TrypLE (ThermoFisher) and stained with TRA1-81-AF647 (Biolegend) or SSEA-4-PE (Miltenyi Biotec) and corresponding isotypes from the same suppliers. For intracellular markers, cells were fixed with 4% PFA following dissociation. Cells were treated with PBS 0.1% tritonX100 and then incubated overnight with OCT3/4 (Santa Cruz, sc-5279, 1:100) and LIN28A (R&D SYSTEMS, AF3757, 1:200). The day after, cells were washed and incubated with corresponding secondary antibodies (Invitrogen). Acquisitions were done with a MACSQuant analyzer (Miltenyi Biotec) and data were analyzed using the FlowJo software.

#### Immunofluorescence

After fixation with 4% PFA for 15 min at room temperature, cells were incubated overnight at 4 °C with the following primary antibodies: OCT3/4 (Santa Cruz,

sc-5279, 1:100), LIN28A (R&D SYSTEMS, AF3757, 1:200), Pericentrin (Abcam, ab28144, 1:200) and ALMS1 (Abcam, ab84892, 1:200). Appropriate Alexa fluorescent secondary antibodies (Invitrogen) and DAPI were added for 1 h. Image acquisitions were performed on a Zeiss LSM880-Airyscan Confocal Microscope driven by the Zeiss Zen black software.

#### Single-nucleotide polymorphism (SNP) analysis

High-quality genomic DNA was obtained with Nucleospin Tissue kit (Macherey Nagel) according to manufacturer instruction. gDNA hybridization was achieved on Infinium Core-24v1-2 BeadChip (Illumina). Data were analyzed with GenomeStudio v2.0.5 software (Illumina).

#### Multiplex fluorescence in situ hybridization (mFISH)

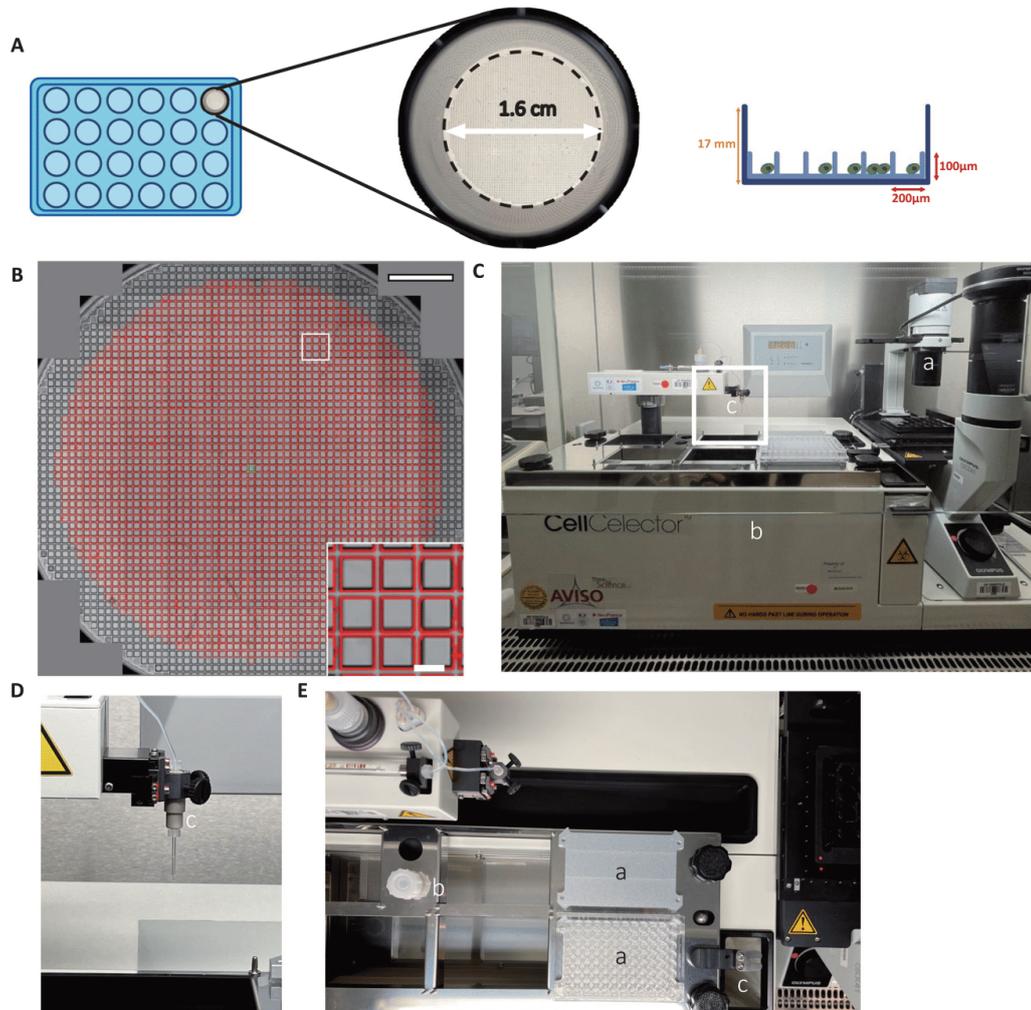
##### karyotype analysis

Cells were blocked in metaphase with colchicine (Eurobio) for 90 min and then they were detached with trypsin. After centrifugation, the supernatant was removed and cell pellet was suspended and warmed in a hypotonic solution for several minutes and then fixed with a Carnoy fixative. Drops of the cell suspension were spread on glass slides and let to dry. mFISH 24Xcite probe (MetaSystems) and ProLong Gold Antifade Mountant with DAPI (Thermo Fisher Scientific) were used for mFISH staining. Seventy metaphases were acquired with Metafer MetaSystems software coupled to an AxioImager Zeiss Z2 microscope furnished with a camera cool cube and 10X and 63X objectives. Images were analyzed with Isis software (MetaSystems).

## Results

### Accurate algorithmic identification of square-shaped nanowells

Current hPSC culture methods involve passaging as small clumps/aggregates to prevent cell death or cellular stress and to prevent the risk of genetic alterations [11]. Following gene edition, hPSCs need to be isolated as single cells for further clonal isolation and genotype selection. To minimize space taken by many culture dishes seeded at low cell dilution, we used one well of a 24-well plate (Fig. 1A). This well is micro-structured with square nanowells (volume of approximately 4 nL). In that context, the presence of nanowells allows to increase cell density in the well, while keeping single cells efficiently separated from each other by nanowell walls, yet covered by the same medium. This enables to co-culture in adherence cells in the same large macro-well while maintaining their monoclonality. Endogenous factors secreted by hPSCs that favor pluripotency and support clonal proliferation may be more concentrated, reducing therefore cellular stress [14].



**Fig. 1** Algorithm identification of square-shaped nanowells. **A** Illustration of a CellCelector 24-well nanowell plate. Each nanowell forms a square ( $200 \times 200 \mu\text{m}$ ) delimited by  $100 \mu\text{m}$  height walls. Well diameter = 1.6 cm. **B** Automated segmentation of nanowells in the automatically stitched whole well image. In each representative well, the software identifies by segmentation 2263 square-shaped nanowells (1 mm peripheral region of the well is not analyzed). Each identified nanowell is surrounded by red lines and assigned a unique ID for traceability through the experiment. Insert corresponds to magnified area. Scale bar = 2 mm and for magnification =  $200 \mu\text{m}$ . **C**. Overview of the CellCelector™ system: (a) inverted fluorescence microscope and motorized stage; (b) platform to receive destination plates and (c) cell picking robotized arm with high-precision glass capillary (magnification in **D**). **E** Upper view of the robotic system: the platform is composed of dedicated areas: (a) destination plates, (b) sterilization tank and (c) waste container

We evaluated first the ability of the software algorithm to isolate individual nanowells. The algorithm was able to recognize and segment  $2031 \pm 34$  individual squares

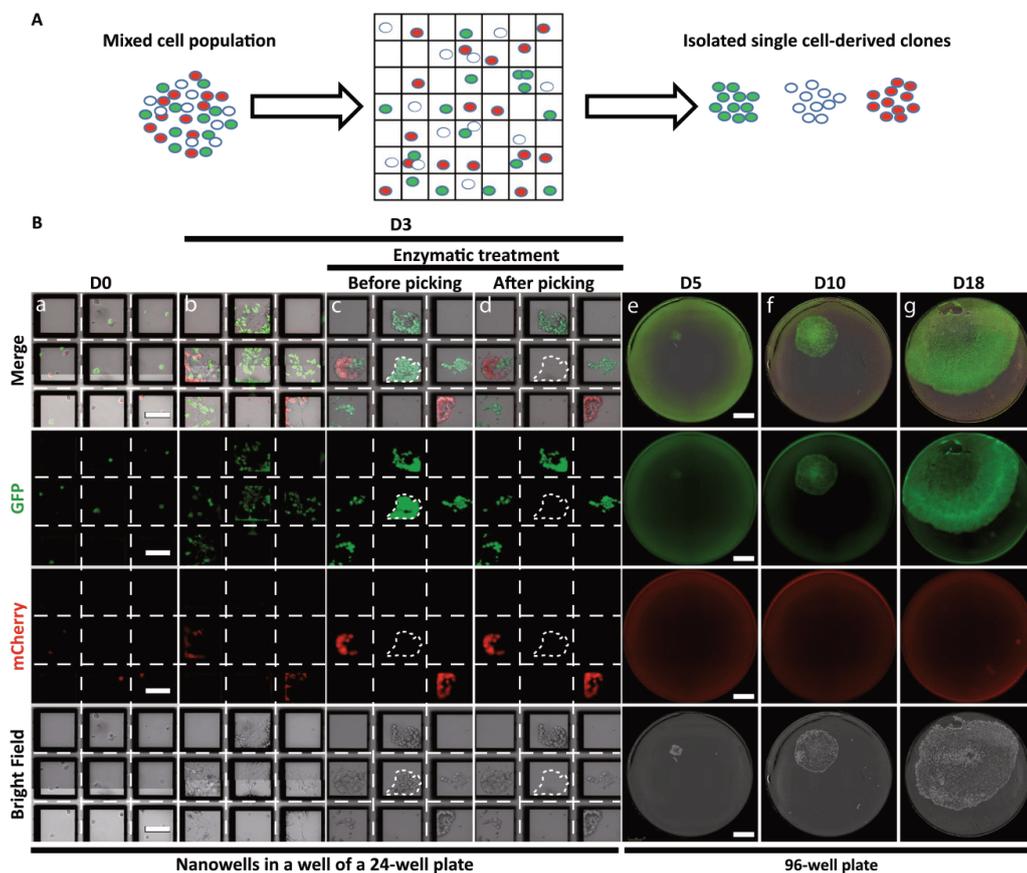
in a well of a 24-well plate (Fig. 1B). Thus, this number corresponds to theoretical single cells that can grow

separately in each individual identified nanowells to form clones that can be collected.

#### Single cells grow in adherence inside nanowells and form colonies pickable using a robotized arm

To identify single cells in nanowells and collect single cell-derived clones, we used the CellCelector™ automated system composed of a standard inverted fluorescent microscope equipped with a camera, a motorized stage and a robotized arm with a mounted thin glass capillary (Fig. 1C–E). This system is associated with a software

that allows precise detection of single cells in nanowells and selection of single cell-derived colonies. In order to validate the ability of this system to recognize, select and pick hPSC clones, we generated two knock-in hPSC lines with constitutive expression of GFP or mCherry, the transgenes being inserted into adeno-associated virus integration site 1 (AAVSI) locus (Additional file 1: Fig. S1). We then mixed in equal proportions label-free, GFP- and mCherry-expressing hPSCs before seeding them as single cells into square-shaped nanowells (Fig. 2A). After cell seeding on day zero (D0), the integrated imaging



**Fig. 2** Automated isolation of single cell-derived clones in nanowells. **A** Schematic representation of the automated isolation of single cell-derived hPSC clones. A mixed population of label-free, mCherry- and GFP-labeled hiPSCs are mixed (1:1:1) prior single cell seeding into nanowell plates and automated clone picking. **B** Representative images of label-free hiPSCs, GFP-hiPSCs and mCherry-hiPSCs seeded as single cells at day 0 (D0; a), at 3 days (D3) of culture within nanowells (b), after enzymatic treatment to harvest clones (c) and after picking by the automated arm of the CellCelector™ (d). The selected square-shaped micro-pattern for picking is at the center of the image. The picked single cell-derived clone is highlighted with dotted lines in panels (c) and (d). Following picking, colonies are deposited into a 96-well plate where their growth is followed by imaging at D5, D10 and D18 (e, f, g). Scale bar in 24-well plate images = 100  $\mu$ m; scale bar in 96-well plate images = 500  $\mu$ m

setup scanned the seeded wells to automatically identify nanowells containing only one cell, thus providing a robust and documented image-based monoclonality proof (Fig. 2B). On day 3 (D3), a second scan was performed to automatically identify grown hPSC colonies derived from single cells according to the spatial position of each nanowell in the well. An enzymatic treatment with Accutase<sup>®</sup> was applied to gently harvest colonies that grew in adherence. The robotic arm was then used to collect selected single cell-derived clones and to transfer them into a new 96-well culture plate (Additional file 2: Movie 1). Following a few additional days of proliferation, cells were imaged and analyzed for single cell clonality. We showed that this semi-automated system selectively picked colonies without contamination from neighboring cells (expressing another fluorescent protein or without fluorescence) and/or significant loss of cell survival during the collection process.

#### No cross-contamination following sequential cell colony picking using the same capillary

As the glass capillary is not changed between each individual picks, we evaluated if using the same capillary to pick several single cell-derived colonies sequentially would result in any cross-contamination (Fig. 3). We collected single cell-derived colonies of different single labeling (label-free, GFP or mCherry fluorescence). We did not observe fluorescent color mixing between different consecutive single cell-derived clone pickings and amplification. Thus, we showed that sequential picking of different colonies did not induce cross-contamination.

#### CRISPR/Cas9 gene edited hPSCs are efficiently isolated using a semi-automated method

As a proof of concept, we selected the *ALMS1* gene for CRISPR/Cas9 editing to create a Knockout model of AS. *ALMS1* is composed of 23 exons and codes for a protein of 4169 amino acids [9]. We targeted the exon 3 (near the 5' end of the coding region) to identify potential guide RNAs for CRISPR/Cas9 edition for which indels may cause a major deletion into the resulting protein. Based on in silico analysis, we selected a guide RNA out of 20 with best-predicted performances (Fig. 4B). We evaluated the efficiency of gene edition using either electroporation or lipofection approaches using this same guide RNA. Sequence analysis of edited cell pools revealed that electroporation engendered significantly more indels than lipofection (77% versus 19% respectively; Fig. 4C).

(See figure on next page.)

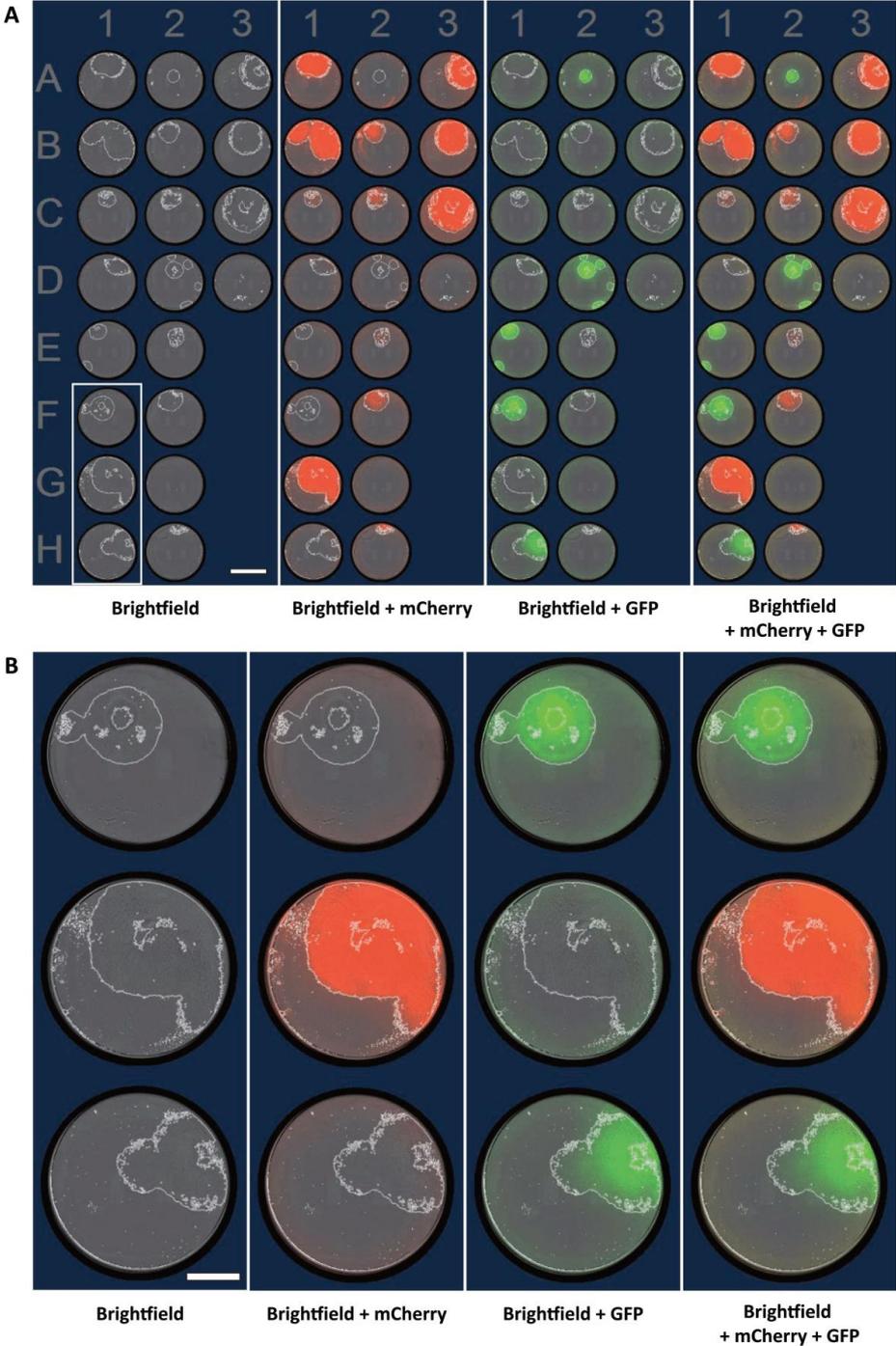
**Fig. 3** Sequential automated picking of single cell-derived clones does not engender cross-contamination. **A** Representative images of 96-well plate containing single cell-derived colonies 11 days after automated cell picking. The picking order started from A1 to H1, A2 to H2 and finally A3 to D3. Colonies are surrounded with white lines. Scale bar = 4 cm. **B** Magnification of wells F1, G1 and H1. Picking order started from F1 to H1. Scale bar = 2 cm

Following sequence trace decomposition of SANGER sequencing, we estimated the frequency and types of indels. Lipofection induced a diversity of indels at low frequencies whereas electroporation with the same guide engendered mostly one nucleotide insertion (thymine, Fig. 4D, E). This last type of edition *ALMS1* p.Glu192fs was predicted to induce a frameshift that can lead to a premature stop codon (resulting in a shortened protein of 220 amino acids; Fig. 4F). We then dissociated this edited hPSCs population as single cell and seeded the cells in square-shaped nanowells. Single cell-derived colonies were identified by the software algorithm and picked using the CellCeletor<sup>™</sup> robot. Sequence analysis of single cell-derived clones allowed to detect pure clones bearing the desired mutation (+1 insertion; Fig. 4G).

#### CRISPR/Cas9 gene edited clones maintained their pluripotency and genetic integrity following isolation and banking

Single cell-derived hPSC clones of interest were amplified and banked. We then evaluated the pluripotency state and genomic integrity of hPSCs following gene edition, semi-automated clonal isolation and cell banking of amplified clones. Using immunofluorescence for pluripotency markers, we showed that isolated clones maintained a pluripotency state as evaluated by the expression of OCT3/4 and LIN28 (Fig. 5A). Flow cytometry analysis for cell surface markers Tra1-81 and SSEA-4 confirmed also pluripotency (Fig. 5C). Genomic integrity was evaluated by karyotype and single-nucleotide polymorphism (SNP) comparison between parental hPSCs and edited clones following amplification and banking (Fig. 5B and Additional file 3: Fig. S2). We did not find neither chromosomal aberrations nor genetic variations between parental and the majority of edited cell lines, suggesting that genomic integrity was preserved during the process. We next evaluated by immunofluorescence the presence of *ALMS1*. The protein was present at the centrosome (co-expression with Pericentrin) in both WT and edited cells (Fig. 5D). Thus, the in silico prediction was not verified with this particular mutation as the antibody epitope is localized after the mutation.

We also applied this semi-automated method to isolated CRISPR/Cas9 gene edited clones obtained with a base editing approach. We identified a guide RNA to induce a base substitution at a key locus that engenders a premature termination codon (*ALMS1* p.Gln3613Ter) (Fig. 6A). This point mutation is a phenocopy of an



**Fig. 3** (See legend on previous page.)

already identified pathological mutation (CLINVAR NCBI website). We edited cells using an electroporation approach. Sequence trace decomposition of SANGER sequencing revealed a base editing rate of 78% (Fig. 6B). After edition, single cells were seeded into nanowells and single cell-derived colonies were collected 3–4 days later. Colonies were banked and analyzed for pluripotency markers (immunofluorescence and flow cytometry; Fig. 6C–E), and genetic integrity (karyotype and SNP comparison to original hiPSCs; Fig. 6H). Base editing and clonal isolation did not affect cell quality. Immunofluorescence for ALMS1 revealed the absence of the protein in edited cell confirming the protein loss (Fig. 6F, G).

### Discussion

Herein, we developed a semi-automated method to isolate single cell-derived hPSC clones cultured in adherence. Dissociated cells were seeded into square-shaped nanowells inside wells of a 24-well plate. We identified single cells and followed their proliferation for several days with microscopic image recordings to ensure the traceability of clonality. Colonies were then picked up using a robotic arm and subcultured into new culture plates. We successfully implemented this method to isolate single cell-derived clones from CRISPR/Cas9 gene edited hPSCs. Finally, we developed a simple workflow from hPSC gene editing to clonal isolation and cell banking (Fig. 4A).

Current standard clonal isolation of hPSCs involves dissociation as single cells and manual dilution at very low cell density in numerous culture dishes. This approach is tedious and labor-intensive. Our semi-automated clonal isolation method is faster and more robust than standard dilution cloning. Firstly, we reduce the burden of handling numerous culture dishes by using only one nanowell-containing well of a 24-well plate for each type of cell line/experiment. Indeed, beside the method used to isolate single cells, all cells will not recover and form colonies: an estimation of 1% of hPSCs may survive [27]. This survival rate is improved up to 27% with the addition of rock inhibitor [27]. Thus, the cell culture in micro-pattern nanowells allows the selection and amplification

of potentially 2000 collectable single cells in the same well of a 24-well plate (corresponding to twenty 96-well plates). Our method does not improve survival rates but increases the number of cells followed (throughput) to diminish the effects of these losses. Using this approach, only cells that are proliferative, are subsequently collected and subcultured into new plates. Our strategy is therefore different from cell dispensers or cell sorters that dispatch single cells in wells of 96-well plates or equivalent [5, 26].

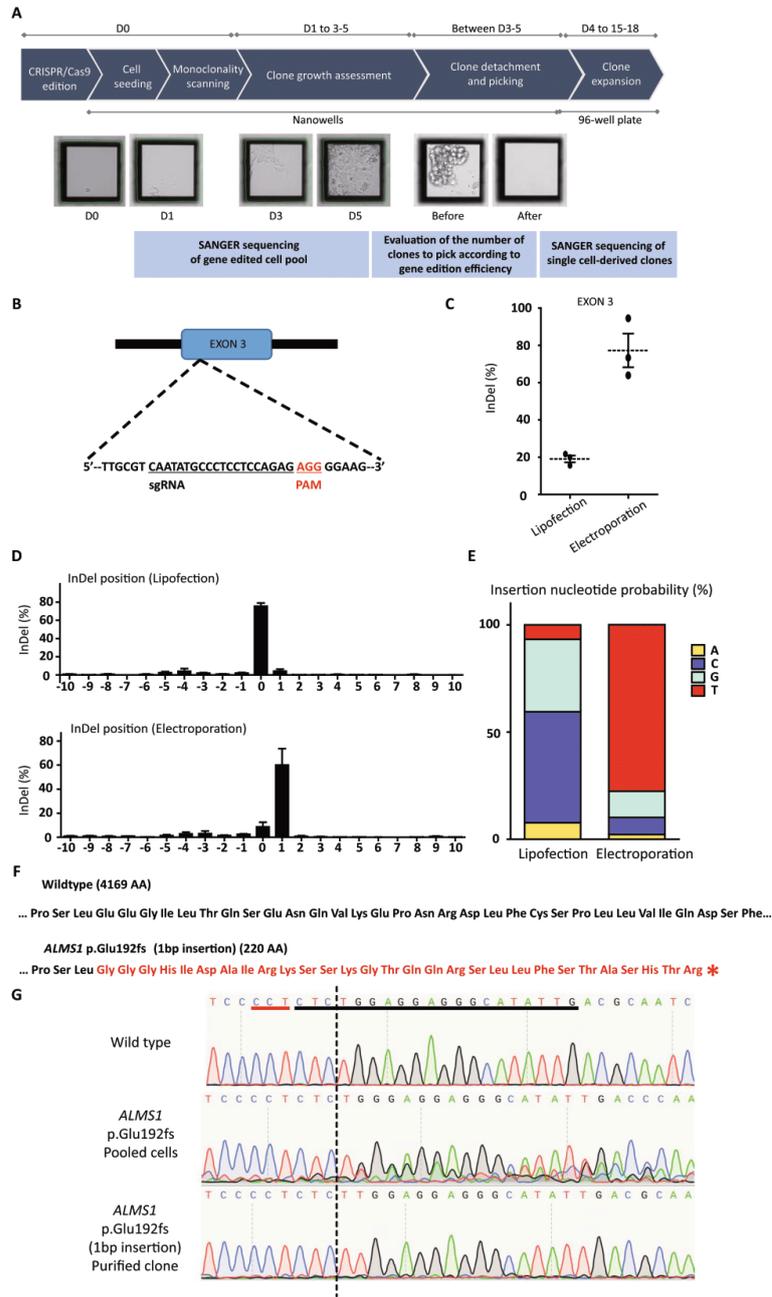
Secondly, nanowells allow the separation of one cell from another and a microscopic image allows the follow-up of each single cell growing as a new colony (traceability of clonality). At the opposite, traceability of cultured cells is limited when cells are dispatched with dilution cloning without using adapted separating wells: hPSCs are susceptible to migrate, proliferate and form colonies that could further split into two other colonies or could fuse to form mixed colonies [6]. This risk of non-clonal colony formation is mitigated by low-density cell seeding [19]. Some protocols even recommend two sequential manual dilution clonings to ensure single cell-derived colonies [3].

Thirdly, identified single cell-derived colonies are picked and subcultured based on acquired microscopy images with a robotic arm. This automated picking is an advantage as it suppresses human manipulations and associated risks (fungi/bacterial contamination, picking errors).

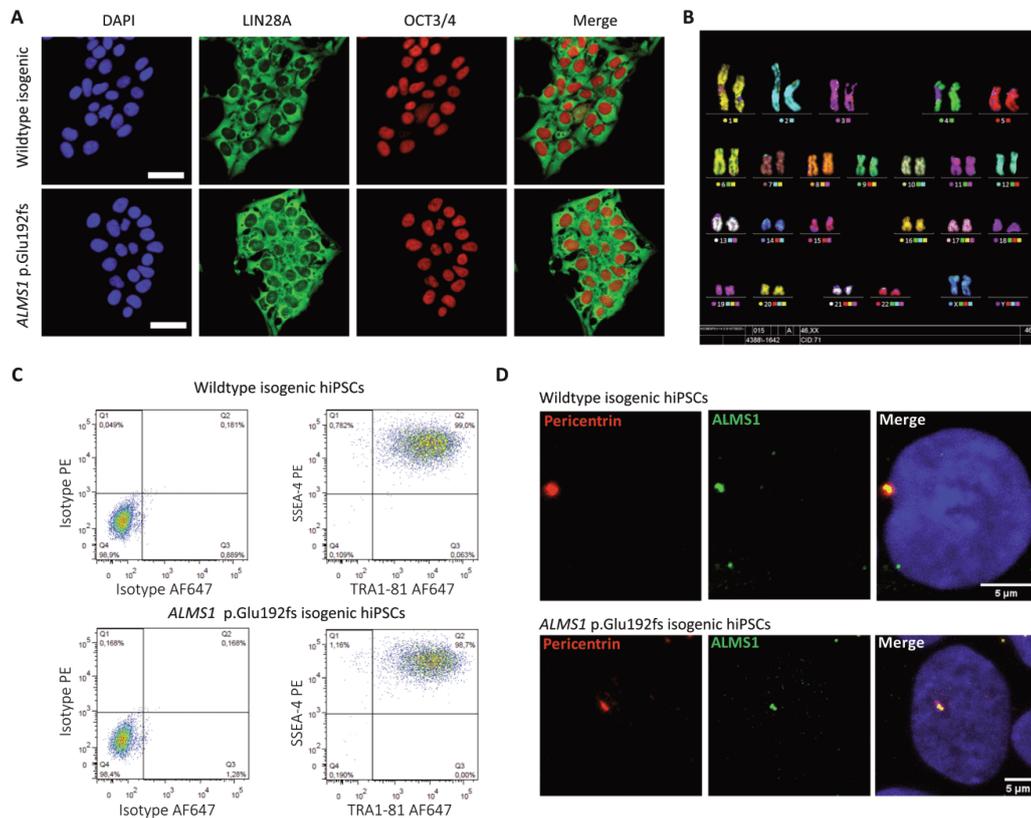
Efficiency of gene editing using CRISPR/Cas9 or other editing strategies is variable and depends on numerous factors (*e.g.*, gene locus, Cas9 variant, gRNA, etc.). When editing efficiency is low, a high number of clones need to be isolated to obtain the few clones that are homozygotes for the desired mutation [5]. Thus, some protocols combined CRISPR/Cas9 editing with fluorescence-activated cell sorting to isolate single cell-derived clones into wells of 96-well plates [5]. This engenders the handling of an important number of plates. In addition, in this context, cell sorting is stressful and cell survival is low (about 29–47% of sorted cells will form colonies). Our semi-automatic method

(See figure on next page.)

**Fig. 4** Induction of a frameshift mutation in ALMS1 with CRISPR/Cas9 gene editing. **A** Workflow from gene edition to single cell-derived clone semi-automated isolation and amplification. **B** Schematic representation of the targeted area (exon 3 of ALMS1 gene) by CRISPR/ Cas9 with the selected gRNA. PAM = protospacer adjacent motif. **C** Quantification of the percentage of indels following CRISPR/Cas9 according to the mode of transfection. Electroporation method leads to a higher rate of indel events within the cell population compared to lipofection. **D** Evaluation of the percentage of indels according to the nucleotide position. (0 corresponds to the Cas9 cleavage site). **E** Evaluation of the probability of nucleotide insertion according to the type of transfection based on sequencing results. **F** Comparison of the predicted amino acid sequence of ALMS1 protein in WT cells and KO purified clones (with + 1 bp insertion). Following gene edition, the sequence of amino acids is modified (red letters) and a STOP codon appears quickly downstream of the insertion site (red star). **G** Sequences of the site of gene edition before CRISPR/Cas9 editing (wild type); following edition in a representative edited cell population (knock out pooled cells), and in a representative single cell-derived clone using the semi-automated method. The gRNA is underlined in black and the PAM motif in red. The dotted black line corresponds to the Cas9 cleavage site. Mean of 3 independent experiments



**Fig. 4** (See legend on previous page.)



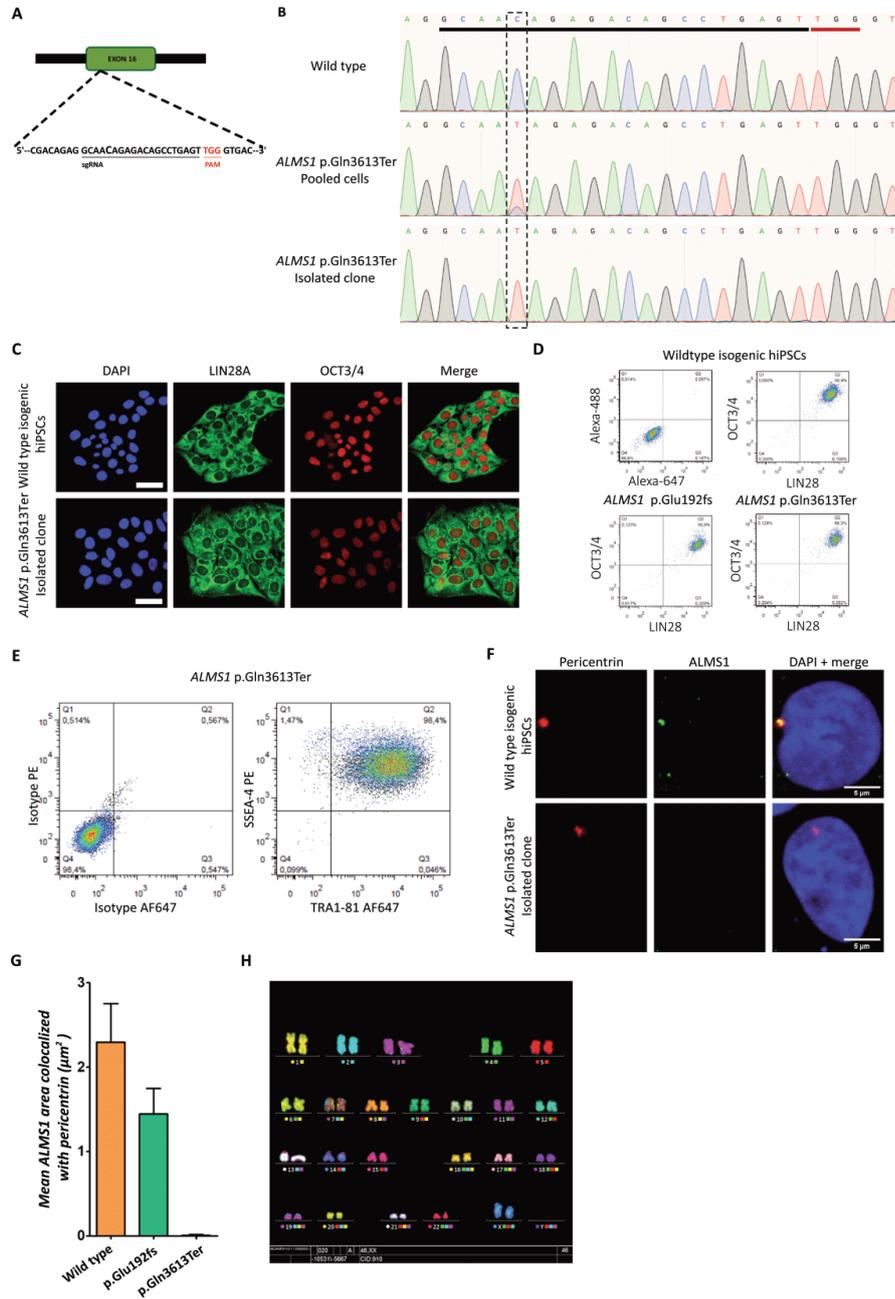
**Fig. 5** Single cell-derived clones CRISPR/Cas9 edited remain pluripotent and without genomic aberrations. **A** Immunofluorescence images of hPSC colonies (WT before selection and p.Glu192fs purified clone) stained for pluripotency markers OCT3/4 (red) and LIN28A (green). Scale bar = 50  $\mu$ m. **B** Karyotype of a p.Glu192fs purified clone. **C** Flow cytometry analysis of pluripotency markers TRA1-81 and SSEA-4 on WT before selection (upper panel) and p.Glu192fs hPSCs (lower panel). **D** Immunofluorescence images of hPSCs stained for Pericentrin (red) and ALMS1 (green). Scale bar = 5  $\mu$ m

(See figure on next page.)

**Fig. 6** CRISPR/Cas9 base edition and single cell-derived clone characterization. **A** Schematic representation of the region (exon 16 in ALMS1 gene) targeted by CRISPR/Cas9 with the selected gRNA. **B** SANGER sequences of the site of edition before CRISPR/Cas9 base edition (WT before selection; upper panel), following edition in a representative edited cell population (pooled cells; middle panel), and in a representative single cell-derived clone using the semi-automated method (lower panel). The gRNA is underlined in black and the PAM motif in red. The dotted rectangle corresponds to the position targeted for base editing. **C** Immunofluorescence assay using pluripotency markers (OCT3/4 and LIN28A) on WT before selection and p.Gln3613Ter purified hPSC clone (lower panel). Scale bar = 50  $\mu$ m. **D, E** Evaluation of pluripotency of p.Gln3613Ter and p.Glu192fs hPSCs by flow cytometry (pluripotency markers OCT3/4 and LIN28A (**D**) and TRA1-81 and SSEA-4 (**E**)). **F** Immunofluorescence assay showing the expression of Pericentrin (red) and ALMS1 (green) on WT (upper panel) and p.Gln3613Ter purified hPSC clone (lower). Scale bar = 5  $\mu$ m. **G** Quantification of ALMS1 area ( $\mu$ m<sup>2</sup>) co-localized with Pericentrin according to the genotype (wild type, p.Glu192fs, p.Gln3613Ter). **H** Karyotype of the p.Gln3613Ter purified hPSC clone

is particularly adapted to such experiments with the combination of nanowell cultures and automated picking. We developed a workflow from gene edition and seeding on the same day in nanowells to the automated

picking and subculture into new plates. In particular, the time interval between cell seeding and picking (3–4 days) allows to analyze the pool of edited cells to estimate edition efficiency and adapt accordingly the



**Fig. 6** (See legend on previous page.)

number of single cell-derived clones to collect. Of note, additional testing may be required to fully demonstrate pluripotency of the cells that have undergone the whole selection process (ability to differentiate into the three germ layers).

Finally, the workflow that we developed is compatible with upscaling and several gene edition experiments can be performed at the same time in different wells of 24-well plate (each well being treated independently). Following amplification of single cell-derived hPSC clones, these cells can be used for downstream applications including identification of molecular mechanisms or high throughput drug screenings.

## Conclusions

We developed a semi-automated method to isolate reliably single cell-derived clones following gene edition with reduced manual handling, reduced number of culture dishes and increased traceability. This method is completely different from other automated methods that essentially rely on cell dispensers' strategies following gene edition into 96-well plates. This new semi-automated method will be useful for the hPSC research community allowing efficient generation of hPSCs modeling genetic disorders or for the study of gene functions.

## Abbreviations

|        |   |
|--------|---|
| hPSCs  | Human pluripotent stem cells                              |
| CRISPR | Clustered regularly interspaced short palindromic repeats |
| Indels | Insertions and deletions                                  |
| DNA    | Deoxyribonucleic acid                                     |
| RNA    | Ribonucleic acid  |
| AS     | Alström syndrome  |
| gRNA   | Guide RNA   |
| RNP    | Ribonucleoprotein   |
| SNP    | Single-nucleotide polymorphism                            |
| mFISH  | Multiplex fluorescence in situ hybridization              |

## Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s13287-023-03327-2>.

**Additional file 1: Fig. S1.** Upper panel: Design of CRISPR/Cas9 edition into AAVS1 locus and donor DNA insertion to generate hiPSCs with constitutive expression of GFP and mCherry. Middle panel: Flow cytometry analysis of pluripotency markers SSEA-4 and TRA1-81 of edited hiPSCs. Lower panel: Images of edited hiPSCs with constitutive expression of GFP or mCherry.

**Additional file 2: Movie 1.** Automated picking of single cell-derived hiPSC clones and seeding into new plates.

**Additional file 3: Fig. S2.** A Single-nucleotide polymorphism-comparative analysis of parental cells and a representative edited single cell-derived hiPSC clone. B Table recapitulating the comparative analysis of original hiPSCs and clones derived with ALMS1 p.Glu192fs and ALMS1 p.Gln3613Ter mutations. C Number of clones analyzed for SNPs according to the CRISPR/Cas9 experiment.

## Acknowledgements

Some elements of figures were created using Servier Medical Art templates (<https://smart.servier.com>), which are licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Un-ported License. The authors greatly acknowledge Peggy SANATINE from institute GENETHON, part of the OCCIGEN facility of Genopole (Evry, France), first French biocluster dedicated to genetic diseases and biotherapies, for precious help in the cell sorting of fluorescent cells.

## Author contributions

EF, MC performed experiments related to gene edition, cell culture, IF, automated clonal isolation; CN set up single cell analysis with CellCelector software; PF performed and analyzed experiments to produce hPSCs with constitutive GFP or mCherry expression; JP analyzed immunofluorescence images; EH performed flow cytometry experiments; LEK and KGT performed experiments and analyzed genomic integrity of hPSCs; EF, MC, CM, KB designed the study and discussed the data. EF, CM, KB wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Funding

E.F. is recipient of a Ph.D. fellowship from the French Ministry of Higher Education and Research. I-Stem is part of the Biotherapies Institute for Rare Diseases supported by the Association Française contre les Myopathies (AFM)-Téléthon. The funding bodies played no role in the design of the study and collection, analysis and interpretation of data and in writing the manuscript.

## Availability of data and materials

Data and cell materials presented in this study are available upon request. SANGER sequences and SNP datasets are available at Mendeley data (<https://doi.org/10.17632/s94y6mw87f.1>).

## Declarations

### Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

### Consent for publication

Not applicable.

### Competing interests

C.N. is an employee of ALS Automated Lab Solutions GmbH. All other authors declare no competing interests.

### Author details

<sup>1</sup>INSERM U861, I-Stem, AFM, Institute for Stem cell Therapy and Exploration of Monogenic Diseases, 91100 Corbeil-Essonnes, France. <sup>2</sup>U861, I-Stem, AFM, Université Paris-Saclay, Université d'Evry, 91100 Corbeil-Essonnes, France. <sup>3</sup>ALS Automated Lab Solutions GmbH, 07745 Jena, Germany. <sup>4</sup>CECS, Centre d'étude des cellules souches, 91100 Corbeil-Essonnes, France.

Received: 14 December 2022 Accepted: 4 April 2023

Published online: 27 April 2023

## References

1. Asmamaw M, Zawdie B. Mechanism and applications of CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *Biol Targets Ther.* 2021;15:353–61.
2. Barrault L, Gide J, Qing T, Lesueur L, Tost J, Denis JA, Caillieret M, Aubry L, Peschanski M, Martinat C, et al. Expression of miRNAs from the imprinted DLK1/DIO3 locus signals the osteogenic potential of human pluripotent stem cells. *Cells.* 2019;8:1523.
3. Bower OJ, McCarthy A, Lea RA, Alanis-Lobato G, Zohren J, Gerri C, Turner JMA, Niakan KK. Generating CRISPR-Cas9-mediated null mutations and screening targeting efficiency in human pluripotent stem cells. *Curr Protoc.* 2021;1:e232.
4. Brinkman EK, Chen T, Amendola M, van Steensel B. Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:e168.
5. Caillaud A, Leveque A, Thedrez A, Girardeau A, Canac R, Bray L, Baudic M, Barc J, Gaborit N, Lamirault G, et al. FACS-assisted CRISPR-Cas9

- genome editing of human induced pluripotent stem cells. *STAR Protoc.* 2022;3:101680.
6. Chang J, Kim MH, Agung E, Senda S, Kino-Oka M. Effect of migratory behaviors on human induced pluripotent stem cell colony formation on different extracellular matrix proteins. *Regen Ther.* 2019;10:27–35.
  7. Choi DK, Kim YK, HoonYu J, Min SH, Park SW. Genome editing of hPSCs: Recent progress in hPSC-based disease modeling for understanding disease mechanisms. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2021;181:271–87.
  8. Concordet JP, Haessler M. CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Res.* 2018;46:W242–5.
  9. Eintracht J, Forsythe E, May-Simera H, Moosajee M. Translational readthrough of ciliopathy genes BBS2 and ALMS1 restores protein, ciliogenesis and function in patient fibroblasts. *EBioMedicine.* 2021;70:103515.
  10. Gagliardi G, Ben M'Barek K, Goureau O. Photoreceptor cell replacement in macular degeneration and retinitis pigmentosa: a pluripotent stem cell-based approach. *Prog Retin Eye Res.* 2019;71:1–25.
  11. Garitaonandia I, Amir H, Boscolo FS, Wambua GK, Schultheisz HL, Sabatini K, Morey R, Waltz S, Wang YC, Tran H, et al. Increased risk of genetic and epigenetic instability in human embryonic stem cells associated with specific culture conditions. *PLoS ONE.* 2015;10:e0118307.
  12. Giuliano CJ, Lin A, Girish V, Sheltzer JM. Generating single cell-derived knockout clones in mammalian cells with CRISPR/Cas9. *Curr Protoc Mol Biol.* 2019;128:e100.
  13. Guenou H, Nissan X, Larcher F, Feteira J, Lemaitre G, Saidani M, Del Rio M, Barrault CC, Bernard FX, Peschanski M, et al. Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study. *Lancet.* 2009;374:1745–53.
  14. Hsiao C, Palecek SP. Microwell regulation of pluripotent stem cell self-renewal and differentiation. *BioNanoScience.* 2012;2:266–76.
  15. Jang J, Yoo JE, Lee JA, Lee DR, Kim JY, Huh YJ, Kim DS, Park CY, Hwang DY, Kim HS, et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells: a platform for human disease modeling and drug discovery. *Exp Mol Med.* 2012;44:202–13.
  16. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* 2012;337:816–21.
  17. Koblan LW, Doman JL, Wilson C, Levy JM, Tay T, Newby GA, Maianti JP, Raguram A, Liu DR. Improving cytidine and adenine base editors by expression optimization and ancestral reconstruction. *Nat Biotechnol.* 2018;36:843–6.
  18. Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature.* 2016;533:420–4.
  19. Li L, Wang BH, Wang S, Moalim-Nour L, Mohib K, Lohnes D, Wang L. Individual cell movement, asymmetric colony expansion, rho-associated kinase, and E-cadherin impact the clonogenicity of human embryonic stem cells. *Biophys J.* 2010;98:2442–51.
  20. Morizur L, Herardot E, Monville C, Ben MK. Human pluripotent stem cells: a toolbox to understand and treat retinal degeneration. *Mol Cell Neurosci.* 2020;107:103523.
  21. Peng R, Lin G, Li J. Potential pitfalls of CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *FEBS J.* 2016;283:1218–31.
  22. Rowe RG, Daley GQ. Induced pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nat Rev Genet.* 2019;20:377–88.
  23. Shivram H, Cress BF, Knott GJ, Doudna JA. Controlling and enhancing CRISPR systems. *Nat Chem Biol.* 2021;17:10–9.
  24. Sondergaard JN, Geng K, Sommerauer C, Atanasoai I, Yin X, Kutter C. Successful delivery of large-size CRISPR/Cas9 vectors in hard-to-transfect human cells using small plasmids. *Commun Biol.* 2020;3:319.
  25. 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;131:861–72.
  26. Vallone VF, Telugu NS, Fischer I, Miller D, Schommer S, Diecke S, Stachelscheid H. Methods for automated single cell isolation and sub-cloning of human pluripotent stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol.* 2020;55:e123.
  27. Watanabe K, Ueno M, Kamiya D, Nishiyama A, Matsumura M, Wataya T, Takahashi JB, Nishikawa S, Nishikawa S, Murguruma K, et al. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2007;25:681–6.
  28. Yan J, Kang DD, Dong Y. Harnessing lipid nanoparticles for efficient CRISPR delivery. *Biomater Sci.* 2021;9:6001–11.
  29. Yang L, Soonpaa MH, Adler ED, Roepke TK, Kattman SJ, Kennedy M, Hencckaerts E, Bonham K, Abbott GW, Linden RM, et al. Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population. *Nature.* 2008;453:524–8.

### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)



### 3.1.3 Discussion

Dans cette étude, nous avons mis au point une nouvelle technique visant à faciliter l'étape d'isolation et de purification des populations cellulaires mixtes issues d'expériences d'édition génomique par CRISPR/Cas9. Cette technique repose sur un système automatisé combinant un bras robotisé, un logiciel lié à un algorithme d'analyse et de suivi et des plaques de culture spéciales tapissées de nanopuits dans lesquels les cellules uniques peuvent être cultivées.

A l'heure actuelle, outre les approches entièrement manuelles de dilution clonale, il n'existe que des systèmes de distribution automatisé de cellules uniques dans des plaques de culture 96-puits. Après l'ensemencement des plaques, il faut alors attendre que ces cellules forment des colonies sans risque de mélange (Caillaud et al. 2022; Vallone et al. 2020), l'inconvénient étant que les CSPih ont du mal à pousser quand elles sont isolées. Par conséquent, le rendement (nombre de colonies obtenues) est faible. Contrairement à ces approches de distribution de cellules, notre méthode présente l'avantage de laisser les cellules uniques pousser en colonies de façon individuelle et sans risque de mélange tout en partageant un milieu de culture commun avant d'être distribuées en plaque 96-puits. Cela permet ainsi aux cellules de profiter de facteurs de survie extracellulaires sécrétées par les autres cellules et de réduire le stress cellulaire (Alberts et al. 2002). Présenté récemment, un autre système d'isolation cellulaire, le CellRaft AIR, adopte une stratégie similaire à celle du CellCelector en isolant les cellules à l'aide des parois de nanopuits au sein d'un puit plus large (Stern et al. 2022). Néanmoins, contrairement à notre étude, l'article présentant ce système ne mentionne pas d'expérience d'isolation de CSPih éditées par CRISPR/Cas9. Dans notre système, l'algorithme du logiciel permet d'identifier les colonies issues de cellules uniques et de les collecter à l'aide du bras robotisé pour les transférer en plaque de

culture classique ou elles peuvent poursuivre leur croissance. Les colonies survivent à cette étape et bien que le bras robotisé soit le même d'une colonie à l'autre, aucun mélange de colonies au cours des différents prélèvements n'est constaté.

La méthode développée à l'aide du CellCelector permet d'isoler des cellules au sein d'une population mixte en l'espace de 3 à 4 jours contre 7 à 8 jours pour la méthode de dilution clonale. Notre méthode est donc plus rapide et nécessite moins de manipulations par l'expérimentateur. De plus, étant donné le nombre de nanopuits tapissant le fond des puits, il est potentiellement possible de collecter jusqu'à 2000 colonies issues de cellules individuelles. L'avantage de cette méthode est donc important notamment pour des expériences d'édition par CRISPR/Cas9 ayant un faible taux d'édition et nécessitant l'isolation d'un nombre important de clones. Ainsi, notre méthode a été testée après édition par CRISPR/Cas9 en utilisant deux sgRNA différents ciblant deux positions différentes d'*ALMS1*. Pour l'une des positions une Cas9 classique a été utilisée tandis que dans l'autre cas, une Cas9 permettant l'édition de base a été utilisée. Deux méthodes de transfection ont été utilisées, la lipofection et l'électroporation. Notre étude conclue qu'avec les sgRNA utilisés et les positions ciblées, l'électroporation est plus efficace que la lipofection pour l'induction de mutations. Cela permet d'obtenir un nombre important de cellules éditées et donc d'augmenter le taux d'obtention de colonies après isolation.

Un des avantages majeurs que notre méthode présente réside dans le fait que toutes les manipulations qui font suite à l'édition génomique par CRISPR/Cas9 jusqu'à l'obtention de clones isolés et prêts à être mis en banques ou à être amplifiés sont automatisées et prises en charge par le robot. Par conséquent, cette méthode permet non seulement un gain de temps pour l'expérimentateur mais également une réduction des coûts. Par conséquent, ce type de méthode semi-automatisée représente un

atout important pour l'étude de mutations induites en série par CRISPR/Cas9 et permettrait d'étudier un nombre important de mutations différentes en parallèle. A l'heure actuelle, notre système est limité par le fait qu'il n'est que semi-automatisé, c'est-à-dire que certaines des étapes du flux de travail doivent encore être effectuées manuellement. Par exemple, l'édition génomique des CSPih par CRISPR/Cas9, la différenciation de ces cellules en un type cellulaire précis ou encore la différenciation des cellules en organoïdes ont été réalisés sans l'aide d'une méthode automatisée. Notre système pourrait donc être amélioré par l'ajout de modules permettant de l'automatiser intégralement. La littérature fait état de plusieurs plateformes permettant la conception et la réalisation d'expériences d'édition par CRISPR/Cas9. Notamment, l'une de ces plateformes allie la conception d'ARN guides optimaux pour la position ciblée à leur production, à l'édition des cellules d'intérêt et à l'analyse des mutations obtenues à l'aide de l'intelligence artificielle (S. Li et al. 2022). Une telle plateforme permet d'élargir le nombre de cibles génétiques sans augmenter le temps de manipulation nécessaire à ce genre d'expériences. Outre l'édition par CRISPR/Cas9, d'autres étapes peuvent être automatisées. Notamment, notre équipe a développé une méthode automatisée permettant d'obtenir des cellules de l'EPR à partir de CSPih en grandes quantités à l'aide de l'automate Compact Select (Regent et al. 2019). D'autres équipes ont également développé des protocoles automatisés pour la différenciation de CSPih en organoïdes neuro-rétiniens à l'aide des robots Thermo WellWash Versa et Thermo RapidStack (Kegeles, Perepelkina, et Baranov 2020) ou à l'aide d'une plateforme permettant l'analyse par fluorescence des organoïdes neuro-rétiniens (Vergara et al. 2017). Cette plateforme permet de visualiser et de quantifier la progression du développement des organoïdes ainsi obtenus au cours de leur différenciation. Enfin, afin de compléter notre processus expérimental, nous pourrions envisager d'utiliser des techniques permettant l'automatisation de la reprogrammation de cellules somatiques en CSPih. De tels protocoles ont

été publiés et permettent l'obtention de CSPih comparables à celles obtenues manuellement (Bohrer et al. 2023). Ainsi, notre méthode pourrait être complétée par ces différentes techniques afin d'offrir à l'expérimentateur une expérience totalement automatisée.

En conclusion, la méthode présentée ici pourrait être un atout de taille pour la modélisation de maladies génétiques par édition génomique. Elle permet de réduire considérablement le temps et le nombre de manipulations et permet de suivre de façon fiable les cellules uniques lors de leur croissance en colonies. Elle s'est avérée être un outil précieux pour l'obtention de clones de CSPih éditées au sein du gène *ALMS1*. Ainsi, grâce à cette méthode nous avons pu effectuer l'édition de plusieurs clones mutés à des positions différentes du gène.

## 3.2 ETUDE 2 : CARACTERISATION DES CELLULES RETINIENNES MODELISANT LE SYNDROME D'ALSTRÖM A L'AIDE DE MODELES CELLULAIRES ISSUS DE CSPH

Les résultats présentés dans cette partie ont pour vocation à être publiés dans un article intitulé « **Perte des cônes et des bâtonnets dans des organoïdes neuro-rétiniens modélisant le syndrome d'Alström** ».

Elie FRANK<sup>1</sup>, Camille GEIGER<sup>1,2</sup>, Natacha PERRIN<sup>1,3</sup>, Jérôme POLENTES<sup>1,2</sup>, Michel CAILLERET<sup>1</sup>, Alexandra PLANCHERON<sup>1,2</sup>, Abdallah ABUELHASSAN<sup>1</sup>, Christelle MONVILLE<sup>1</sup> et Karim BEN M'BAREK<sup>1,2</sup>

1. Université Paris-Saclay, Université d'Evry, INSERM, I-Stem, UMR861, 91100 Corbeil-Essonnes, France
2. I-Stem, CECS, 91100 Corbeil-Essonnes, France
3. Centre de Nanosciences et de Nanotechnologies (C2N), CNRS UMR 9001, Université Paris-Saclay, 91120 Palaiseau, France

### 3.2.1 Introduction

Le syndrome d'Alström (SA) est une maladie monogénique autosomique récessive rare caractérisée par plusieurs symptômes tels que la dystrophie des cônes et des bâtonnets, la perte d'audition, la cardiomyopathie dilatée, l'obésité et le diabète sucré de type II. À ce jour, il n'existe pas de traitement curatif de la maladie et seuls des traitements visant à améliorer la qualité de vie peuvent être proposés. Le syndrome d'Alström est dû à des mutations du gène *ALMS1*, un gène de 23 exons situé sur le chromosome 2p13 codant pour une protéine ubiquitaire de 460 kDa située au niveau du centrosome et du corps basal des cellules ciliées. Cette protéine jouerait un rôle

dans diverses fonctions cellulaires telles que la régulation du cycle cellulaire, le transport intra-ciliaire, la production de matrice et le trafic endosomal (Hearn et al. 2005).

Le syndrome d'Alström fait partie d'une famille de maladies appelées « ciliopathies », un groupe de maladies affectant le cil primaire, un organite impliqué dans plusieurs fonctions cellulaires. Les ciliopathies peuvent recouvrir une variété de symptômes, mais l'une des caractéristiques communes à toutes les maladies de ce groupe est une atteinte des fonctions visuelles, notamment la rétinite pigmentaire et la dystrophie des photorécepteurs (Hildebrandt, Benzing, et Katsanis 2011). Certains modèles animaux du SA ont des troubles visuels mais la recherche sur ces aspects de la maladie est limitée par l'absence d'un modèle cellulaire humain (G.B. Collin et al. 2005; Arsov et al. 2006; G. Li et al. 2007; Geberhiwot et al. 2021).

Les lignées cellulaires modèles basées sur les CSPih constituent un outil idéal pour l'étude des maladies rares, car elles donnent accès à une quantité infinie de cellules et permettent aux chercheurs d'appréhender les mécanismes cellulaires et moléculaires en différenciant ces cellules en un type cellulaire spécifique ou bien en les différenciant en organoïdes (He, Nakada, et Morrison 2009; Reichman et al. 2017; Gagliardi et al. 2018; Slembrouck-Brec et al. 2019). Les organoïdes sont des versions tridimensionnelles miniaturisées et simplifiées d'un organe qui reproduisent au moins en partie la complexité fonctionnelle, structurelle et biologique de cet organe, ce qui permet de mieux comprendre l'effet des maladies génétiques que les cellules différenciées en un type cellulaire unique (Zhao et al. 2022). Les organoïdes neuro-rétiniens sont donc des structures tridimensionnelles récapitulant l'organisation des différents types cellulaires composant la rétine.

Les progrès récents dans le domaine de l'édition du génome ont vu l'émergence de nouvelles méthodes permettant l'édition de bases sans induire de rupture du

double brin de l'ADN, réduisant ainsi le risque d'événements ciblant des positions ailleurs dans le génome (Carrington, Weinstein, et Sood 2020; Komor et al. 2016; 2017). Ces méthodes permettent notamment de reproduire des mutations pathologiques identifiées chez des patients au sein de CSPih.

Dans cette étude, nous avons généré de nouvelles lignées cellulaires CSPih modélisant le SA et reproduisant des mutations pathologiques retrouvées chez certains patients. Les mutations ciblées ont été reproduites grâce à la technique CRISPR/Cas9 en utilisant une Cas9 modifiée couplée à une cytidine désaminase permettant de faire de l'édition d'une base spécifique. Nous avons ensuite différencié ces CSPih en cellules de la rétine (organoïdes neuro-rétiniens et cellules de l'EPR) puis nous avons recherché un phénotype pathologique.

## 3.2.2 Résultats

### 3.2.2.1 *Reproduction de mutations pathologiques au sein de CSPih*

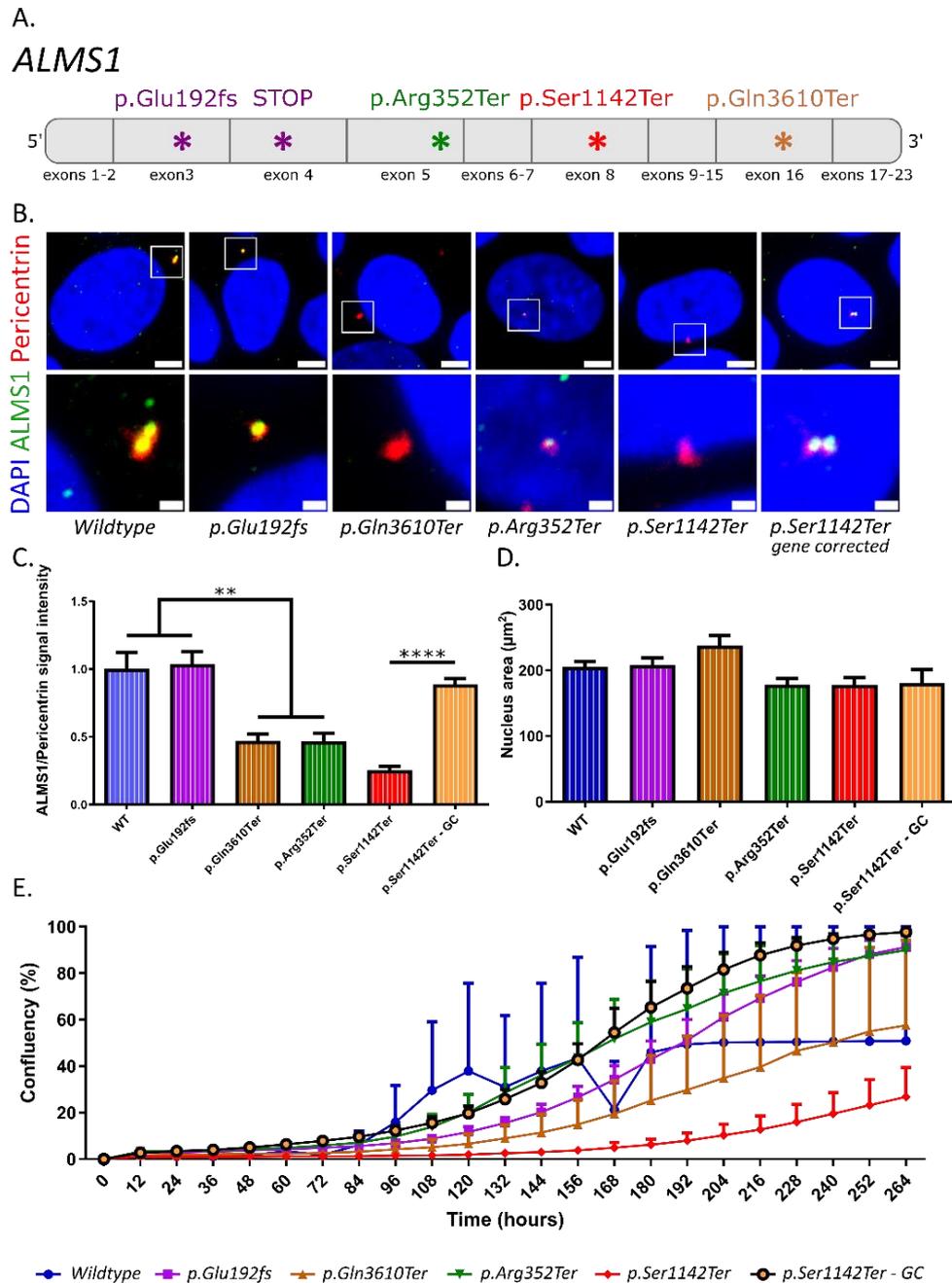
Dans une étude précédente, nous avons décrit l'obtention de deux clones issus de CSPih mutées au sein du gène *ALMS1* (Frank et al. 2023). Brièvement, le clone *ALMS1* p.Glu192fs a été obtenu en ciblant l'exon 3 d'*ALMS1* avec un ARN guide spécifique et une spCas9 menant à l'insertion d'une base T à la position ciblée dans le clone sélectionné. L'analyse bio-informatique de cette insertion suggère un décalage du cadre de lecture entraînant l'apparition d'un codon STOP précoce dès l'exon 4 du gène (**Figure 1A**). Le clone *ALMS1* p.Gln3610Ter a quant à lui été obtenu en effectuant l'édition d'une base C dans l'exon 16 du gène en une base T à l'aide d'un ARN guide spécifique et d'une Cas9 couplée à une cytidine désaminase. Cette édition entraîne l'obtention d'un codon STOP précoce à la place d'une glutamine dans l'exon 16 (**Figure 1A**).

Dans cette étude, nous avons généré, avec la méthode décrite dans l'étude 1, un nouveau clone obtenu par édition de base à l'aide d'un ARN guide ciblant une base C dans l'exon 5 d'*ALMS1*. Cette base est éditée en une base T menant à l'obtention d'un codon STOP précoce à la place d'une arginine. Les mutations des clones *ALMS1* p.Gln3610Ter et p.Arg352Ter reproduisent des mutations pathologiques identifiées chez des patients atteints du SA (*ALMS1* p.Arg352Ter = 1054C>T et p.Gln3610Ter = 10828C>T) (Marshall et al. 2015).

En plus des clones obtenus par CRISPR/Cas9 nous avons obtenu grâce au Pr. Brigitte MALGRANGE (GIGA, Université de Liège) une lignée de CSPih dérivées d'un patient atteint du SA. Ce patient présente la mutation d'une sérine en un codon STOP au sein de l'exon 8 d'*ALMS1* (Zulato et al. 2011). Cette lignée est dénommée *ALMS1* p.Ser1142Ter dans la suite de cette étude (**Figure 1A**). En plus de cette lignée, notre collaboration nous a permis d'obtenir la lignée isogénique corrigée par CRISPR/Cas9 d'*ALMS1* p.Ser1142Ter. Cette lignée est dénommée *ALMS1* p.Ser1142Ter-GC dans la suite de l'article (**Figure 1A**). Toutes les lignées de CSPih obtenues ont été contrôlées pour ce qui concerne la stabilité génétique (par des méthodes de comparaisons des polymorphismes de nucléotides uniques ou SNPs et de caryotypage) et la pluripotence (par des marquages immunofluorescents et de la cytométrie en flux) (**Figure annexe S1**).

#### *3.2.2.2 Effet des mutations sur l'expression d'ALMS1 et sur les propriétés des CSPih*

Pour détecter la présence de la protéine ALMS1 au sein des lignées de CSPih, une expérience d'immunofluorescence avec un anticorps dirigé contre ALMS1 (acides aminés 1200 à 1250) a été effectuée. Dans la lignée contrôle, la protéine ALMS1 est



**Figure 1 : Caractérisation de mutations par CRISPR/Cas9 au sein du gène ALMS1 de CSPiH et caractérisation des clones obtenus.**

**A.** Représentation schématique du gène ALMS1 et des positions des différentes mutations reproduites par CRISPR/Cas9 ou issues de cellules de patients. **B.** Immunofluorescence représentant l'expression d'ALMS1 (vert) et de la péricentrine (rouge) au sein des CSPiH étudiées. Barre d'échelle = 5  $\mu\text{m}$  (rangée du haut) ; 1  $\mu\text{m}$  (rangée du bas).  $n=3$ . **C.** Quantification de l'intensité du signal d'ALMS1 sur celui de la péricentrine en fonction du génotype.  $n=7$ . **D.** Quantification de l'aire du noyau des cellules ( $\mu\text{m}^2$ ) en fonction du génotype.  $n=7$ . **E.** Analyse de la croissance des cellules au cours du temps jusqu'à la confluence (%) en fonction du génotype.  $n=3$ .

colocalisée avec la péricentrine, une protéine localisée au centrosome et impliquée dans le recrutement de la matrice péricentriolaire (Doxsey et al. 1994) (**Figure 1B**). Le clone *ALMS1* p.Glu192fs présente également la protéine ALMS1 colocalisée avec la péricentrine. En revanche, on constate une absence d'ALMS1 au centrosome dans le clone *ALMS1* p.Gln3610Ter. Le clone *ALMS1* p.Arg352Ter exprime ALMS1 au centrosome mais l'intensité du signal semble réduite comparée au clone contrôle. Enfin, le clone *ALMS1* p.Ser1142Ter issu de patient atteint du SA n'exprime pas ALMS1 au centrosome tandis que cette expression est restaurée dans la lignée isogénique corrigée *ALMS1* p.Ser1142Ter-GC (**Figure 1B**). Nous avons effectué une quantification du rapport de l'intensité du signal ALMS1 sur l'intensité du signal péricentrine pour chaque clone (**Figure 1C**). Cette quantification révèle que les clones sains et *ALMS1* p.Glu192fs ne présentent pas de différence significative entre eux dans leur rapport d'intensité ALMS1/péricentrine et que ces rapports sont respectivement de 1 et 1,03. Les clones *ALMS1* p.Gln3610Ter et p.Arg352Ter ne présentent également pas de différence significative entre eux (rapport d'intensité = 0,46 pour les deux clones). En revanche, la différence entre les clones sains et *ALMS1* p.Glu192fs d'une part et p.Gln3610Ter et p.Arg352Ter de l'autre apparaît comme significative ( $p = **$ ). Les cellules issues de patient et leur lignée isogénique corrigée présentent une différence du rapport ALMS1/péricentrine significative ( $p = ****$ ) avec respectivement un rapport de 0,24 et de 0,88, mettant en évidence la restauration de l'expression d'ALMS1 (**figure 1C**).

Lors de l'analyse par immunofluorescence de l'expression d'ALMS1 au centrosome, nous avons constaté dans un premier temps une variation de la taille du noyau des CSPih modélisant le SA en fonction des clones. Après quantification de la taille des noyaux, il apparaît que cette différence est non significative lorsque plusieurs noyaux cellulaires sont analysés pour chaque clone (**Figure 1D**).

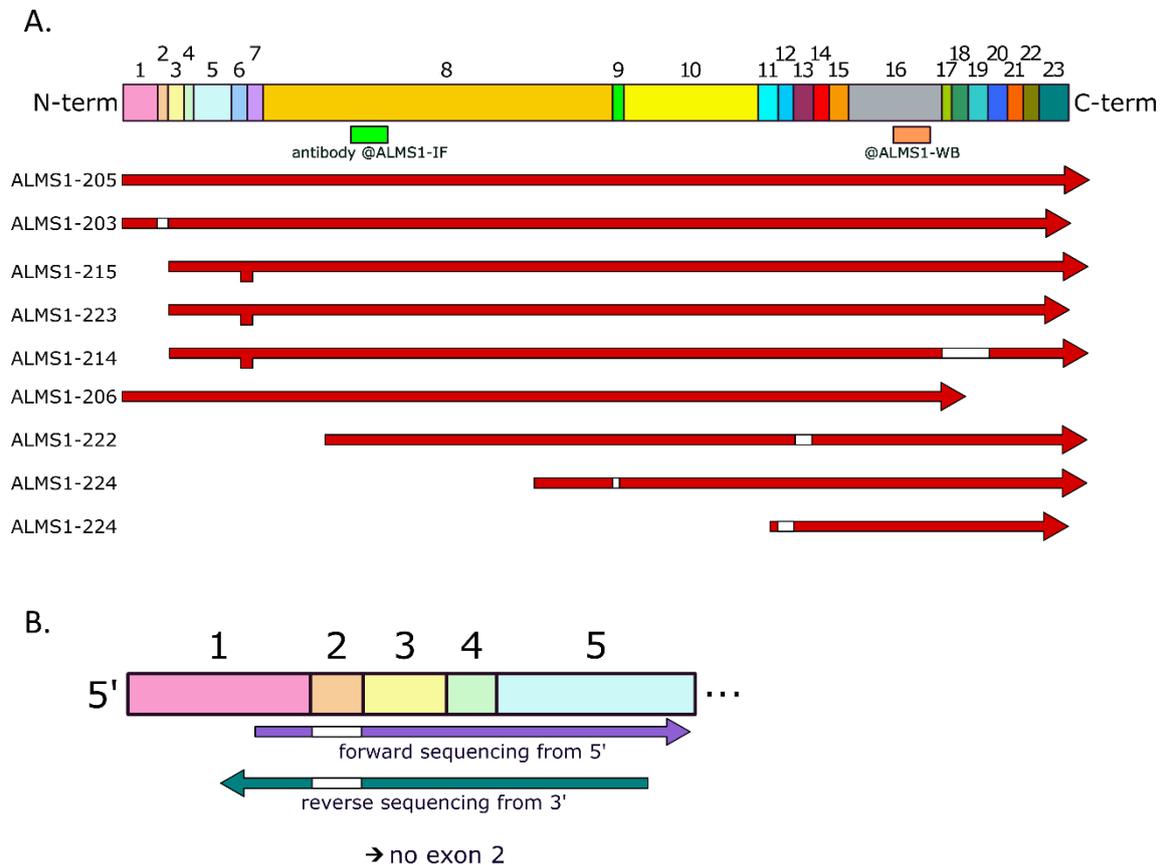
Enfin, nous avons étudié la prolifération des CSPi au cours du temps (**Figure 1E**). Si le clone *ALMS1* p.Ser1142Ter issu du patient SA semble proliférer plus lentement que les autres clones, il est néanmoins difficile de tirer une conclusion au sujet de ces derniers. Notamment, nous n'observons pas de différence évidente entre les clones mutés par édition de base.

### 3.2.2.3 Expression des variants d'*ALMS1*

Le clone *ALMS1* p.Glu192fs présente l'insertion d'une base T entraînant un décalage du cadre de lecture qui conduit à l'apparition d'un codon STOP précoce. Ainsi, la protéine *ALMS1* est tronquée et non-fonctionnelle, voire non traduite. Or, la protéine est détectée par immunofluorescence ce qui suggère la présence de variants d'*ALMS1* qui ne sont pas affectés par cette mutation. L'analyse bio-informatique sur la base de données en ligne ensembl.org, a permis d'identifier 9 variants codant pour une protéine *ALMS1* dont 7 ne contiennent pas l'exon 2 et 3 ne contiennent pas l'exon 3 (**Figure 2A**). La plupart de ces variants ne comportent pas l'exon 2 d'*ALMS1* et certains sont largement raccourcis en leur extrémité N-terminale. Afin d'identifier quels variants sont synthétisés par nos lignées cellulaires, nous avons réalisé une RT-qPCR en utilisant des amorces ciblant l'exon 1 pour l'amorce sens et l'exon 5 pour l'amorce anti-sens (**Figure 2B**). Le séquençage des produits de cette PCR montrent que les clones sains et *ALMS1* p.Glu192fs ne contiennent pas l'exon 2 du gène. Les variants *ALMS1*-205 et *ALMS1*-206 seraient donc à exclure de la liste des variants majoritairement présents dans ces cellules.

Afin de poursuivre l'identification des variants, nous avons cherché à réaliser un Western Blot afin de déterminer quels clones conservent leur extrémité C-terminale,

puis si des clones expriment plusieurs variants et enfin la taille des protéines synthétisées. Après avoir testé différents anticorps ciblant ALMS1, nous n'avons pas trouvé d'anticorps adapté à nos analyses.



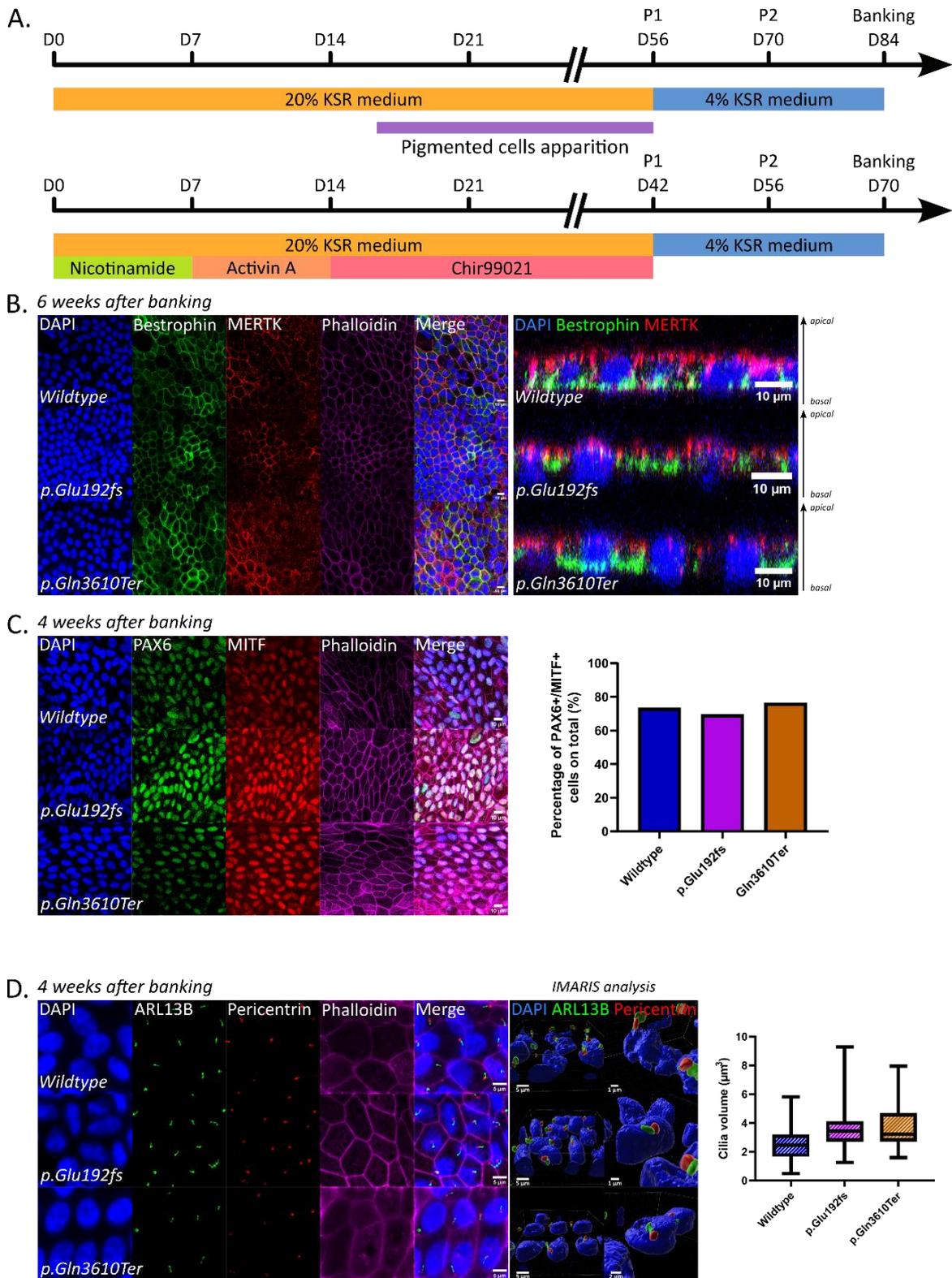
**Figure 2 : Expression de différents variant d'ALMS1 au sein des CSPih.**

**A.** Représentation schématique des différents exons du gène ALMS1 et des 9 variants codant pour une protéine. Les flèches rouges représentent la taille des protéines synthétisées par les variants. Une zone blanche représente une délétion et une zone rouge sur deux lignes représente une duplication. Le rectangle vert représente l'épitope reconnu par l'anticorps ciblant ALMS1 utilisé en immunofluorescence tandis que le rectangle orange représente l'épitope reconnu par l'anticorps utilisé pour le Western Blot. **B.** Stratégie mise en place pour l'identification des exons présents dans les différents clones par PCR.

#### 3.2.2.4 L'induction de mutations pathologiques n'altère pas la différenciation des CSPih en cellules de l'EPR

Les différentes lignées CSPih ont ensuite été différenciées en cellules de l'EPR. Dans un premier temps, nous avons utilisé un protocole de différenciation spontanée

publié par notre équipe (Ben M'Barek et al. 2017). Face à la difficulté à induire la différenciation de certaines de nos lignées, notamment les lignées issues de patients, nous avons par la suite appliqué un protocole de différenciation dirigé dont le rendement en cellules RPE est supérieur (Regent et al. 2019) (**Figure 3A**). En effet, pour la lignée saine, le protocole spontané nous a permis d'obtenir 2 banques de cellules pour 5 différenciations initiées tandis que le protocole dirigé nous a permis d'obtenir 4 banques pour 8 différenciations. Pour la lignée *ALMS1* p.Glu192fs, le protocole spontané nous a permis d'obtenir 2 banques de cellules pour 4 différenciations initiées et le protocole dirigé nous a permis d'obtenir 3 banques pour 4 différenciations. Enfin, dans le cas de la lignée *ALMS1* p.Gln3610Ter, le protocole spontané nous a permis d'obtenir 2 banques de cellules pour 5 différenciations initiées tandis que le protocole dirigé nous a permis d'obtenir 5 banques à partir de 7 différenciations. Aucun des deux protocoles testés n'a permis d'obtenir de cellules de l'EPR à partir des lignées issues de patients du SA. Les cellules obtenues présentent une morphologie habituelle pour des cellules de l'EPR avec une forme de pavés étroitement liés (**Figure 3B**). Ces cellules expriment des marqueurs caractéristiques de l'EPR tels que MERTK à leur face apicale, bestrophine à leur face basale (Lukovic et al. 2015) ainsi que PAX6 et MITF (Ben M'Barek et al. 2017). Le pourcentage de cellules exprimant un double marquage MITF/PAX6 est de 73% pour la lignée saine, de 69% pour la lignée *ALMS1* p.Glu192fs et de 76% dans la lignée p.Gln3610Ter. Le nombre de doubles positifs est donc équivalent dans les trois lignées analysées (**Figure 3C**).



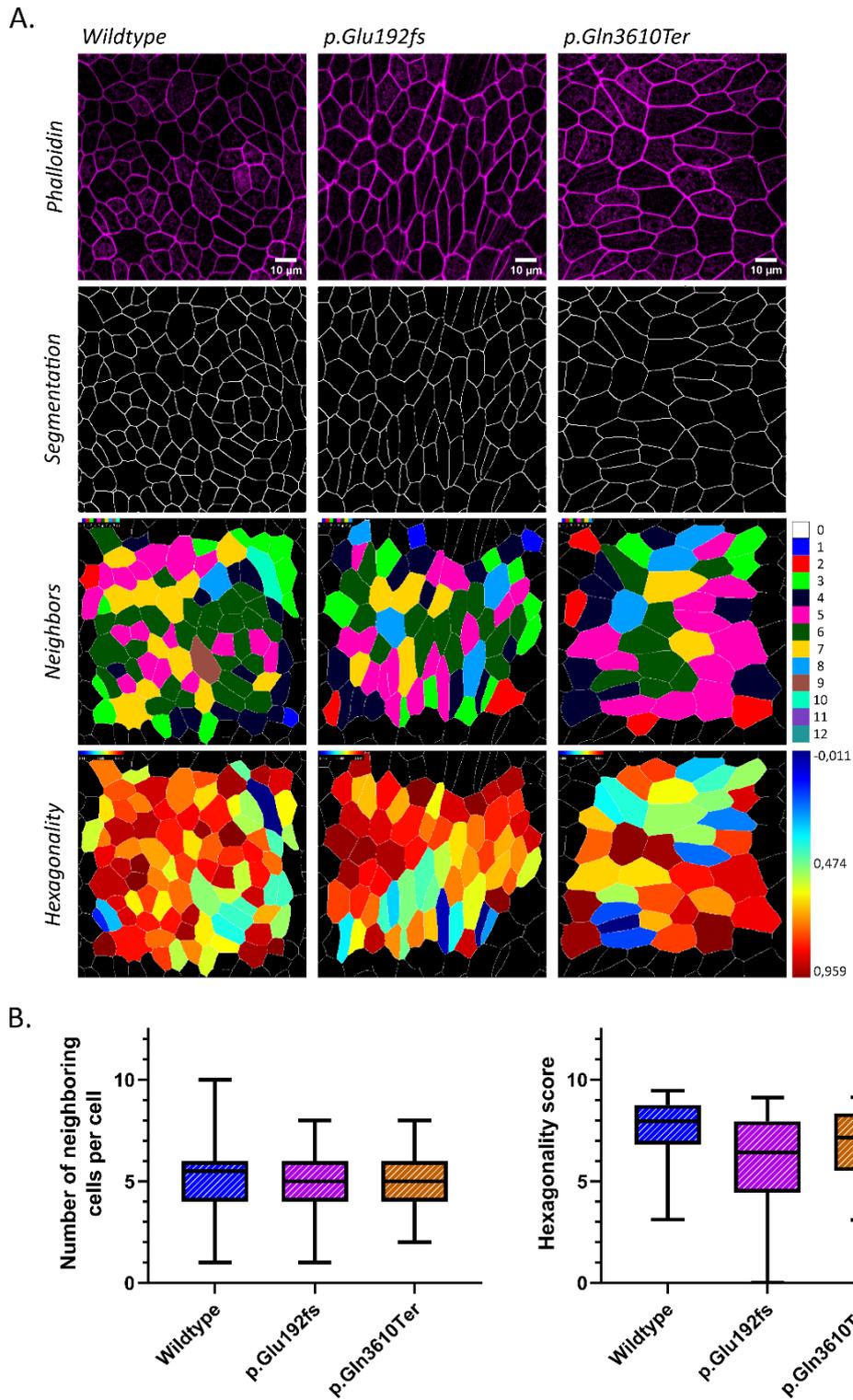
**Figure 3 : Différenciation des CSPih en cellules de l'EPR et caractérisation des EPR obtenus.**

### Figure 3 (légende)

**A.** Représentation schématique des protocoles utilisés pour la différenciation des CSPih en cellules de l'EPR. Le protocole 1 (panneau du haut) est tiré de (Ben M'Barek et al. 2017) et le protocole 2 (panneau du bas) de (Regent et al. 2019). **B.** Immunofluorescence représentant l'expression de la Bestrophine (vert), de MERTK (rouge) et de la Phalloïdine (violet) dans les clones sain, p.Glu192fs et Gln3610Ter. Panneau de droite : projection latérale des marquages de la Bestrophine (vert) et de MERTK (rouge). Barre d'échelle = 10  $\mu$ m.  $n=1$ . **C.** Immunofluorescence représentant l'expression de MITF (vert), de PAX6 (rouge) et de la Phalloïdine (violet) dans les clones sain, p.Glu192fs et Gln3610Ter. Barre d'échelle = 10  $\mu$ m. Panneau de droite : quantification du nombre de cellules positives à MITF, PAX6 et double marquées MITF+PAX6.  $n=2$ . **D.** Immunofluorescence représentant l'expression d'ARL13B (vert) et de la Péricentrine (rouge) dans les clones sain, p.Glu192fs et Gln3610Ter. Barre d'échelle = 10  $\mu$ m. Panneau central : modélisation des marquages par le logiciel Imaris. Barres d'échelles = 1, 2 et 5  $\mu$ m. Panneau de droite : comparaison du volume du marquage ARL13B.  $n=1$ .

Ensuite, nous avons cherché à savoir si les cellules de l'EPR dérivées de nos lignées présentent un cil primaire. Pour cela, nous avons étudié l'expression de la protéine ARL13B, une protéine localisée au cil primaire et impliquée dans la formation et la maintenance de celui-ci et ayant déjà été identifiée comme étant présente dans des cellules de l'EPR (H. L. May-Simera et al. 2018). Comme attendu, les cellules de l'EPR dérivées du clone sain présentent une expression de ARL13B superposée avec la péricentrine, une protéine localisée au centrosome (**Figure 3D**). Les cellules de l'EPR issues du clone p.Glu192fs ainsi que celles issues du clone p.Gln3610Ter présentent également un cil primaire comme le montre le marquage ARL13B. La quantification du volume de ces cils montre que les clones p.Glu192fs et p.Gln3610Ter présentent des cils légèrement plus volumineux que la lignée saine isogénique correspondante (contrôle).

Les cellules de l'EPR obtenues à partir des clones sain, *ALMS1* p.Glu192fs et p.Gln3610Ter ont été analysées à l'aide du programme REShAPE (**Figure 4A**). REShAPE est un outil d'analyse d'images et de mesure de la morphométrie des cellules de l'EPR (Ortolan et al. 2022). Une segmentation des cellules a été réalisée à partir d'un marquage de la phalloïdine puis le nombre de cellules voisines a été déterminé pour chaque cellule. Un score d'hexagonalité a également été déterminé pour chaque cellule. Ces deux données sont similaires pour les trois lignées étudiées (**Figure 4B**).



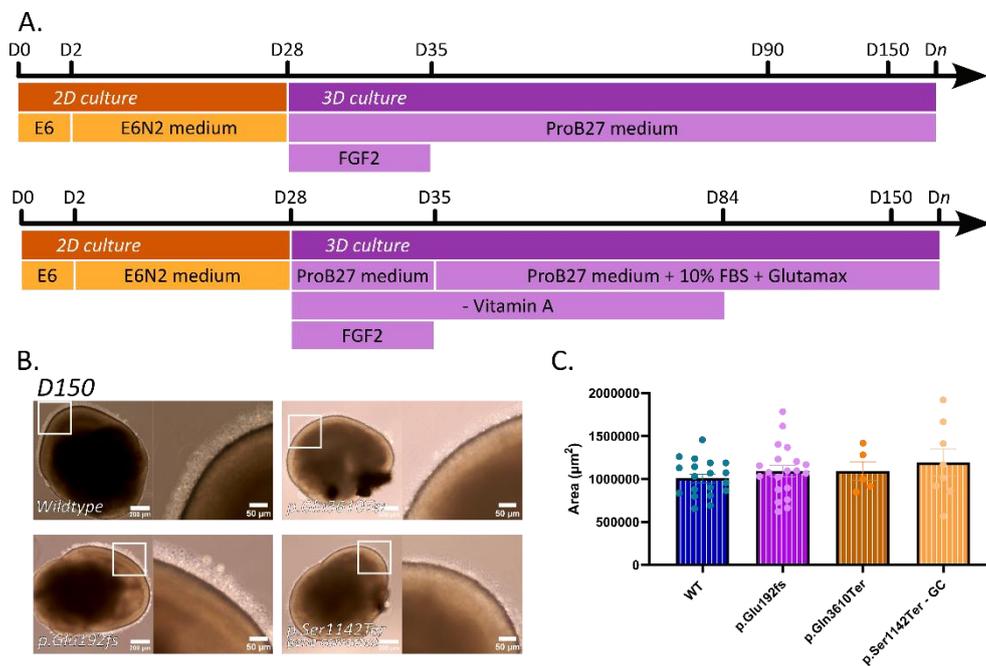
**Figure 4 : Analyse morphométrique des cellules de l'EPR obtenues à partir des CSPih modèles.**

#### Figure 4 (légende)

**A.** Segmentation des cellules effectuée à partir d'un marquage de la phalloïdine pour les cellules de l'EPR dérivées des lignées saines, *ALMS1* p.Glu192fs et p.Gln3610Ter. Analyse du nombre de cellules voisines par cellule et du score d'hexagonalité à l'aide du programme RESHAPE. **B.** Quantification du nombre de cellules voisines par cellule et du score d'hexagonalité.  $n=1$ .

#### 3.2.2.5 Différenciation des CSPih en organoïdes neuro-rétiniens et analyse de la production de photorécepteurs

Dans le but d'étudier de potentiels défauts des photorécepteurs, nous avons différencié nos CSPih modèles en organoïdes neuro-rétiniens. Ces structures tridimensionnelles récapitulent les différents types cellulaires de la rétine humaine (Reichman et al. 2017). Afin d'obtenir des structures bien organisées qui récapitulent l'organisation en couches de la rétine et dans lesquelles les photorécepteurs se développent en périphérie, nous avons utilisé un protocole précédemment publié (Slembrouck-Brec et al. 2019) (**Figure 5A**). Ce protocole permet d'obtenir pour tous les clones des organoïdes présentant à leur périphérie une couronne correspondant à la CNE et à la couche des photorécepteurs d'une rétine humaine (**Figure 5B**). Bien que d'une différenciation à l'autre ainsi qu'au sein d'une même différenciation les organoïdes puissent avoir des tailles différentes, ces différences ne sont pas significatives et les organoïdes des différents clones présentent des tailles similaires (**Figure 5C**). Ensuite, différents marquages par immunofluorescence ont été réalisés à 150 jours de différenciation (J150) afin de déterminer le stade de maturation des photorécepteurs. Comme le montre la **Figure 6A**, les différentes lignées expriment la recoverine au niveau de la couronne des organoïdes et forment une structure visible et identifiable. Seuls les organoïdes issus des cellules de patients semblent ne pas exprimer ce marqueur même si l'épaisseur de la couche exprimant la recoverine semble plus faible dans le cas des organoïdes issus des trois clones mutés. En plus de la recoverine, les cellules expriment CRX un marqueur des photorécepteurs (Furukawa, Morrow, et Cepko 1997).

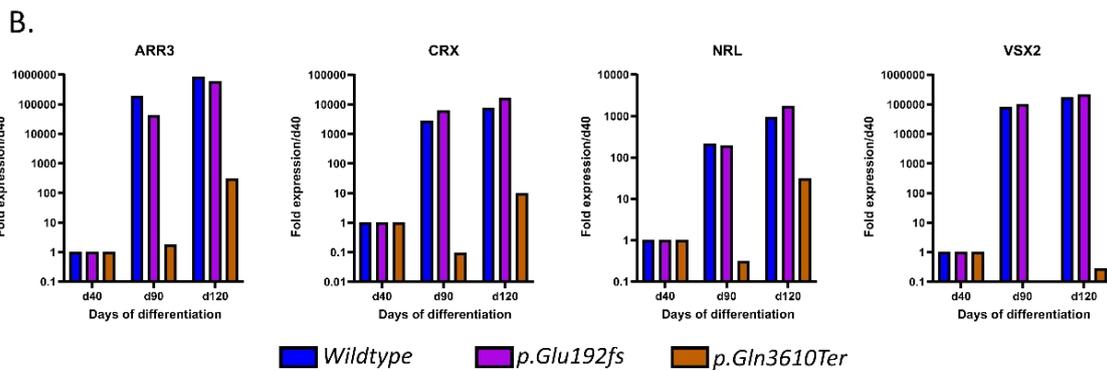
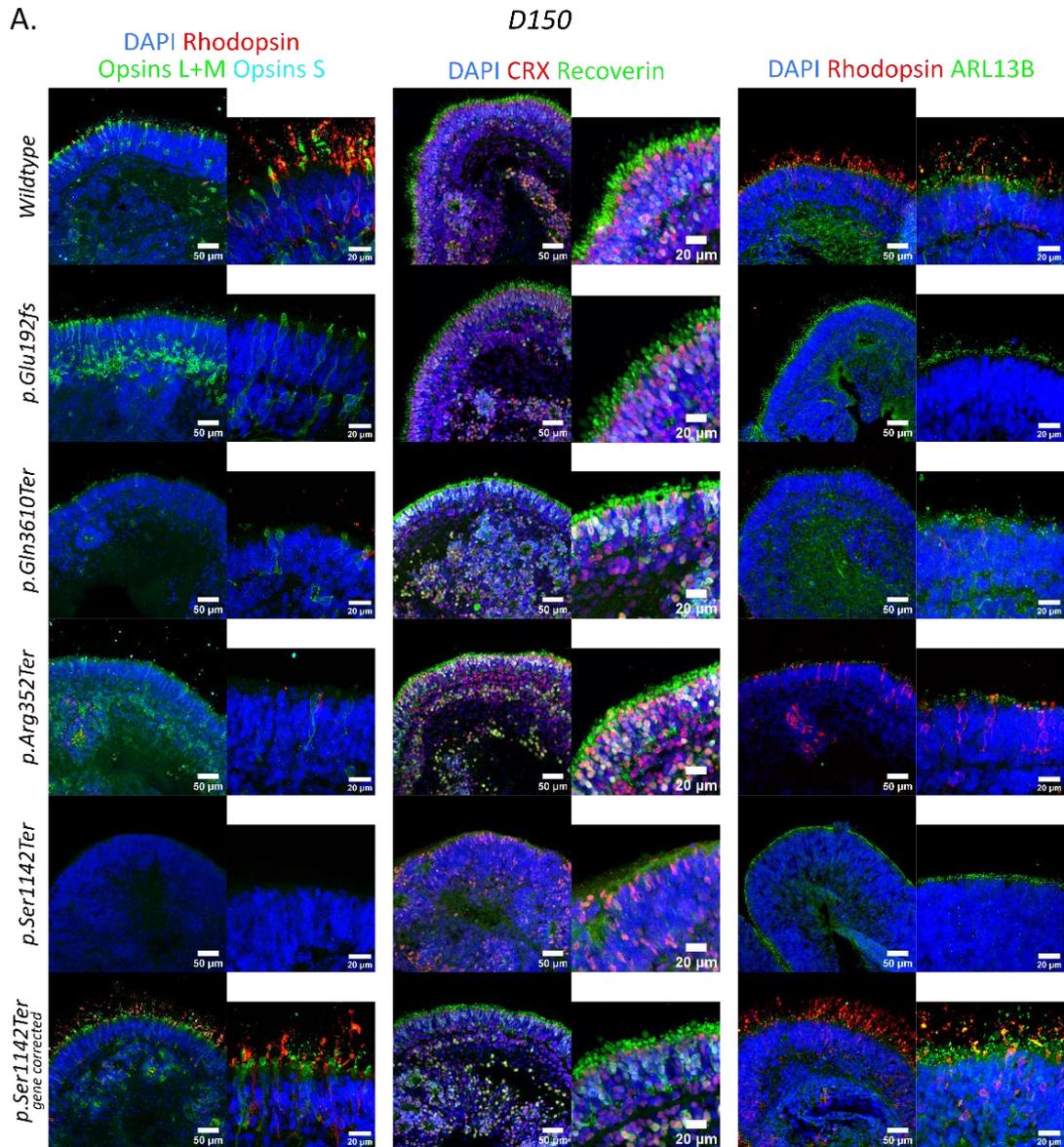


**Figure 5 : Différenciation des CSPiH modèles en organoïdes neuro-rétiniens.**

**A.** Protocoles de différenciation des CSPiH en organoïdes neuro-rétiniens. Le protocole 1 (haut) est tiré de (Reichman et al. 2017) et le protocole 2 (bas) de (Slembrouck-Brec et al. 2019). **B.** Images des structures obtenues après 150 jours de différenciation à l'aide du protocole 2 pour les clones sain, p.Glu192fs, Gln3610Ter et p.Ser1142Ter. Barre d'échelle = 200  $\mu\text{m}$  ; grossissement = 50  $\mu\text{m}$ . **C.** Quantification de l'aire des organoïdes après 150 jours de différenciation ( $\mu\text{m}^2$ ).  $n=1$ .

Tous les organoïdes expriment CRX mais dans le cas de la lignée *ALMS1* p.Ser1142Ter, le nombre de cellules positives semble légèrement réduit.

Puis, la rhodopsine est exprimée par les cellules en périphérie des organoïdes issus de la lignée saine mais absente ou très faiblement exprimée dans les organoïdes *ALMS1* p.Glu192fs, p.Gln3610Ter et p.Arg352Ter. Elle est également absente dans le cas des organoïdes issus de cellules de patients (*ALMS1* p.Ser1142Ter) mais son expression est retrouvée dans la lignée isogénique corrigée. Tous les organoïdes expriment à leur périphérie les opsines L et M (rouge et verte) à l'exception de ceux issus des cellules de



**Figure 6 : Caractérisation des organoïdes obtenus à partir des CSPih modèles.**

### Figure 6 (légende)

**A.** Immunofluorescence représentant l'expression des protéines Rhodopsine (rouge), Opsines L et M (vert), Opsine S (bleu), CRX (rouge), Recoverine (vert), ARL13B (vert) et Caspase-3 clivée (bleu clair) pour tous les clones après 150 jours de différenciation. Barre d'échelle = 50  $\mu\text{m}$  ; grossissement = 20  $\mu\text{m}$ .  $n=1$ . **B.** Analyse d'expression par RT-qPCR de *ARR3*, *CRX*, *NRL* et *VSX2* dans les clones sain, p.Glu192fs et Gln3610Ter. L'expression est relative à l'expression au 40<sup>ème</sup> jour de différenciation et les données ont été normalisées par rapport au gène de ménage 18S.  $n=1$ .

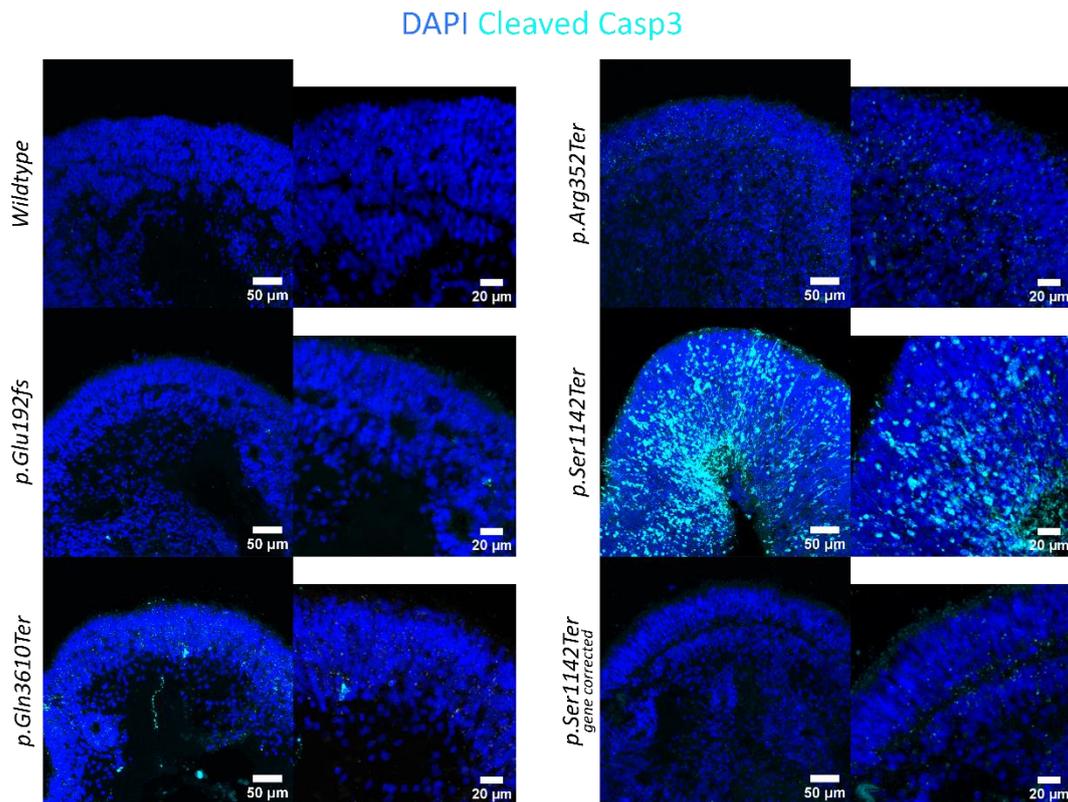
patient *ALMS1* p.Ser1142Ter. Néanmoins, visuellement, le nombre et la taille des cellules marquées par les opsines L et M semblent varier entre les différentes lignées. Aucun organoïde ne semble exprimer l'opsine S (bleue).

Ensuite, *ARL13B* est un marqueur du cil primaire mais est également présent au niveau du cil connecteur des photorécepteurs. Dans notre cas, on voit qu'*ARL13B* est exprimé à la couronne des organoïdes issus de toutes les lignées, au même niveau que les segments externes des photorécepteurs mis en évidence par la rhodopsine dans les clones qui l'expriment.

L'expression de différents gènes marqueurs des photorécepteurs a ensuite été étudiée par RT-qPCR (**figure 6B**). Les résultats de cette analyse montrent que l'expression du gène *ARR3* est fortement réduit dans les cellules issues de la lignée *ALMS1* p.Gln3610Ter tandis que les cellules issues de la lignée *ALMS1* p.Glu192fs ne semblent pas être affectées. Des résultats similaires sont retrouvés pour les gènes *CRX*, *NRL* et *VSX2*. De plus, ces caractéristiques se maintiennent au cours du temps de différenciation des organoïdes. Ces résultats ayant été obtenus au cours d'une expérience, ils restent préliminaires et devront être confirmés par des expériences futures.

Enfin, nous avons utilisé un marqueur de la mortalité cellulaire, la Caspase 3 clivée, afin de déterminer s'il existe des différences de mortalité en fonction des clones. Comme le montre la **Figure 7**, les organoïdes issus des cellules *ALMS1* p.Ser1142Ter présentent une très forte mortalité en leur sein tandis que la lignée isogénique corrigée p.Ser1142Ter – GC en est dépourvue tout comme les organoïdes issus des cellules

saines. En revanche, les organoïdes issus des clones *ALMS1* p.Glu192fs, p.Gln3610Ter et p.Arg352Ter présentent une certaine mortalité bien que le nombre de cellules apoptotiques soit considérablement réduit par rapport à la lignée de patients.



**Figure 7 : Analyse de la mortalité au sein des organoïdes obtenus.**

**A.** Immunofluorescence représentant l'expression de la Caspase-3 clivée (bleu clair) pour tous les clones après 150 jours de différenciation. Barre d'échelle = 50  $\mu\text{m}$  ; grossissement = 20  $\mu\text{m}$ .  $n=1$ .

### 3.2.3 Discussion

Dans cette étude, nous avons présenté l'obtention de lignées de CSPih présentant des mutations *de novo* ou pathologiques au sein du gène *ALMS1* responsable du SA. Ces lignées de CSPih modèles ne présentent pas de différences au niveau des caractéristiques que nous avons étudié. En revanche, ces lignées ont pu être différenciées

en cellules de l'EPR, un tissu concerné par le SA. Là encore, les différentes lignées de l'EPR obtenues ne présentent pas de phénotype particulier permettant de distinguer les lignées mutées de la lignée saine. Les CSPih modèles ont également été différenciées en organoïdes neuro-rétiniens. Contrairement aux CSPih et aux cellules de l'EPR, les organoïdes présentent un phénotype pathologique que nous allons détailler ci-après.

Au sein des organoïdes issus des CSPih modélisant le SA, la diminution d'expression de la rhodopsine suggère soit un défaut de production des bâtonnets, soit une mortalité précoce de ces cellules dans les lignées *ALMS1* p.Glu192fs, p.Gln3610Ter, p.Arg352Ter et p.Ser1142Ter. En contraste, la rhodopsine est fortement exprimée au sein des organoïdes issus des lignées saines et *ALMS1* p.Ser1142Ter – GC (restauration du gène *ALMS1* de la lignée issue du patient SA). De même, la diminution d'expression des opsines M et L démontre un défaut des cônes M et L dans les organoïdes modélisant le SA. Il est à noter que l'opsine S (bleue) est faiblement exprimée dans les organoïdes sains et *ALMS1* p.Ser1142Ter – GC et totalement absente dans les organoïdes des lignées modélisant le SA.

Puis, bien que le nombre de cônes et de bâtonnets soit réduit voire nul dans les organoïdes modélisant le SA, l'expression maintenue de CRX indique que des précurseurs des photorécepteurs sont bien présents au sein des organoïdes. En effet, si CRX a d'abord été utilisé comme marqueur des photorécepteurs (Furukawa, Morrow, et Cepko 1997), plusieurs études montrent sa présence au sein de précurseurs au sein desquels il est essentiel pour guider la maturation en photorécepteurs (Pan et al. 2023; J. Collin et al. 2019; Kruczek et al. 2021; Bernardos et al. 2007). L'absence des cônes et des bâtonnets au 150<sup>ème</sup> jour de différenciation semble donc être le résultat soit d'un arrêt de la maturation des progéniteurs en photorécepteurs, soit d'une dégénéres-

cence importante des photorécepteurs matures. Afin d'identifier laquelle des deux hypothèses est la plus probable, nous avons réalisé un marquage de la caspase 3 clivée, une enzyme clé dans le processus d'apoptose (Crowley et Waterhouse 2016; Niles, Moravec, et Riss 2008). Ce marquage révèle que les organoïdes issues de cellules saines et p.Ser1142Ter – GC ne présentent qu'un faible taux d'apoptose. En revanche, les organoïdes issues de cellules du patient atteints du SA (*ALMS1* p.Ser1142Ter) présentent une forte activité apoptotique tandis que ceux issus des CSPih mutées par CRISPR/Cas 9 (sur d'autres position du gène) ont des cellules en apoptose, bien qu'en plus faible quantité que les organoïdes sains. Nous pouvons donc supposer un lien entre les cellules en apoptoses au sein des organoïdes modélisant le SA et la diminution des cônes et des bâtonnets au sein de ces mêmes organoïdes. Cet élément suggère qu'une dégénérescence des photorécepteurs est à l'origine du phénotype observé dans les organoïdes de patients. Pour confirmer cette hypothèse, une expérience d'immunofluorescence utilisant les marqueurs de la Caspase 3 clivée et de précurseurs des photorécepteurs peut être réalisée afin de déterminer un potentiel co-marquage de ces cellules.

A l'heure actuelle, la littérature ne rapporte pas de liens entre des mutations dans le gène *ALMS1* et une dérégulation de l'apoptose dans les modèles cellulaires permettant d'étudier les symptômes visuels du SA. Néanmoins, l'étude d'autres mutations pathologiques permet de mieux comprendre les liens entre apoptose et dégénérescence des cellules rétiniennes. Par exemple, une étude de 2022 s'est penchée sur des mutations dans le gène *PRPF31* responsable d'une rétinite pigmentaire (Rodrigues et al. 2022). Les auteurs de cette étude constatent une augmentation du nombre de cellules apoptotiques à la périphérie des organoïdes neuro-rétiniens mutés dans le gène *PRPF31* et obtenus à l'aide du même protocole que nous avons utilisé pour avoir des organoïdes présentant des photorécepteurs à leur périphérie. Dans le cas de cette

étude, les auteurs concluent que seuls les photorécepteurs subissent la dégénérescence due aux mutations dans *PRPF31* et que les autres types cellulaires tels que les cellules de Müller et les cellules bipolaires ne sont pas atteintes. A l'aide d'une analyse transcriptomique effectuée sur des cellules de l'EPR dérivées de CSPih de patients, les auteurs ont également observé une régulation à la hausse de gènes impliqués dans l'apoptose. Réaliser une étude transcriptomique sur nos cellules de l'EPR issues des CSPih modélisant le SA pourrait donc nous apporter des informations similaires.

De plus, dans une autre étude portant sur le rétinoblastome, un cancer de l'œil fréquent chez l'enfant, les auteurs se sont intéressés à l'effet de la perte du gène *RB1* sur la différenciation d'organoïdes neuro-rétiniens (Rozanska et al. 2022). Les auteurs observent une réduction du nombre de cônes et de bâtonnets matures à 150 jours de différenciation dans des organoïdes neuro-rétiniens dérivés de CSEh déplétées en *RB1*. En parallèle, les auteurs observent également une augmentation faible mais significative du pourcentage de cellules apoptotiques à l'aide d'un marquage de la Caspase 3 clivée. Ces observations sont corroborées par un test TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling*) permettant de révéler des cellules apoptotiques en indiquant la présence de cassures dans l'ADN de ces cellules. Dans cette étude, l'apoptose des cellules au sein des organoïdes est également utilisée comme marqueur d'efficacité de médicaments potentiels prouvant ainsi le potentiel des organoïdes neuro-rétiniens pour évaluation de molécules à visée thérapeutique.

Une autre étude s'est intéressée à *TULP1*, un gène multifonctionnel dont les mutations sont à l'origine de maladies rétiniennes héréditaires. *TULP1* est un gène codant pour une protéine ayant été localisée dans les photorécepteurs. Chez des souris porteuses de mutations au sein de *TULP1*, les chercheurs ont observé un raccourcissement des segments externes des bâtonnets dès les premiers stades de développement.

Cette observation s'accompagne d'une forte activité apoptotique à l'origine d'une perte totale de la rétine (Palfi et al. 2020).

Enfin, dans le cas du syndrome oro-facio-digital de type 1, une ciliopathie, il a été montré dans une étude que la protéine codée par le gène *OFD1* agit comme régulateur du nombre et de la longueur des cils des photorécepteurs mais a également un rôle de protection contre l'apoptose (Juan Wang et al. 2016). Certaines mutations dans *OFD1* mènent à la perte du cil des photorécepteurs et par conséquent à la dégénération de ces cellules (Webb et al. 2012), à une apoptose accrue et ainsi aux symptômes du syndrome oro-facio-digital de type 1. Ces études montrent un lien entre une dérégulation de l'apoptose et la perte de photorécepteurs. De futures expériences nous permettront de déterminer si les mécanismes sous-jacents à ce lien sont identiques dans nos modèles cellulaires du SA ou s'ils répondent à des mécanismes différentes.

Pour ce qui est des organoïdes issus de cellules mutées par CRISPR/Cas9, ces derniers semblent présenter un phénotype moins marqué avec des cellules positives à CRX et à la recoverine, peu de photorécepteurs matures et un taux plus faible d'apoptose. Les cellules doubles positives CRX/recoverine sont des précurseurs post-mitotiques des photorécepteurs qui sont des cellules différenciées mais encore immatures, qui ne se divisent plus et dont la maturation donne naissance aux cônes et aux bâtonnets (Lakowski et al. 2015; Oh et al. 2007). Le fait que le taux d'apoptose soit plus faible que dans la ligné du patient SA pourrait être lié à un retard de la différenciation des cellules au sein des organoïdes mutés et donc que les précurseurs post-mitotiques identifiés n'aient pas encore dégénéré. Afin de vérifier cette hypothèse, d'autres expériences de marquage avec la caspase 3 clivée peuvent être réalisées à des temps de différenciation plus précoces et plus tardifs afin de déterminer à quel stade ces précurseurs pourraient dégénérer. Par ailleurs, un co-marquage de la caspase 3 clivée avec des marqueurs des précurseurs post-mitotiques tels que CRX permettra de vérifier si

les cellules en apoptose sont bien des précurseurs de photorécepteurs. Des marqueurs des autres types cellulaires de la rétine pourront également être utilisés afin d'évaluer l'effet des mutations du gène *ALMS1* sur la mortalité de ces cellules au sein des organoïdes neuro-rétiniens. Parmi ces marqueurs on peut citer *VSX2* et *PRKCα* pour les cellules bipolaires, *BRN3A* pour les cellules ganglionnaires de la rétine, *RLBP1*, *GS* et *SOX9* pour les cellules gliales de Müller et *AP2* pour les cellules amacrines. Tous ces éléments permettront de mieux caractériser l'effet des mutations du gène *ALMS1* sur les cellules au sein des organoïdes neuro-rétiniens.

Les images obtenues par immunofluorescence indiquent également qu'ARL13B est exprimée à la couronne des organoïdes. Bien qu'ARL13B soit principalement utilisé comme marqueur du cil primaire, plusieurs études ont démontré sa présence au niveau du cil connecteur des photorécepteurs où il remplit un rôle dans la formation des segments externes et dans la prolifération des photorécepteurs (Larkins et al. 2011; Ferent et al. 2019; Song et al. 2016; Dilan et al. 2019). La présence d'ARL13B dans nos organoïdes, y compris les mutés et ceux issus de patients semble indiquer que les précurseurs des photorécepteurs possèdent une structure apparentée au cil connecteur bien que nous ayons vu plus haut que les photorécepteurs ne sont pas matures. L'identité de ces cellules semble donc se situer à une étape intermédiaire entre les précurseurs immatures n'ayant pas deux segments distincts et les photorécepteurs matures à deux segments. Le cil connecteur peut être présent dans les précurseurs des photorécepteurs où il joue un rôle crucial dans leur développement, même si ces cellules n'ont pas encore les deux segments distincts que l'on trouve dans les photorécepteurs matures. Dans ces cellules, le cil connecteur joue un rôle de transport des protéines, de signalisation cellulaire et dans la formation des segments internes et externes. Une étude de 2023 a mis en évidence qu'au sein d'organoïdes neuro-rétiniens dérivés de CSEh, les

cellules expriment ARL13B et que le nombre de cellules exprimant cette protéine décroît avec le temps (Ning et al. 2023). Néanmoins cette étude se concentre essentiellement sur les cellules non-photoréceptrices. Il pourrait être intéressant pour notre recherche de phénotype d'examiner l'expression d'ARL13B au sein de nos organoïdes sains et mutés au cours du temps et voir si, comme pour les cellules non-photoréceptrices, cette expression décroît au cours du temps. Le déclin plus ou moins tardif d'ARL13B pourrait avoir une incidence sur le déclin des photorécepteurs comme le suggère une étude de 2019 (Dilan et al. 2019).

Au sujet des cellules de l'EPR dérivées des CSPih on constate que tous les clones issus de la lignée de CSPih PC056c2 (sain, *ALMS1* p.Glu192fs, p.Gln3610Ter et p.Arg352Ter) ont pu être différenciés en cellules de l'EPR à l'aide des deux protocoles utilisés (Ben M'Barek et al. 2017; Regent et al. 2019). Néanmoins, pour le clone p.Arg352Ter, bien que plusieurs banques de cellules aient pu être obtenues, leur culture après décongélation n'a pas permis d'obtenir un tapis cellulaire de qualité suffisante pour réaliser des expériences d'immunofluorescence. En revanche, les CSPih issues de patients (*ALMS1* p.Ser1142Ter et p.Ser1142Ter – GC) n'ont pas pu être différenciées et aucun des deux protocoles utilisés n'a engendré l'apparition de cellules pigmentées et/ou de cellules en pavé, deux éléments caractéristiques de l'EPR. Pour ces trois lignées, les cellules de l'EPR présentent une pigmentation caractéristique et remplissent les critères habituellement attendus de ce type cellulaire. De plus, l'analyse morphométrique réalisée à l'aide du programme RESHAPE montre une forte similarité des caractéristiques des cellules de l'EPR entre les trois lignées. Notamment, le nombre de cellules voisines pour chaque cellule et le score d'hexagonalité ne montrent pas de différences significatives entre les lignées.

Les cellules de l'EPR présentent également à leur surface un cil primaire ayant un rôle dans le développement et la maturation de l'EPR (H. May-Simera, Nagel-Wolfrum, et Wolfrum 2017; Grisanti et al. 2016; Luo et al. 2012; Sugiyama et al. 2010). Les cellules de l'EPR dérivées de nos trois lignées présentent un cil primaire mis en évidence par un marquage ARL13B . Nous constatons également une légère augmentation du volume de nos cils dans les clones mutés. Une étude de 2018 s'est penchée sur le cil primaire d'EPR dérivés de CSPih de patients atteints du syndrome de Joubert, une ciliopathie que nous avons déjà cité plus haut et caractérisée par une mutation dans le gène *CEP290* codant pour une protéine centrosomale impliquée dans le développement du cil (H. L. May-Simera et al. 2018). Cette étude conclue que les cellules de l'EPR dérivées de CSPih de patients présentent toujours un cil primaire bien que celui-ci soit réduit en longueur et en volume et qu'il présente une morphologie anormale. Ces cellules s'avèrent être immatures et non fonctionnelles en raison des défauts associés au cil. De plus, cette étude émet l'hypothèse que c'est via la voie de signalisation Wnt que les cils primaires agissent sur la maturation de l'EPR. Nos observations semblent donc en contradiction avec cette étude mais sont à reproduire afin de les valider. Néanmoins, nos analyses semblent tendre vers une absence de phénotype au niveau des cellules de l'EPR et notamment du cil primaire. D'autres marqueurs caractéristiques des cellules de l'EPR peuvent être étudiés tel que la résistance électrique trans-épithéliale (TEER) dans le but de poursuivre la recherche d'un phénotype. De plus une analyse transcriptomique de nos différentes lignées sera menée afin d'identifier une potentielle variation d'expression des transcrits et donc identifier une différence phénotypique. Différentes études ont montré que dans plusieurs maladies oculaires et notamment des ciliopathies, l'altération de l'EPR mène à l'absence de photorécepteurs matures et fonctionnels et ainsi à une vision détériorée voire absente (Dilan et al. 2018; Xia et Rizzolo

2017; Zhang et al. 2018). Ici, les mutations générées ne semblent pas altérer la différenciation des CSPih en cellules de l'EPR mais ont un effet notable sur l'obtention de photorécepteurs au sein des organoïdes neuro-rétiniens. Il est donc probable que ces mutations entraînent une détérioration des photorécepteurs sans que les cellules de l'EPR soient impliquées ou bien via une autre voie que Wnt.

Concernant les CSPi de patients *ALMS1* p.Ser1142Ter et p.Ser1142Ter – GC, nous avons conclu que l'échec de leur différenciation en cellules de l'EPR est due à leur fond génétique. Bien que leur caryotype et l'analyse de SNP de ces cellules soient validés (**Figure annexe S1**), il est envisageable que des petites mutations ponctuelles n'aient pas été repérées par le logiciel d'analyse des SNP et aient donc altéré le fond génétique de ces cellules. Néanmoins, le fait qu'elles aient pu être différenciées en organoïdes neuro-rétiniens avec succès montre que ces cellules peuvent suivre une différenciation et semble donc indiquer que le fond génétique est intact. Pour résoudre ce problème, nous prévoyons d'intégrer une protéine fluorescente GFP sous l'influence d'un promoteur MITF au sein de nos lignées de CSPi issues de patients. Ainsi, nous pourrions envisager de tester de nouveaux protocoles de différenciation et adapter ceux déjà utilisés en modifiant certaines étapes tout en vérifiant l'effet de ces modifications par activation de la GFP. L'obtention des cellules de l'EPR à partir de ces lignées sera un atout considérable qui nous permettra de comparer l'effet des mutations obtenues par édition de base avec celles issues de patients sur la différenciation en EPR et ainsi tester la robustesse de notre modèle.

Enfin, concernant l'analyse des CSPih, nous avons constaté que les propriétés des cellules mutées ne diffèrent pas de celles des cellules saines. Lors de nos premières analyses par immunofluorescence nous avons l'impression que les noyaux des cellules mutées étaient plus larges que ceux des cellules saines. Ces cellules ayant étéensemencées à des densités égales, nous avons émis l'hypothèse que la taille des noyaux

pouvait être liée aux mutations présentes dans les différents clones. Nous avons également émis l'hypothèse que les clones mutés ont une altération de leur capacité à proliférer et qu'à cause de cette baisse de prolifération les cellules s'étalent plus au fond des puits, augmentant ainsi leur taille et donc la taille de leur noyau. La répétition de nos expériences d'immunofluorescence nous a permis de constater qu'aucune différence significative de cette taille n'existe entre nos clones hormis une légère augmentation pour le clone Gln3610Ter. Puis, l'analyse de la prolifération ainsi réalisée a montré que les différents clones mutés ont une vitesse de prolifération similaire. Seul le clone issu de patients p.Ser1142Ter semble avoir une vitesse de prolifération réduite comparée aux autres clones. Le clone Gln3610Ter semble également proliférer plus lentement même si cela est moins marqué que pour le clone de patient. Cela conforte l'idée qu'en plus de la non-expression d'ALMS1 au centrosome dans ce clone, ce dernier est celui qui se rapproche le plus des cellules issues de patients et donc celui qui est le plus à même de modéliser le SA parmi nos différentes lignées obtenues par CRISPR/Cas9.

La lignée *ALMS1* p.Glu192fs exprime la protéine ALMS1 malgré la présence d'une mutation entraînant un décalage du cadre de lecture censé mener à un codon STOP dans l'exon 4 du gène. L'épitope reconnu par l'anticorps utilisé étant au niveau de l'exon 16, les variants d'*ALMS1* détectés n'ont donc pas l'exon 2 (qui contient la mutation) mais contiennent au moins l'exon 16. Certains de ces variants sont amputés de leur extrémité N-terminale, impliquant que leur transcription débute en aval du codon initiateur de l'exon 1. Nous avons déterminé que la lignée *ALMS1* p.Glu192fs est démunie de l'exon 2 du gène. Cet élément ne contraste pas avec la littérature puisqu'une étude de 2002 décrit un patient atteint du SA et dont le variant d'ALMS1 majoritairement exprimé ne possède pas l'exon 2 (Hearn et al. 2002). De plus, sur les 9

transcrits identifiés par Ensembl.org, seuls 2 possèdent cet exon. Nous n'avons pu identifier plus précisément la taille ou la nature des variants exprimés dans les différentes lignées par Western Blot par manque d'anticorps spécifique. Afin de résoudre ces écueils, nous prévoyons à l'avenir de refaire ces expériences avec des protéines extraites de cellules de l'EPR, un type cellulaire qui exprime ALMS1 en plus grande quantité que les CSPih. Nous pouvons également envisager de purifier nos extraits protéiques par immunoprécipitation pour augmenter les chances de détecter ALMS1. Enfin, la conception de nouveaux anticorps réalisés à façon pourrait nous permettre d'obtenir des anticorps spécifiques.

Tous ces éléments mettent en évidence un phénotype pathologique identifié au sein des organoïdes neuro-rétiniens issus des lignées modèles du SA. L'identification de ce phénotype fait des lignées présentées dans cette étude des outils qui permettront une meilleure compréhension des mécanismes responsables de la perte de la vision chez les patients atteints du SA. De plus, ces outils permettent d'envisager la mise en place de stratégies de criblage à haut débit dans le but d'identifier de nouveaux composés d'intérêt thérapeutique.

### 3.2.4 Matériel et méthodes

#### **Culture des CSPih**

Les CSPih PC056c2 de type sauvage ont été dérivées par Phenocell (Grasse, France) à partir de fibroblastes primaires humains en utilisant des vecteurs de Sendai et cultivées avec le milieu SFM hESC StemPro (Thermo Fisher Scientific) supplémenté en FGF2 (Miltenyi Biotec) dans des boîtes de culture enduites de Vitronectine (Thermo Fisher Scientific). Les cellules issues de patients ont été cultivées avec le même milieu de culture. Le milieu de culture a été changé trois fois par semaine. Les cellules ont été

passées par récolte enzymatique à l'aide d'EDTA 0,25 mM (Invitrogen) tous les 5-7 jours.

Pour les expériences d'édition CRISPR/Cas9, les hiPSC ont été prétraitées avec un inhibiteur de Rock (Y-27632 ; Tocris) au moins une heure avant la transfection et récoltées par traitement enzymatique avec de l'accutase (Life technologies). Après isolation des cellules à l'aide du CellCelector (Sartorius) et amplification des clones dérivés de cellules uniques, les cellules ont été mises en banque à l'aide de CryoStor CS10 (BioLife Solutions Inc.).

### **Edition de base par CRISPR/Cas9 et isolation**

Le protocole d'édition des clones p.Glu192fs et Gln3610Ter a été publié dans (Frank et al. 2023). Parmi les mutations pathogéniques non-sens identifiées sur la base de données ClinVar (NCBI), nous avons sélectionné la mutation Arg352Ter, une mutation C→T apparaissant dans l'exon 5 d'*ALMS1*. Un ARN guide ciblant cette position a été élaboré à l'aide des prédictions des outils de CRISPR RGEN et synthétisé par Integrated DNA Technologies (USA). Après dissociation enzymatique à l'aide d'accutase (Life Technologies), 150 000 CSPih reprises dans 10 µL de tampon de resuspension (Neon Transfection Kit, Invitrogen) ont été mélangés avec 10 µL d'ARN d'AncBE4max (pCMV\_AncBE4max\_P2A\_GFP ; don de David LIU ; plasmide Addgene #112100 ; <https://www.addgene.org/112100/> ; RRID:Addgene\_112100) et 2,5 pmol d'ARN guide dont la séquence est donnée dans le **tableau annexe S1**. Ce mélange a été électroporé à 1200V/20ms/2 impulsions à l'aide de cônes de 10 µL spécifiques au système d'électroporation Neon (Invitrogen). Les cellules ont ensuite étéensemencées dans une plaque spécifique au CellCelector, dans des nanopuits enduits de Vitronectine (Thermo Fisher Scientific). Après obtention d'un clone édité à 54%, l'édition a été répétée selon la même procédure afin d'obtenir un clone totalement édité.

Le protocole d'isolation des cellules à l'aide du CellCelector a été publié dans (Frank et al. 2023).

Le clone Ser1142Ter ainsi que son clone isogénique corrigé par CRISPR/Cas9 Ser1142Ter-GC ont été obtenus dans le cadre d'une collaboration avec le Pr. Brigitte MALGRANGE (GIGA, ULiège, Belgique).

### **Analyse des séquences**

L'ADN génomique a été extrait avec la solution d'extraction d'ADN QuickExtract (Lucigen). L'ADN génomique du clone portant la mutation Arg352Ter a été amplifié par PCR à l'aide du kit Fidelio Hot Start (Ozyme) et du couple d'amorces donné en tableau annexe S1. Les produits d'amplification ont été séquencés par la méthode de Sanger par Genewiz (Azenta Life Sciences). Le taux d'édition a été évalué à l'aide des programmes ICE (Synthego Performance Analysis, ICE Analysis. 2019. v3.0. Synthego) et EditR (Kluesner et al. 2018).

### **Analyse de la confluence**

Après dissociation par traitement à l'Accutase (Life Technologies), les CSPih ont été ensemencées en plaque 24-puits enduites de Vitronectine (Thermo Fisher Scientific) à différentes concentrations (5 000 et 10 000 cellules par puit). Le suivi de la pousse des cellules a été effectué à l'aide d'un Incucyte ZOOM (Sartorius) par un scan toutes les 12h pendant 11 jours. Les images obtenues ont ensuite été analysées à l'aide du logiciel associé à l'Incucyte.

### **Analyse bio-informatique des variants**

L'ADN génomique a été extrait des CSPih avec la solution d'extraction d'ADN QuickExtract (Lucigen). L'ADN génomique des clones a été amplifié par PCR à l'aide

des couple d'amorces donnés en **tableau annexe S1** avec le kit Fidelio Hot Start (Ozyme). Les produits d'amplification ont été séquencés par la méthode de Sanger par Genewiz (Azenta Life Sciences).

La liste des variants d'ALMS1 a été obtenue grâce à la base de données Ensembl.org, une base de données compilant des informations sur les génomes de nombreux organismes (Harrison et al. 2024). Nous avons réduit la liste aux 9 variants codant pour une protéine répertoriés par le site.

### **Différenciation des CSPih en cellules de l'EPR**

Les CSPih ont été différenciées en cellules de l'EPR selon deux protocoles précédemment publiés par notre équipe (Ben M'Barek et al. 2017; Regent et al. 2019).

Brièvement, le premier protocole est un protocole de différenciation dite « spontanée » ou après 3 à 8 semaines de culture des CSPih sur des boîtes de culture enduites de Matrigel hESC-Qualified Matrix, LDEV-free (Corning) avec du milieu de culture DMEM à haute teneur en glucose (Thermo Fisher Scientific/Thermo Fisher) supplémenté avec 20% de remplacement de sérum KnockOut (Thermo Fisher Scientific), 1% de mélange d'antibiotiques Pénicilline/Streptomycine (Thermo Fisher Scientific) et 1% d'acides aminés non-essentiels (Thermo Fisher Scientific), des « tâches » pigmentées apparaissent sur le tapis cellulaire. Après découpage manuel des cellules pigmentées et leur dissociation enzymatique avec du TrypLE (Thermo Fisher Scientific), les cellules ont été cultivées en plaques 24-puits enduites de Matrigel hESC-Qualified Matrix, LDEV-free (Corning) avec du milieu de différenciation dont la teneur en remplacement de sérum KnockOut a été réduite à 4%. Les cellules ont ensuite été amplifiées par dissociation enzymatique au TrypLE et cultivées en plaques 24-puits pendant 2 semaines avant d'être banquées au passage 1 (P1) dans du Cryostor CS10 (BioLife Solutions Inc.).

Le second protocole de différenciation dite « dirigée » repose également sur l'utilisation du même milieu de différenciation à la différence que ce dernier est supplémenté de 10  $\mu$ M de Nicotinamide (Sigma) pendant les 7 premiers jours de différenciation, de 100 ng/mL d'Activine A (Peprotech) entre les jours 7 et 14 de la différenciation et de 3  $\mu$ M de Chir99021 (Tocris) entre les jours 14 et 42 de la différenciation. Au jour 42, les cellules pigmentées sont découpées manuellement et la suite du protocole se déroule comme pour le protocole « spontané ».

Les banques de cellules de l'EPR ont été décongelées sur des boîtes enduites de Matrigel hESC-Qualified Matrix, LDEV-free (Corning) dans du milieu de culture supplémenté en inhibiteur de rock (Y-27632 ; Tocris) puis cultivées entre 2 et 6 semaines dans du milieu de culture. Certaines cellules de l'EPR ont été cultivées sur des inserts de culture ThinCert (Greiner Bio-One, 665610) afin de mesurer leur résistance trans-épithéliale. Ces tapis de cellules ont ensuite été fixés et découpés en quatre morceaux équivalents pour les immunofluorescences.

### **Immunofluorescence**

Les CSPih et les cellules de l'EPR dérivées des CSPih ont été fixées par traitement au paraformaldéhyde à 4% pendant 15 minutes à température ambiante. Après lavage à la solution saline dans un tampon phosphate de Dulbecco (PBS), les cellules ont ensuite été incubées pendant 1 heure dans une solution de blocage PBS, 0,1% Triton X-100 et 10% sérum de cheval puis pendant une nuit à 4°C avec les mélanges d'anticorps primaires donnés en **tableau annexe S2** dans une solution PBS, 0,1% Triton X-100 et 5% sérum. Après lavage, les cellules ont ensuite été incubées avec les anticorps secondaires adéquats (tableau annexe S2), du DAPI et dans certains cas avec de la Phalloïdine (Invitrogen, A22287, 1:50) pendant 1h à température ambiante. Les tapis de cellules ayant été cultivés sur inserts ont été placés sur lame puis montés sous lamelles dans

du Fluoromount-G (Southern Biotech) avant d'être laissées à sécher. Les images ont été acquises à l'aide d'un microscope confocal Zeiss LSM880-Airyscan contrôlé par le logiciel Zen Black (Zeiss).

### **Intensité des signaux ALMS1/Péricentrine, taille des noyaux, volume du cil primaire et analyse par REShAPE**

L'intensité des signaux d'immunofluorescence d'ALMS1 et de la péricentrine ainsi que la taille des noyaux ont été mesurés à l'aide du logiciel ImageJ/Fiji. Le volume du cil primaire a été mesuré à l'aide du logiciel Imaris. Les cellules de l'EPR ont été analysées à l'aide du programme REShAPE disponible sur le site du NIH (<https://github.com/NIH-NEI/RESHape>) (Ortolan et al. 2022).

### **Différenciation des CSPih en organoïdes neuro-rétiniens**

Le protocole de différenciation est adaptée d'un protocole publié par l'équipe du Dr. GOUREAU à l'Institut de la Vision (Reichman et al. 2017; Slembrouck-Brec et al. 2019). Brièvement, les cellules sont passées sur des boîtes de culture enduites de Matrigel hESC-Qualified Matrix, LDEV-free (Corning) après détachement enzymatique au Gentle (StemCell Technologies). Lorsqu'elles atteignent 70-80% de confluence, les cellules sont cultivées pendant 2 jours avec du milieu TeSR-E6 (StemCell Technologies) contenant 1% de Pénicilline/Streptomycine (Thermo Fisher Scientific). A partir du deuxième jour de différenciation, ce milieu est supplémenté de 1% de supplément N2 (StemCell Technologies) et le milieu est changé tous les 2-3 jours. Au 28<sup>ème</sup> jour de différenciation, des structures auto-formées identifiées comme étant des organoïdes sont détachées à l'aide d'une aiguille et transférées dans des plaques 6-puits à faible adhérence (Corning) en tant que structures flottantes (culture 3D). Ces structures sont cultivées dans du milieu ProB27 composé de DMEM:Nutrient Mixture F12, 1% d'acides

aminés non essentiels (Thermo Fisher Scientific), 2% de supplément B27, 1% de Pénicilline/Streptomycine (Thermo Fisher Scientific) et du FGF2. A partir du 35<sup>ème</sup> jour de différenciation, le FGF2 est retiré du milieu de culture.

Afin d'obtenir des organoïdes ne présentant pas de structures en rosettes et où les photorécepteurs se développent en périphérie, un protocole modifié à certaines étapes a été utilisé (Rodrigues et al. 2022). Notamment, entre les jours 28 et 84, la vitamine A est retirée du milieu de différenciation tandis qu'à partir du jour 35, le milieu est supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal (Thermo Fisher Scientific) et 2 mM de Glutamax (Thermo Fisher Scientific).

### **Analyse de la taille**

Les organoïdes ont été photographiés à J150 à l'aide d'une loupe EVOS XL Core (Invitrogen) munie d'un objectif 4x. Les mesures de la taille des organoïdes ont été effectuées à l'aide du logiciel ImageJ/Fiji.

### **Cryosection et marquage des organoïdes**

Les organoïdes ont été fixés par traitement au paraformaldéhyde à 4% pendant 15 minutes à 4°C puis lavées dans une solution saline dans un tampon phosphate de Dulbecco (PBS). Les organoïdes ont ensuite été incubés pendant au minimum 1 heure dans une solution de PBS, 30% sucrose (Sigma-Aldrich) puis inclus dans une solution de PBS, 10% sucrose, 7,5% gélatine sous forme de blocs. Après congélation des blocs dans de l'isopentane à -70°C, ces derniers ont été conservés à -80°C. Des coupes de 10 µm d'épaisseur ont été réalisés sur lame de verre avec un cryostat CM1520 (Leica) et conservées à -80°C.

La gélatine a été retirée des lames par plusieurs bains successifs dans du PBS chauffé à 37°C. Les lames ont ensuite été incubées 1 heure dans une solution de blocage PBS, 0,1% Triton X-100 et 10% sérum. Les lames ont ensuite été incubées pendant une nuit à 4°C avec les mélanges d'anticorps primaires donnés en **tableau annexe S2** dans une solution PBS, 0,1% Triton X-100 et 5% sérum. Après lavage, les lames ont ensuite été incubées 1 heure à température ambiante avec les anticorps secondaires adéquats (tableau annexe S2) et du DAPI dans une solution PBS, 0,1% Triton X-100 et 5% sérum. Après lavage, les lames ont été montées sous lamelles dans du Fluoromount-G (Southern Biotech), laissées à sécher et les images ont été à l'aide d'un microscope confocal Zeiss LSM880-Airyscan contrôlé par le logiciel Zen Black (Zeiss).

### **RT-qPCR**

Les ARN totaux des organoïdes ont été extraits à l'aide du kit RNeasy Plus Mini (Qiagen) et l'ADN complémentaire synthétisé à l'aide du kit SuperScriptIII (Invitrogen). La RT-PCR quantitative en temps réel a été effectuée à l'aide du kit HiGreen qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific), du Quant Studio 12K Flex (Applied Biosystems) et des couples d'amorces dont la séquence est donnée en tableau annexe S1. Les expériences ont été réalisées avec trois réplicats techniques par plaque et les niveaux d'expressions ont été normalisés par rapport au gène de ménage *18S*. L'expression relative a été déterminée en calculant le  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

### **Analyse des SNP**

De l'ADN génomique a été extrait des CSPih à l'aide du kit Nucleospin Tissue (Macherey Nagel). L'hybridation de l'ADNg a été réalisée sur la puce Infinium Core-24v1-2 BeadChip (Illumina). Les données ont été analysées avec le logiciel GenomeStudio v2.0.5 (Illumina).

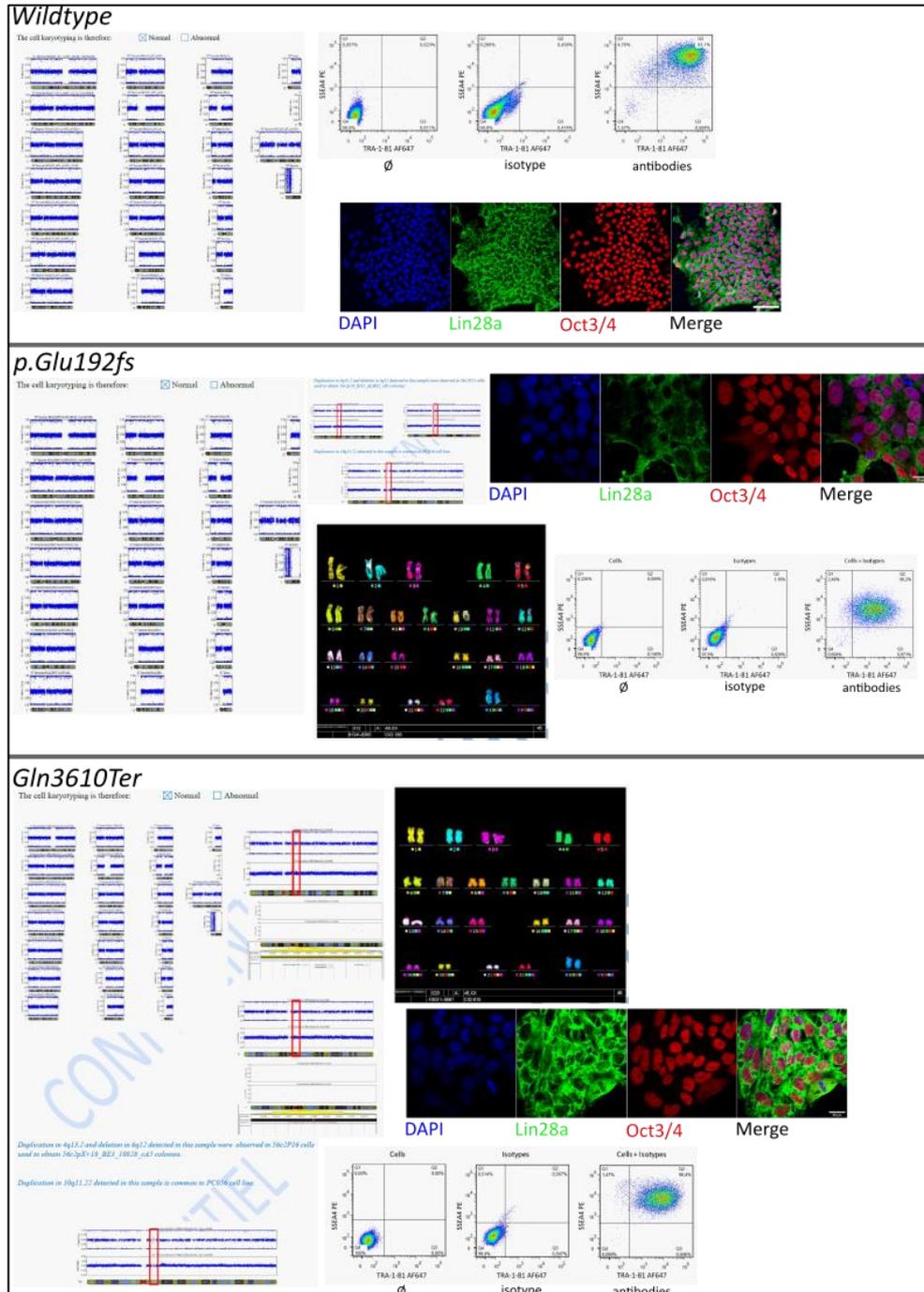
### **Analyse du caryotype**

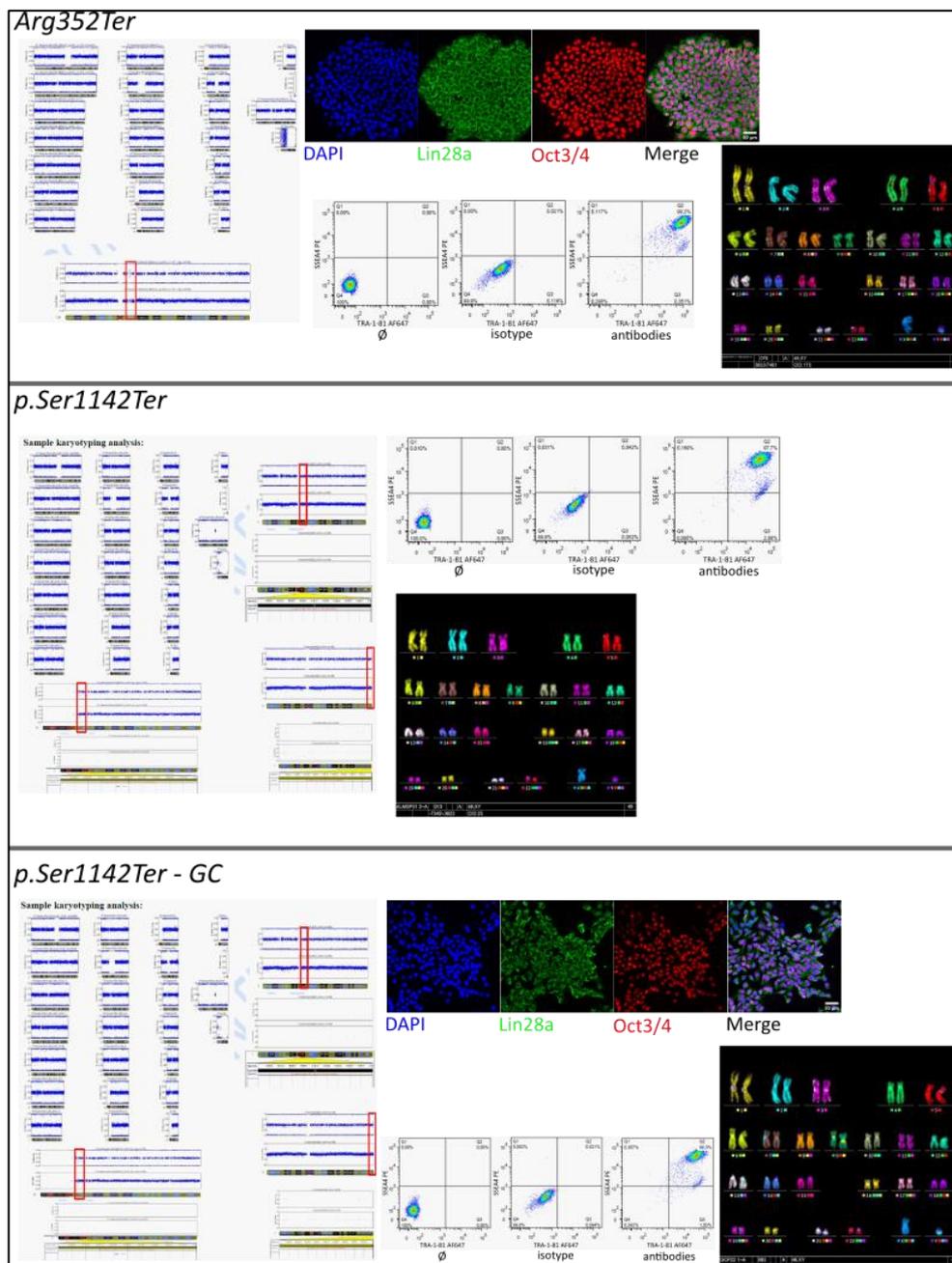
Les cellules ont été bloquées en métaphase à l'aide de colchicine (Eurobio) pendant 90 minutes puis ont été détachées avec de la trypsine. Après centrifugation, le surnageant a été éliminé et le culot cellulaire a été mis en suspension et réchauffé dans une solution hypotonique puis fixé avec une solution de Carnoy. Des gouttes de la suspension cellulaire ont été étalées sur des lames de verre et laissées à sécher. La sonde mFISH 24Xcite (MetaSystems) et le produit de montage ProLong Gold Antifade avec DAPI (Thermo Fisher Scientific) ont été utilisés pour la coloration mFISH. Soixante-dix métaphases ont été acquises avec le logiciel Metafer MetaSystems couplé à un microscope AxioImager Zeiss Z2 équipé d'une caméra cool cube et d'objectifs 10x et 63x. Les images ont été analysées avec le logiciel Isis (MetaSystems).

### **Analyses statistiques**

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel PRISM version 9.3.1 pour Windows.

### 3.2.5 Annexes





**Figure annexe S1 :**  
 Contrôles qualité effectués sur les différents clones de CSPih.

| <b>Primers</b>                |                       |                          |         |
|-------------------------------|-----------------------|--------------------------|---------|
| <b>Gene</b>                   | <b>forward</b>        | <b>reverse</b>           |         |
| <i>ALMS1</i> _Arg352Ter       | ACAGCTGTTGGGTCTCAGTG  | CCTGTGTCCAATACTGCCCA     |         |
| <i>ALMS1</i> _exon1           | AGGATTTTGCCTCCGCTGTC  |                          |         |
| <i>ALMS1</i> _exon2           | TTTGAAACAACAGCTCAGCG  |                          |         |
| <i>ALMS1</i> _exon3           | GGAGGAGGGCATATTGACGC  |                          |         |
| <i>ALMS1</i> _exon4           | TGCCTTTGCTGACCTGTTTG  |                          |         |
| <i>ALMS1</i> _exon5           |                       | TTCCTGTGTCCAATACTGCC     |         |
| <i>ARR3</i>                   | CCCAGAGCTTGCAGTAACC   | CACAGGACACCATCAGGTTG     |         |
| <i>CNGA3</i>                  | CTGCAAGGTGTTTTAGGCTTT | TTATCAGGTGGTGGTGGTGAAGTT |         |
| <i>CRX</i>                    | GTGAGGAGGTGGCTCTGAG   | CTGCTGTTTCTGCTGCTGTC     |         |
| <i>GLAST1</i>                 | AACCCATCGACAGTGAAACC  | TCCCTTGTGTTTTGGAGGAC     |         |
| <i>NR2E3</i>                  | GATCCTGAGCACGTAGGC    | GCAATTTCCCAAACCTCACGG    |         |
| <i>NRL</i>                    | GGGCTGAGTCCTGAAGAGG   | TTTAGCTCCCGCACAGACAT     |         |
| <i>OPN1MW</i>                 | GGCTACCCGTCTCCCTGT    | GCAGACCACCATCCATCTCT     |         |
| <i>PAX6</i>                   | GCCAGCAACACACCTAGTCA  | TGTGAGGGCTGTGTCTGTTT     |         |
| <i>PKC<math>\alpha</math></i> | GTCCACAAGAGGTGCCATGA  | ACAGTGATCGCAGAAGGTGG     |         |
| <i>Recoverin</i>              | TAACGGGACCATCAGCAAG   | CCTCGGGAGTGATCATTTTG     |         |
| <i>Rhodopsin</i>              | TATGGGCAGCTCGTCTTCA   | TTCTGTGTGGTGGCTGACTC     |         |
| <i>VSX2</i>                   | CTGCCGGAAGACAGGATACA  | TAGAGCCCATACTCCGCCA      |         |
| <i>18S</i>                    | GAGGATGAGGTGGAACGTGT  | TCTTCAGTCGCTCCAGGTCT     |         |
| <b>gRNA</b>                   |                       |                          |         |
| <b>Position</b>               | <b>Sequence</b>       |                          |         |
| p.Glu192fs                    | CAATATGCCCTCCTCCAGAG  | AGG                      | reverse |
| Gln3610Ter                    | GCAACAGAGACAGCCTGAGT  | TGG                      | forward |
| Arg352Ter                     | AGACACGAAAAGATACACAG  | TGG                      | forward |

**Tableau annexe S1 :**

Liste des amorces utilisées pour les PCR et RT-qPCR.

| Antibodies         |                      |                             |               |        |           |                    |           |            |         |         |
|--------------------|----------------------|-----------------------------|---------------|--------|-----------|--------------------|-----------|------------|---------|---------|
| Immunofluorescence |                      |                             |               |        |           |                    |           |            |         |         |
|                    | Primary              |                             |               |        |           | Secondary          |           |            |         |         |
|                    | Protein              | Reference                   | Dilution      | Host   | Type/Host | Wavelength         | Reference | Dilution   |         |         |
| iPS cells          | ALMS1                | Abcam                       | ab84892       | 1:200  | Rabbit    | Donkey anti Rabbit | 488       | Invitrogen | A21206  | 1:500   |
|                    | Pericentrin          | Abcam                       | ab28144       | 1:200  | Mouse     | Donkey anti Mouse  | 555       | Invitrogen | A31570  | 1:500   |
|                    | Oct3/4               | Santa Cruz                  | sc-5279       | 1:100  | Mouse     | Donkey anti Goat   | 488       | Invitrogen | A11055  | 1:500   |
|                    | Lin28a               | R&D Systems                 | AF3757        | 1:200  | Goat      |                    |           |            |         |         |
| RPE cells          | MERTK                | Abcam                       | ab52968       | 1:200  | Rabbit    | Donkey anti Rabbit | 488       | Invitrogen | A21206  | 1:500   |
|                    | Bestrophin           | Novus                       | NB300-164     | 1:200  | Mouse     | Donkey anti Mouse  | 555       | Invitrogen | A31570  | 1:500   |
|                    | PAX6                 | Biologend                   | 901301        | 1:200  | Rabbit    | Phalloidin         | 647       | Invitrogen | A22287  | 1:50    |
|                    | MITF                 | Dako                        | M3621         | 1:200  | Mouse     | Donkey anti Rabbit | 555       | Invitrogen | A31572  | 1:500   |
|                    | Pericentrin          | Abcam                       | ab28144       | 1:200  | Mouse     | Donkey anti Mouse  | 488       | Invitrogen | A21202  | 1:500   |
|                    | ARL13B               | Proteintech                 | 17711-1-AP    | 1:200  | Rabbit    |                    |           |            |         |         |
| Organoids          | Opsins (Red & Green) | Millipore                   | AB5405        | 1:500  | Rabbit    | Donkey anti Rabbit | 488       | Invitrogen | A21206  | 1:500   |
|                    | Rhodopsin            | Millipore                   | MABN15        | 1:200  | Mouse     | Donkey anti Mouse  | 555       | Invitrogen | A31570  | 1:500   |
|                    | Opsins (Blue)        | Santa Cruz                  | sc-143563     | 1:500  | Goat      | Donkey anti Goat   | 647       | Invitrogen | A21447  | 1:500   |
|                    | CRX                  | Abnova                      | H00001406-M02 | 1:1000 | Mouse     |                    |           |            |         |         |
|                    | Recoverin            | Sigma-Aldrich               | ZRB1107       | 1:1250 | Rabbit    |                    |           |            |         |         |
|                    | Peripherin           | Proteintech                 | 18109-1-AP    | 1:200  | Rabbit    |                    |           |            |         |         |
|                    | ARL13B               | Proteintech                 | 17711-1-AP    | 1:500  | Rabbit    |                    |           |            |         |         |
|                    | Cleaved Caspase 3    | Cell Signaling Technologies | 96615         | 1:400  | Rabbit    |                    |           |            |         |         |
| WB                 |                      |                             |               |        |           |                    |           |            |         |         |
|                    | Primary              |                             |               |        |           | Secondary          |           |            |         |         |
|                    | Protein              | Reference                   | Dilution      | Host   | Type/Host |                    |           |            |         |         |
|                    | ALMS1                | Invitrogen                  | PA5-103596    | 1:2000 | Rabbit    | anti Rabbit        | HRP       |            |         | 1:10000 |
|                    | β-actine             | Li-Cor                      | 924-42210     | 1:1000 | Rabbit    | anti Goat          | HRP       |            |         | 1:10000 |
|                    | ALMS1                | Proteintech                 | 27231-1-AP    | 1:500  | Rabbit    | anti Rabbit        | HRP       | Cytiva     | NA934VS | 1:10000 |
|                    | ALMS1                | Invitrogen                  | PA5-18141     | 1:500  | Goat      |                    |           |            |         |         |
|                    | ALMS1                | Thermo (Fortis)             | A301-816A     | 1:500  | Rabbit    |                    |           |            |         |         |

### Tableau annexe S2 :

Liste des anticorps utilisés pour les immunofluorescences et Western Blot.

## 4 DISCUSSION GENERALE

---

Pour rappel, cette thèse avait pour objectif l'établissement d'un modèle cellulaire du SA permettant une meilleure compréhension des symptômes visuels du SA. Au cours de cette thèse, j'ai réussi à obtenir plusieurs clones de CSPih mutées au sein du gène *ALMS1* et ai pu différencier ces clones en plusieurs types cellulaires pour lesquels je porte un intérêt particulier à savoir les cellules de l'EPR et les photorécepteurs, ces derniers étant obtenus au sein d'organoïdes neuro-rétiniens. Cette thèse s'est également concentrée sur la caractérisation des lignées différenciées et sur la recherche d'un phénotype pathologique permettant de les distinguer. Pour aller plus loin, dans cette partie je propose de discuter en quoi les modèles obtenus permettent de mieux comprendre les anomalies histologiques observées, comment ils peuvent être utilisés pour la recherche de nouvelles thérapies et enfin je discuterai de comment les résultats obtenus s'inscrivent dans le contexte multi-systémique du SA.

### 4.1.1 Amélioration de la compréhension des anomalies histologiques dans les organoïdes modèles du SA.

Au sein des organoïdes neuro-rétiniens modélisant le SA, les marqueurs des cônes et des bâtonnets ne sont pas ou très peu retrouvés à 150 jours de différenciation, bien qu'ils le soient au sein des organoïdes issus des cellules saines. On observe également des signes de mortalité cellulaire par apoptose bien que la nature des cellules mourantes ne soit pas précisée. Ainsi, il n'est pas déterminé si les photorécepteurs sont moins produits au cours de la formation des organoïdes ou si leur formation est plus tardive (i); si ceux-ci meurent après avoir été produits (ii); ou bien s'ils sont présents mais que l'expression de certains marqueurs est plus faible voire absente (iii).

La première hypothèse (i) est due à un défaut ou à un décalage de la production des photorécepteurs au sein des organoïdes. Les photorécepteurs sont produits à partir de progéniteurs rétiniens co-exprimant les marqueurs VSX2 et PAX6 (Gozlan et al. 2023). Au sein des organoïdes, ces progéniteurs apparaissent autour du 35<sup>ème</sup> jour de différenciation, comme décrit dans une étude de l'équipe du Dr. GOUREAU (Reichman et al. 2017). Les progéniteurs rétiniens subissent des divisions neurogéniques terminales pour donner des précurseurs de photorécepteurs qui au cours de la maturation vont donner des cônes et des bâtonnets matures (Swaroop, Kim, et Forrest 2010). Dans le cas d'organoïdes cérébraux, une équipe de recherche a démontré que les progéniteurs peuvent subir des divisions symétriques permettant leur expansion et leur renouvellement mais également des divisions asymétriques permettant de générer des neurones et des progéniteurs intermédiaires (Lancaster et al. 2013). Cette même équipe a montré que les organoïdes dérivés de cellules de patients atteints de microcéphalie et porteurs de mutations dans *CDK5RAP2* présentent une réduction nette du nombre de progéniteurs et une différenciation neuronale prématurée. Cette réduction est due à un déséquilibre entre divisions symétriques et asymétriques. Les divisions symétriques ralentissent au profit des divisions asymétriques donnant naissance à des neurones et des progéniteurs intermédiaires de façon plus précoce tandis que la réserve de progéniteurs initiaux s'épuise. De plus, dans une autre étude, l'équipe du Dr. GAMM s'est intéressée au développement d'organoïdes d'un patient porteur d'une mutation dans l'homéodomaine de *VSX2* (Phillips et al. 2014). Cette équipe conclue qu'au sein de ces organoïdes, la maturation des photorécepteurs est retardée comme le met en évidence l'absence de recoverine à 80 jours de différenciation. Un phénomène de décalage de la production des photorécepteurs est donc une éventualité plausible dans un contexte thérapeutique.

La deuxième hypothèse formulée (ii) est que les mutations entraînent une mort cellulaire importante des cellules au sein des organoïdes. Différents types de morts cellulaires ont été décrites dans les organoïdes, notamment la nécrose et l'apoptose. Dans le cas des organoïdes modèles du SA, j'ai identifié des phénomènes d'apoptose mis en évidence par un marquage de la Caspase-3 clivée. Toutefois, je n'ai pas déterminé si cette forte mortalité cellulaire est due à des défauts observés chez les photorécepteurs. La nécrose est un type de mort cellulaire qui survient en réponse à une lésion ou à un traumatisme dans les cellules. Cette mort peut avoir lieu en l'absence de nutriments ou à la suite d'un manque d'oxygène notamment au cœur des organoïdes. L'apoptose est un processus programmé et régulé par lequel les cellules se détruisent de manière ordonnée. Ce mécanisme est essentiel pour le maintien de l'homéostasie et le bon développement des organismes multicellulaires et donc des organoïdes. Une équipe travaillant sur des organoïdes issus de patients présentant des mutations dans le gène *RPGR*, gène responsable de 20 % des rétinites pigmentaires (Patnaik et al. 2015), a observé une mortalité plus importante dans les organoïdes de patients à 77 et 154 jours de différenciation (Deng et al. 2018). Cette mortalité étant identifiée par TUNEL plutôt que par marquage de la Caspase-3 clivée, les auteurs concluent qu'elle résulte d'une nécrose plutôt que d'une mort programmée par apoptose. Dans une autre étude, l'équipe du Pr. LAKO s'est penchée sur des modèles de rétinite pigmentaire liée à *PRPF31* et a conclu que les organoïdes dérivés de ces modèles présentent une dégénération des photorécepteurs dès 147 jours de différenciation s'accompagnant d'une augmentation du nombre de cellules apoptotiques au sein des organoïdes (Buskin et al. 2018). La mort cellulaire observée au sein des organoïdes modèles du SA peut donc être due à une nécrose ou à un phénomène d'apoptose. Il a été montré précédemment que le cil primaire est impliqué dans la suppression de la nécroptose médiée par Ripk3 (Kieckhöfer et al. 2022). La

nécroptose est une sorte de nécrose programmée se distinguant de la nécrose et de l'apoptose. Il serait intéressant de mener des tests complémentaires tels qu'un TUNEL ou bien la mesure d'expression des gènes impliqués dans l'apoptose afin de comparer mes résultats avec ceux issus de la littérature et ainsi déterminer quel type de mort cellulaire a lieu dans les organoïdes mutés et si une mort des photorécepteurs est susceptible d'expliquer les anomalies histologiques des organoïdes modélisant le SA.

La troisième hypothèse formulée (iii) est une expression anormale des marqueurs des cônes et des bâtonnets menant à un défaut d'expression, à une expression diminuée ou bien à défaut de localisation de ces marqueurs. Il est intéressant de noter que la littérature mentionne plusieurs modèles murins du SA pour lesquels l'expression de la rhodopsine a été étudiée. Pour rappel, la rhodopsine est un marqueur des bâtonnets. Ces études rapportent que les souris *Alms1<sup>Gt(XH152)Byg</sup>* expriment la rhodopsine aux noyaux des photorécepteurs au lieu de l'exprimer dans les segments externes (G.B. Collin et al. 2005). Le transport de la rhodopsine est également défectueux dans les photorécepteurs des souris *Alms1<sup>L2131X/L2131X</sup>* (G. Li et al. 2007). Dans les souris *Alms1<sup>tvrm102</sup>*, la rhodopsine est mal localisée et n'est pas retrouvée dans le segment externe (Krebs et al. 2017; Gayle B. Collin et al. 2020). Par ailleurs, plusieurs études s'intéressant à des défauts des photorécepteurs dans des organoïdes modélisant des maladies génétiques mentionnent une mauvaise localisation de la rhodopsine dans les bâtonnets plutôt qu'une absence totale de son expression (Deng et al. 2018; Kruczek et al. 2022). Dans les ciliopathies notamment, un défaut du cil connecteur serait à l'origine d'un arrêt du transport de la rhodopsine au segment externe des photorécepteurs (Jing Wang et Deretic 2014). Etant donné l'absence d'expression de la rhodopsine dans tous les organoïdes mutés dans *ALMS1*, le transport de la rhodopsine n'a pas pu être étudié dans nos organoïdes modèles et par conséquent, la question se pose de savoir si ce transport est affecté dans ces organoïdes. De futures expériences permettront de

préciser le niveau d'expression de la rhodopsine mais également des opsines au cours du temps. Ces expériences permettront ainsi de déterminer si les photorécepteurs au sein des organoïdes modèles du SA présentent un défaut de transport des protéines et si ce défaut est dû à un mauvais fonctionnement du cil connecteur.

Dans le cas où le transport de la rhodopsine ne serait pas altéré dans les organoïdes modèles du SA, cette différence avec ce qui est observé dans les modèles murins pourrait être due à une différence dans la cinétique de la dégradation des photorécepteurs entre l'Homme et la souris. En effet, bien que la souris soit un modèle robuste largement utilisé pour la modélisation de maladies humaines, des différences subsistent entre ces deux espèces. Notamment, en raison de leur adaptation à la vie nocturne, les rétines des souris sont majoritairement composées de bâtonnets et ne possèdent pas de macula, contrairement à la rétine humaine (Gayle B. Collin et al. 2020). Ces différences physiologiques sont à prendre en compte dans la comparaison des deux espèces dans un contexte pathologique.

#### 4.1.2 Vers un criblage des modèles cellulaires du SA.

La modélisation cellulaire du SA que j'ai réalisé au cours de ma thèse permet d'envisager des stratégies de criblage à haut débit dans le but d'identifier des composés pharmacologiques susceptibles de moduler la pathologie. Le criblage à haut débit permet de tester un nombre important de composés pharmacologiques sur des cellules modèles présentant un phénotype pathologique afin d'observer un retour à l'état normal. Le criblage peut être ciblé sur un mécanisme moléculaire identifié comme ayant un rôle dans la pathologie ou basé simplement sur un phénotype pathologique sans connaître les mécanismes sous-jacents. Les molécules criblées peuvent faire partie de chimiothèques représentant une large diversité de forme chimiques, être restreintes

à des formes spécifiques, être extraites de produits naturels, ou encore correspondre à des molécules chimiques ayant déjà été autorisées dans d'autres indications. On dit de ces dernières qu'elles sont repositionnables. Le repositionnement a pour avantage d'utiliser des molécules ayant déjà passé plusieurs étapes de validation, réduisant ainsi les risques liés à leur sécurité mais permet également de réduire les coûts et le temps liés au développement du médicament.

Dans ma recherche d'un phénotype pathologique, j'ai identifié des anomalies au sein des organoïdes mais pas au niveau des cellules de l'EPR. A l'origine de mon projet de thèse, les cellules de l'EPR apparaissaient comme des candidats potentiels prometteurs pour l'élaboration d'une stratégie de criblage de composés moléculaires repositionnables à haut débit. Les cellules de l'EPR apparaissaient comme de bons candidats car elles sont cultivables en 2 dimensions et leur culture peut être miniaturisée et adaptée à des plaques 384-puits utilisées pour le criblage à haut débit. De plus, leur cil primaire visible est un atout pour la visualisation d'un phénotype. En effet, le cil primaire et la ciliogenèse se sont montrés comme des indicateurs fiables pour constater l'effet de molécules dans des criblages de molécules repositionnables sur des cellules modèles de ciliopathies. Par exemple, une stratégie de criblage a été conduite sur des cellules de l'EPR mutées dans le gène *CEP290* dont les mutations peuvent mener au syndrome de Joubert, au syndrome de Meckel, à l'amaurose congénitale de Leber de type 10 (LCA10) ou à des rétinopathies isolées (Y. J. Kim et al. 2018; Leroy et al. 2021). Ces cellules de l'EPR présentent une absence de cil primaire due à une ciliogenèse défectueuse et le criblage mené par l'équipe du Dr. KIM a permis d'identifier l'eupatiline, un flavonoïde, comme un candidat thérapeutique potentiel. Cette molécule permet de restaurer la ciliogenèse dans les cellules de l'EPR mutées dans *CEP290*. Par ailleurs, une autre étude a démontré que les organoïdes dérivés de lignées mutées au

niveau du gène *CEP290* présentent des photorécepteurs avec une rétention de la rhodopsine et des opsines L et M dans leur segment externe (Corral-Serrano et al. 2023). Le traitement de ces organoïdes avec l'eupatiline réduit cette rétention en modulant l'expression de la rhodopsine et en ciblant les voies de plasticité synaptique et de la ciliogenèse. Une autre étude a permis d'identifier par criblage des molécules capables de corriger la ciliogenèse défectueuse observée dans des cellules épithéliales rénales issues de patients mutés dans *NPHP1*, un gène responsable de la majorité des ciliopathies liées aux néphronophthyses juvéniles (Garcia et al. 2022). Parmi ces molécules, l'alprostadil s'avère être un candidat sérieux permettant également de restaurer l'expression du cil primaire dans des cellules épithéliales rénales urinaires de patients.

Aujourd'hui, force est de constater que les cellules de l'EPR issus des clones mutés dans *ALMS1* ne semblent pas exprimer de marqueurs phénotypiques explicites, notamment au niveau du cil primaire. En l'absence de phénotype pathologique évident, une approche basée sur la cible peut également être envisagée. Nous avons modélisé le SA à partir de mutations induisant un codon STOP précoce. Or, il existe des composés permettant de « *read-through* » (lire à travers) les codons STOP et de restaurer ainsi l'expression d'*ALMS1*. Notamment, dans une étude de 2019, l'équipe du Pr. MOOSAJEE a identifié deux composés, l'ataluren (PTC124) et l'amlexanox permettant de restaurer l'expression d'*ALMS1* au sein de fibroblastes issus de patients (Eintracht et al. 2021). En plus de l'expression d'*ALMS1*, ces composés permettent de restaurer l'expression d'*IFT88* et de *SSTR3*. Un criblage de molécules issues de chimiothèques contenant de telles molécules permettrait ainsi de contourner l'effet des codons STOP au sein d'*ALMS1*.

Même si la recherche d'un phénotype pathologique au sein des cellules de l'EPR se poursuit, une alternative à ces cellules doit être trouvée pour pouvoir mettre en

place une stratégie de criblage visant à identifier des cibles moléculaires d'intérêt thérapeutique. Etant donné les résultats prometteurs obtenus sur les organoïdes, l'utilisation de ces derniers semble être une alternative intéressante. La littérature fait état de plusieurs études ayant utilisé des organoïdes dans un contexte de criblage. Ces études rappellent la pertinence des organoïdes dans la modélisation de pathologies multi-systémiques en raison de leur capacité à reproduire des systèmes plus complexes que les cultures bidimensionnelles. Ainsi, plusieurs méthodes visant à automatiser la production d'organoïdes dans le but de réaliser un criblage ont été publiées (Bozal et al. 2024; Renner et al. 2020). Ces criblages peuvent s'appuyer sur des techniques biochimiques ou basées sur l'imagerie pour détecter des changements phénotypiques au sein même des organoïdes. De plus, d'autres études se sont penchées sur des organoïdes neuro-rétiniens qui présentent l'avantage de mieux mimer la taille, la structure et la fonction d'une rétine humaine (S. Ma et al. 2024). Ces études rapportent que des criblages de molécules ont pu être réalisés sur ces structures à l'aide de rapporteurs fluorescents, de techniques d'imagerie ou encore des multi-électrodes permettant de mesurer des changements physiologiques (Aasen et Vergara 2020; L. Li et al. 2016; Hallam et al. 2018). Les prochaines expériences auront pour but de mettre en place le protocole de criblage de molécules repositionnables sur les organoïdes issus des lignées cellulaires modèles du SA.

#### 4.1.3 Traitements potentiels dans le contexte multi-systémique du SA.

Dans cette étude je me suis concentré essentiellement sur l'effet des mutations dans *ALMS1* sur les photorécepteurs et sur les cellules de l'EPR. Le SA étant un syndrome multi-systémique, c'est-à-dire impactant différents organes, il est important de garder à l'esprit que le développement d'une thérapie ayant un impact bénéfique sur plusieurs de ces organes serait une avancée majeure dans le combat contre la maladie.

Les composés pouvant potentiellement être identifiés comme ayant un effet thérapeutique peuvent cibler différents mécanismes responsables des symptômes de la maladie. En fonction des mécanismes ciblés et de leur implication dans différents symptômes du SA, on peut envisager de traiter une palette plus ou moins large de symptômes. Par exemple, en utilisant des composés permettant de faire du « *read-through* » sur les codons STOP précoces au sein d'*ALMS1*, l'impact attendu devrait concerner l'ensemble des cellules où le gène est exprimé. De même, les stratégies de thérapie génique permettent de cibler plusieurs types cellulaires différents et de faire parvenir un « gène médicament » aux cellules atteintes. Néanmoins, des obstacles empêchent l'application de ce type de stratégies. Notamment, dans le cas d'*ALMS1*, une stratégie de thérapie génique serait difficile à mettre en place compte tenu de la taille du gène à transduire dans les cellules. Bien que des techniques visant à augmenter la taille des gènes pouvant être transportés par les AAV (*adeno-associated virus* ; virus adéno-associé) régulièrement utilisés en thérapie génique soient développées (Riedmayr et al. 2023; Yan et al. 2000; Cashman, McCullough, et Kumar-Singh 2007; Volkmann et Iwai 2010), la taille du gène *ALMS1* reste conséquente et celui-ci ne peut donc pas être transduit aux cellules ciblées. Par ailleurs, bien que dans le cas du SA plusieurs types cellulaires soient ciblés par l'AAV pour recevoir le « gène médicament », il est important de veiller à ce que des types cellulaires sains ne soit pas pris pour cible de façon non voulue. La conception de l'AAV utilisé demande donc une attention toute particulière pour éviter une transduction non ciblée. Dans une étude de 2020, une équipe s'intéressant au syndrome de Bardet-Biedl (BBS) a démontré une accumulation de glycosphingolipides dans les cellules épithéliales rénales de souris modèles *Bbs2*<sup>-/-</sup> (Husson et al. 2020). Ces souris ont été nourries par un régime contenant une molécule modulant le métabolisme des glycosphingolipides, le Genz-667161. Cette molécule a pour

effet de réduire l'obésité et les atteintes hépatiques mais également de corriger la dégénération de la rétine de ces souris ainsi que leur perte d'odorat. Il a ensuite été prouvé que Genz-667161 a un effet bénéfique sur ces différents types cellulaires en influant sur la ciliogenèse et en assurant la préservation de la longueur du cil primaire. Ce type de mécanisme pourrait être également impliqué dans les symptômes du SA et donc pourrait être ciblé par des molécules identifiées par criblage dans le but d'agir sur plusieurs types cellulaires. Un autre mécanisme sur lequel des composés thérapeutiques pourraient agir est la régulation du cycle cellulaire. En effet, plusieurs types cellulaires concernés par le SA présentent une dérégulation de la prolifération mettant en évidence une atteinte du cycle cellulaire. Notamment, une étude a montré que des fibroblastes déficients en *ALMS1* sur-expriment des gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire (des cyclines et des kinases dépendantes des cyclines) (Zulato et al. 2011). Une autre étude a mis en évidence que des cardiomyocytes néonataux issus de souris mutées dans *Alms1* présentent une augmentation du nombre de cellules en phase G2/M du cycle cellulaire et que l'arrêt du cycle cellulaire est altéré dans ces cellules. L'altération de la régulation du cycle cellulaire semble donc être un point commun à différents organes atteints du SA et pourrait par conséquent être une cible à envisager pour l'identification de composés thérapeutiques.

Si dans cette étude, seuls des photorécepteurs et des cellules de l'EPR ont été différenciées à partir des lignées modèles, il pourrait être intéressant de vérifier l'expression de marqueurs de différenciation des autres types cellulaires de la rétine toujours à l'aide des organoïdes dérivés des lignées mutées et saines. L'expression de ces marqueurs permettrait de déterminer si les défauts des photorécepteurs sont concomitants à d'autres défauts cellulaires au sein des organoïdes. Dans le cas du syndrome d'Usher de type 1 (USH1B) caractérisé par des mutations dans le gène *MYO7A*, l'équipe du Pr. SOWDEN a déterminé qu'au sein d'organoïdes neuro-rétiniens, le gène *MYO7A*

est exprimé par les photorécepteurs, type cellulaire directement concerné par le syndrome mais également par les cellules bipolaires et les cellules gliales de Müller (Leong et al. 2022). De plus, ces dernières expriment d'autres gènes associés à USH1B tels que *USH1G*, *USH1C*, *CDH23* et *CIB2* suggérant un rôle des cellules gliales de Müller dans le développement de la maladie. Enfin, bien que l'apoptose des cellules gliales de Müller n'ait pas été identifiée comme une caractéristique majeure liée à la dégénération de la rétine dans le cadre d'USH1B (Toms, Pagarkar, et Moosajee 2020), les auteurs ont mis en évidence une expression accrue des gènes impliqués dans les voies liées à l'apoptose. Ces éléments confirment l'intérêt de s'intéresser à d'autres types cellulaires que les photorécepteurs dans le cas du SA.

De même, tous les résultats présentés dans ma thèse sont obtenus sur des cellules de la rétine ou des cellules non différenciées. Le SA étant une maladie multi-systémique, nos CSPih modèles représentent un outil de choix pour l'obtention des autres types cellulaires concernés par le SA. Notamment, différencier les CSPih modèles du SA en cellules ciliées de l'oreille interne, en cardiomyocytes ou en cellules rénales pourrait apporter un éclairage sur les différents symptômes du SA et comment ils s'expriment dans différents types cellulaires. Par exemple, il serait intéressant d'étudier l'effet des mutations sur les cils des cellules de l'organe de Corti, l'organe responsable de la perception auditive. Dans le modèle murin *Alms1<sup>Gt(XH152)Byg</sup>*, ces cellules présentent un stéréocil, une structure à base d'actine mal orienté et/ou mal formé ainsi qu'une mauvaise localisation du kinocil, une sorte de cil primaire (Jagger et al. 2011). De même, les tubules proximaux des reins des souris *Alms1<sup>L2131X/L2131X</sup>* présentent des cellules ayant perdu leurs cils primaires et ayant des activités prolifératives et apoptotique plus élevées (G. Li et al. 2007). Enfin, les souris *Alms1<sup>foz/foz</sup>* présentent une réduction du nombre de neurones hypothalamiques ciliés (Heydet et al. 2013). Cette liste de types cellulaires

méritant d'être étudiés à l'aide des modèles présentés dans cette thèse n'est pas exhaustive et il serait intéressant de différencier les CSPih modèles en d'autres types cellulaires concernés par le SA. La comparaison des effets des mutations sur ces différents types cellulaires permet d'ouvrir la voie à une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans les différents symptômes du SA.

## 5 CONCLUSION GENERALE

---

Cette thèse avait pour objectif principal le développement de nouveaux outils permettant une meilleure compréhension des symptômes visuels du syndrome d'Alström. Cet objectif a pu être atteint à l'aide de méthodes innovantes tel que l'édition de base par CRISPR/Cas9 et par le développement d'une technique d'isolation cellulaire. Ainsi, au cours de ma thèse j'ai pu obtenir plusieurs lignées de CSPih mutées à différentes positions au sein du gène *ALMS1*. Ces lignées ont été caractérisées et validées, notamment au niveau de leur intégrité génomique et différenciées en plusieurs types cellulaires concernés par le SA. A partir de ces cellules différenciées notamment en organoïdes neuro-rétiniens, j'ai pu établir un phénotype pathologique caractérisé par une dégénérescence des photorécepteurs. Par ailleurs, les organoïdes neuro-rétiniens m'ont permis de constater une augmentation de l'activité apoptotique chez les patients. Ce résultat marque le premier pas vers une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires responsables de la perte de photorécepteurs. En plus de renseigner sur les mécanismes sous-jacents à la perte de la vision, les lignées modèles que j'ai obtenues permettent d'envisager une stratégie de criblage de molécules pharmacologiques et pavent ainsi la voie à l'élaboration d'un traitement pour les patients atteints du SA.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- Aasen, Davis M., et M. Natalia Vergara. 2020. « New Drug Discovery Paradigms for Retinal Diseases: A Focus on Retinal Organoids ». *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 36 (1): 18-24. <https://doi.org/10.1089/jop.2018.0140>.
- Aavani, Tooka, Nobuhiko Tachibana, Valerie Wallace, Jeffrey Biernaskie, et Carol Schuurmans. 2017. « Temporal Profiling of Photoreceptor Lineage Gene Expression during Murine Retinal Development ». *Gene Expression Patterns: GEP* 23-24 (janvier):32-44. <https://doi.org/10.1016/j.gep.2017.03.001>.
- Akiyama, Noriyoshi, Ryohei Suzuki, Takahiro Saito, Yunosuke Yuchi, Hisashi Ukawa, et Yuki Matsumoto. 2023. « Presence of Known Feline ALMS1 and MYBPC3 Variants in a Diverse Cohort of Cats with Hypertrophic Cardiomyopathy in Japan ». *PLOS ONE* 18 (4): e0283433. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0283433>.
- Alberts, Bruce, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, et Peter Walter. 2002. « Extracellular Control of Cell Division, Cell Growth, and Apoptosis ». In *Molecular Biology of the Cell. 4th Edition*. Garland Science. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26877/>.
- Aldahmesh, Mohamed A., Leen Abu-Safieh, Arif O. Khan, Zuhair N. Al-Hassnan, Ranad Shaheen, Mohammed Rajab, Dorota Monies, Brian F. Meyer, et Fowzan S. Alkuraya. 2009. « Allelic Heterogeneity in Inbred Populations: The Saudi Experience With Alstrom Syndrome as an Illustrative Example ». *AMERICAN JOURNAL OF MEDICAL GENETICS PART A* 149A (4): 662-65. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.32753>.
- « Alms1<m1Btlr> Chemically induced Allele Detail MGI Mouse (MGI:5619129) ». s.d. Consulté le 29 mars 2024. <https://www.informatics.jax.org/allele/MGI:5619129>.
- Alstrom, C. H., B. Hallgren, L. B. Nilsson, et H. Asander. 1959. « Retinal Degeneration Combined with Obesity, Diabetes Mellitus and Neurogenous Deafness: A Specific Syndrome (Not Hitherto Described) Distinct from the Laurence-Moon-Bardet-Biedl Syndrome: A Clinical, Endocrinological and Genetic Examination Based on a Large Pedigree ». *Acta Psychiatrica Et Neurologica*

*Scandinavica. Supplementum* 129:1-35.

- Álvarez-Satta, María, Sheila Castro-Sánchez, et Diana Valverde. 2015. « Alström syndrome: Current perspectives ». *The Application of Clinical Genetics*, juillet. <https://doi.org/10.2147/TACG.S56612>.
- Álvarez-Satta, María, Mauro Lago-Docampo, Brais Bea-Mascato, Carlos Solarat, Sheila Castro-Sánchez, Søren T. Christensen, et Diana Valverde. 2021. « ALMS1 Regulates TGF- $\beta$  Signaling and Morphology of Primary Cilia ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9:623829. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.623829>.
- Anvarian, Zeinab, Kirk Mykytyn, Saikat Mukhopadhyay, Lotte Bang Pedersen, et Søren Tvorup Christensen. 2019. « Cellular signalling by primary cilia in development, organ function and disease ». *Nature reviews. Nephrology* 15 (4): 199-219. <https://doi.org/10.1038/s41581-019-0116-9>.
- Anzalone, Andrew V., Peyton B. Randolph, Jessie R. Davis, Alexander A. Sousa, Luke W. Koblan, Jonathan M. Levy, Peter J. Chen, et al. 2019. « Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA ». *Nature* 576 (7785): 149-57. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1711-4>.
- Arsov, Todor, Diego G. Silva, Moira K. O'Bryan, Amanda Sainsbury, Nicola J. Lee, Claire Kennedy, Shehnaaz S.M. Manji, et al. 2006. « Fat Aussie—A New Alström Syndrome Mouse Showing a Critical Role for ALMS1 in Obesity, Diabetes, and Spermatogenesis ». *Molecular Endocrinology* 20 (7): 1610-22. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0494>.
- Augustine, George J., Jennifer M. Groh, Scott A. Huettel, Anthony-Samuel LaMantia, et Leonard E. White. 1997. « Neuroscience ». *Current ophthalmology reports* 2 (3): 100. <https://doi.org/10.1007/S40135-014-0048-2>.
- Bea-Mascato, Brais, Elena Neira-Goyanes, Antía Iglesias-Rodríguez, et Diana Valverde. 2022. « Depletion of ALMS1 Affects TGF- $\beta$  Signalling Pathway and Downstream Processes Such as Cell Migration and Adhesion Capacity ». *Frontiers in Molecular Biosciences* 9 (octobre). <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.992313>.

- Bea-Mascato, Brais, et Diana Valverde. 2024. « Genotype–Phenotype Associations in Alström Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *Journal of Medical Genetics* 61 (1): 18-26. <https://doi.org/10.1136/jmg-2023-109175>.
- Ben M'Barek, Karim, Walter Habeler, Alexandra Plancheron, Mohamed Jarraya, Florian Regent, Angélique Terray, Ying Yang, et al. 2017. « Human ESC-Derived Retinal Epithelial Cell Sheets Potentiate Rescue of Photoreceptor Cell Loss in Rats with Retinal Degeneration ». *Science Translational Medicine* 9 (421): eaai7471. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aai7471>.
- Ben M'Barek, Karim, et Christelle Monville. 2019. « Cell Therapy for Retinal Dystrophies: From Cell Suspension Formulation to Complex Retinal Tissue Bioengineering ». *Stem Cells International* 2019:4568979. <https://doi.org/10.1155/2019/4568979>.
- Bernardos, Rebecca L., Linda K. Barthel, Jason R. Meyers, et Pamela A. Raymond. 2007. « Late-Stage Neuronal Progenitors in the Retina Are Radial Müller Glia That Function as Retinal Stem Cells ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27 (26): 7028-40. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1624-07.2007>.
- Blenkinsop, Timothy A., Enrique Salero, Jeffrey H. Stern, et Sally Temple. 2013. « The Culture and Maintenance of Functional Retinal Pigment Epithelial Monolayers from Adult Human Eye ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 945:45-65. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-125-7\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-125-7_4).
- Bohrer, Laura R., Nicholas E. Stone, Nathaniel K. Mullin, Andrew P. Voigt, Kristin R. Anfinson, Jessica L. Fick, Viviane Luangphakdy, et al. 2023. « Automating iPSC Generation to Enable Autologous Photoreceptor Cell Replacement Therapy ». *Journal of Translational Medicine* 21 (1): 161. <https://doi.org/10.1186/s12967-023-03966-2>.
- Bok, D. 1993. « The Retinal Pigment Epithelium: A Versatile Partner in Vision ». *Journal of Cell Science. Supplement* 17:189-95. [https://doi.org/10.1242/jcs.1993.supplement\\_17.27](https://doi.org/10.1242/jcs.1993.supplement_17.27).
- Bond, J., K. Flintoff, J. Higgins, S. Scott, C. Bennet, J. Parsons, J. Mannon, et al. 2005. « The Importance of Seeking ALMS1 Mutations in Infants with Dilated Cardiomyopathy ». *Journal of Medical*

- Genetics* 42 (2): e10. <https://doi.org/10.1136/jmg.2004.026617>.
- Bottenstein, J. E., et G. H. Sato. 1979. « Growth of a Rat Neuroblastoma Cell Line in Serum-Free Supplemented Medium ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76 (1): 514-17. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.1.514>.
- Boulton, M., et P. Dayhaw-Barker. 2001. « The Role of the Retinal Pigment Epithelium: Topographical Variation and Ageing Changes ». *Eye (London, England)* 15 (Pt 3): 384-89. <https://doi.org/10.1038/eye.2001.141>.
- Bozal, Suleyman B., Greg Sjogren, Antonio P. Costa, Joseph S. Brown, Shannon Roberts, Dylan Baker, Paul Gabriel, et al. 2024. « Development of an automated 3D high content cell screening platform for organoid phenotyping ». *SLAS Discovery*, septembre, 100182. <https://doi.org/10.1016/j.slasd.2024.100182>.
- Braune, Katarina, Ines Volkmer, et Martin S. Staeger. 2017. « Characterization of Alstrom Syndrome 1 (ALMS1) Transcript Variants in Hodgkin Lymphoma Cells ». *PLOS ONE* 12 (1): e0170694. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170694>.
- Breslow, David K., et Andrew J. Holland. 2019. « Mechanism and Regulation of Centriole and Cilium Biogenesis ». *Annual Review of Biochemistry* 88 (juin):691-724. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-111153>.
- Bringmann, Andreas, Steffen Syrbe, Katja Görner, Johannes Kacza, Mike Francke, Peter Wiedemann, et Andreas Reichenbach. 2018. « The Primate Fovea: Structure, Function and Development ». *Progress in Retinal and Eye Research* 66 (septembre):49-84. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2018.03.006>.
- Brook, F. A., et R. L. Gardner. 1997. « The Origin and Efficient Derivation of Embryonic Stem Cells in the Mouse ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (11): 5709-12. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.11.5709>.
- Brun, Agnès, Xiangxiang Yu, Cathy Obringer, Daniel Ajoy, Elodie Haser, Corinne Stoetzel, Michel J. Roux, Nadia Messaddeq, Hélène Dollfus, et Vincent Marion. 2019. « In Vivo Phenotypic and Molecular Characterization of Retinal Degeneration in Mouse Models of Three Ciliopathies ». *Experimental Eye Research* 186 (septembre):107721.

- <https://doi.org/10.1016/j.exer.2019.107721>.
- Bryan, Chase D., Macaulie A. Casey, Rebecca L. Pfeiffer, Bryan W. Jones, et Kristen M. Kwan. 2020. « Optic Cup Morphogenesis Requires Neural Crest-Mediated Basement Membrane Assembly ». *Development (Cambridge, England)* 147 (4): dev181420. <https://doi.org/10.1242/dev.181420>.
- Buchholz, David E., Britney O. Pennington, Roxanne H. Croze, Cassidy R. Hinman, Peter J. Coffey, et Dennis O. Clegg. 2013. « Rapid and Efficient Directed Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells Into Retinal Pigmented Epithelium ». *Stem Cells Translational Medicine* 2 (5): 384-93. <https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0163>.
- Buskin, Adriana, Lili Zhu, Valeria Chichagova, Basudha Basu, Sina Mozaffari-Jovin, David Dolan, Alastair Droop, et al. 2018. « Disrupted Alternative Splicing for Genes Implicated in Splicing and Ciliogenesis Causes PRPF31 Retinitis Pigmentosa ». *Nature Communications* 9 (1): 4234. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06448-y>.
- Caillaud, Amandine, Antoine Lévêque, Aurélie Thédrez, Aurore Girardeau, Robin Canac, Lise Bray, Manon Baudic, et al. 2022. « FACS-assisted CRISPR-Cas9 genome editing of human induced pluripotent stem cells ». *STAR Protocols* 3 (4): 101680. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101680>.
- Carrington, Blake, Rachel N. Weinstein, et Raman Sood. 2020. « BE4max and AncBE4max Are Efficient in Germline Conversion of C:G to T:A Base Pairs in Zebrafish ». *Cells* 9 (7): 1690. <https://doi.org/10.3390/cells9071690>.
- Casey, Jillian, Paul McGettigan, Donal Brosnahan, Emma Curtis, Eileen Treacy, Sean Ennis, et Sally Ann Lynch. 2014. « Atypical Alstrom Syndrome with Novel ALMS1 Mutations Precluded by Current Diagnostic Criteria ». *EUROPEAN JOURNAL OF MEDICAL GENETICS* 57 (2-3): 55-59. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2014.01.007>.
- Cashman, Siobhan M., Laura McCullough, et Rajendra Kumar-Singh. 2007. « Improved Retinal Transduction In Vivo and Photoreceptor-Specific Transgene Expression Using Adenovirus Vectors With Modified Penton Base ». *Molecular Therapy* 15 (9): 1640-46. <https://doi.org/10.1038/sj.mt.6300203>.

- Chen, Cuie, et Yukiko M. Yamashita. 2020. « Alstrom Syndrome Gene Is a Stem-Cell-Specific Regulator of Centriole Duplication in the *Drosophila* Testis ». *ELife* 9 (septembre):e59368. <https://doi.org/10.7554/eLife.59368>.
- Chen, Holly Y., Ryan A. Kelley, Tiansen Li, et Anand Swaroop. 2021. « Primary cilia biogenesis and associated retinal ciliopathies ». *Seminars in Cell & Developmental Biology*, Cilia and centrosomes in development, physiology and disease, 110 (février):70-88. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.07.013>.
- Chen, Jian-Hua, Tarekegn Geberhiwot, Timothy G. Barrett, Richard Paisey, et Robert K. Semple. 2017. « Refining genotype–phenotype correlation in Alström syndrome through study of primary human fibroblasts ». *Molecular Genetics & Genomic Medicine* 5 (4): 390-404. <https://doi.org/10.1002/mgg3.296>.
- Chetboul, Valerie, Amandine Petit, Vassiliki Gouni, Emilie Trehieu-Sechi, Charlotte Misbach, David Balouka, Carolina Carlos Sampedrano, Jean-Louis Pouchelon, Renaud Tissier, et Marie Abitbol. 2012. « Prospective echocardiographic and tissue Doppler screening of a large Sphynx cat population: Reference ranges, heart disease prevalence and genetic aspects ». *Journal of Veterinary Cardiology* 14 (4): 497-509. <https://doi.org/10.1016/j.jvc.2012.08.001>.
- Cho, Seung Woo, Sojung Kim, Jong Min Kim, et Jin-Soo Kim. 2013. « Targeted Genome Engineering in Human Cells with the Cas9 RNA-Guided Endonuclease ». *Nature Biotechnology* 31 (3): 230-32. <https://doi.org/10.1038/nbt.2507>.
- Choudhary, Parul, Heather Booth, Alex Gutteridge, Beata Surmacz, Irene Louca, Juliette Steer, Julie Kerby, et Paul John Whiting. 2017. « Directing Differentiation of Pluripotent Stem Cells Toward Retinal Pigment Epithelium Lineage ». *Stem Cells Translational Medicine* 6 (2): 490-501. <https://doi.org/10.5966/sctm.2016-0088>.
- Christensen, Søren T., Jesper W. Voss, Stefan C. Teilmann, et Ian H. Lambert. 2005. « High Expression of the Taurine Transporter TauT in Primary Cilia of NIH3T3 Fibroblasts ». *Cell Biology International* 29 (5): 347-51. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2005.02.003>.
- Collin, Gayle B., Navdeep Gogna, Bo Chang, Nattaya Damkham, Jai

- Pinkney, Lillian F. Hyde, Lisa Stone, Jürgen K. Naggert, Patsy M. Nishina, et Mark P. Krebs. 2020. « Mouse Models of Inherited Retinal Degeneration with Photoreceptor Cell Loss ». *Cells* 9 (4): 931. <https://doi.org/10.3390/cells9040931>.
- Collin, Gayle B., Jan D. Marshall, Akihiro Ikeda, W. Venus So, Isabelle Russell-Eggitt, Pietro Maffei, Sebastian Beck, et al. 2002. « Mutations in ALMS1 Cause Obesity, Type 2 Diabetes and Neurosensory Degeneration in Alström Syndrome ». *Nature Genetics* 31 (1): 74-78. <https://doi.org/10.1038/ng867>.
- Collin, Gayle B., Jan D. Marshall, Benjamin L. King, Gabriella Milan, Pietro Maffei, Daniel J. Jagger, et Jürgen K. Naggert. 2012. « The Alström Syndrome Protein, ALMS1, Interacts with  $\alpha$ -Actinin and Components of the Endosome Recycling Pathway ». *PLOS ONE* 7 (5): e37925. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037925>.
- Collin, G.B., E. Cyr, R. Bronson, J.D. Marshall, E.J. Gifford, W. Hicks, S.A. Murray, et al. 2005. « Alms1-disrupted mice recapitulate human Alström syndrome ». *Human Molecular Genetics* 14 (16): 2323-33. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddi235>.
- Collin, Joseph, Darin Zerti, Rachel Queen, Tiago Santos-Ferreira, Roman Bauer, Jonathan Coxhead, Rafiqul Hussain, et al. 2019. « CRX Expression in Pluripotent Stem Cell-Derived Photoreceptors Marks a Transplantable Subpopulation of Early Cones ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 37 (5): 609-22. <https://doi.org/10.1002/stem.2974>.
- Connolly, M. B., J. E. Jan, R. M. Couch, L. T. Wong, J. E. Dimmick, et J. M. Rigg. 1991. « Hepatic Dysfunction in Alström Disease ». *American Journal of Medical Genetics* 40 (4): 421-24. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1320400408>.
- Corral-Serrano, JC, PE Sladen, D Ottaviani, FO Rezek, K Jovanovic, D Athanasiou, J van der Spuy, BC Mansfield, et ME Cheetham. 2023. « Eupatilin improves cilia defects in human CEP290 ciliopathy models ». *bioRxiv*, avril, 2023.04.12.536565. <https://doi.org/10.1101/2023.04.12.536565>.
- Crouch, Rosalie K., Gerald J. Chader, Barbara Wiggert, et David R. Pepperberg. 1996. « Retinoids and the Visual Process ». *Photochemistry and Photobiology* 64 (4): 613-21. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1996.tb03114.x>.
- Crowley, Lisa C., et Nigel J. Waterhouse. 2016. « Detecting Cleaved

- Caspase-3 in Apoptotic Cells by Flow Cytometry ». *Cold Spring Harbor Protocols* 2016 (11).  
<https://doi.org/10.1101/pdb.prot087312>.
- Cruz, Lyndon da, Kate Fynes, Odysseas Georgiadis, Julie Kerby, Yvonne H. Luo, Ahmad Ahmado, Amanda Vernon, et al. 2018. « Phase 1 Clinical Study of an Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium Patch in Age-Related Macular Degeneration ». *Nature Biotechnology* 36 (4): 328-37.  
<https://doi.org/10.1038/nbt.4114>.
- Dacey, D. M., B. B. Lee, D. K. Stafford, J. Pokorny, et V. C. Smith. 1996. « Horizontal Cells of the Primate Retina: Cone Specificity without Spectral Opponency ». *Science (New York, N.Y.)* 271 (5249): 656-59. <https://doi.org/10.1126/science.271.5249.656>.
- Dassie, Francesca, Mattia Albiero, Silvia Bettini, Roberta Cappellari, Gabriella Milan, Stefano Ciciliot, Jurgen K. Naggert, et al. 2023. « Hematopoietic Stem Cells and Metabolic Deterioration in Alström Syndrome, a Rare Genetic Model of the Metabolic Syndrome ». *Endocrinology* 164 (3): bqad011.  
<https://doi.org/10.1210/endo/bqad011>.
- Deng, Wen-Li, Mei-Ling Gao, Xin-Lan Lei, Ji-Neng Lv, Huan Zhao, Kai-Wen He, Xi-Xi Xia, et al. 2018. « Gene Correction Reverses Ciliopathy and Photoreceptor Loss in iPSC-Derived Retinal Organoids from Retinitis Pigmentosa Patients ». *Stem Cell Reports* 10 (4): 1267-81.  
<https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.02.003>.
- Dilan, Tanya L., Abigail R. Moyer, Ezequiel M. Salido, Thamaraiselvi Saravanan, Saravanan Kolandaivelu, Andrew F. X. Goldberg, et Visvanathan Ramamurthy. 2019. « ARL13B, a Joubert Syndrome-Associated Protein, Is Critical for Retinogenesis and Elaboration of Mouse Photoreceptor Outer Segments ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 39 (8): 1347-64.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1761-18.2018>.
- Dilan, Tanya L., Ratnesh K. Singh, Thamaraiselvi Saravanan, Abigail Moyer, Andrew F. X. Goldberg, Peter Stoilov, et Visvanathan Ramamurthy. 2018. « Bardet-Biedl Syndrome-8 (BBS8) Protein Is Crucial for the Development of Outer Segments in Photoreceptor Neurons ». *Human Molecular Genetics* 27 (2):

- 283-94. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx399>.
- Dobell, Clifford. 1933. « ANTONY VAN LEEUWENHOEK AND HIS "LITTLE ANIMALS." » *The American Journal of the Medical Sciences* 186 (2): 287. <https://doi.org/10.1097/00000441-193308000-00024>.
- Doxsey, S. J., P. Stein, L. Evans, P. D. Calarco, et M. Kirschner. 1994. « Pericentrin, a Highly Conserved Centrosome Protein Involved in Microtubule Organization ». *Cell* 76 (4): 639-50. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90504-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90504-5).
- Eintracht, Jonathan, Elizabeth Forsythe, Helen May-Simera, et Mariya Moosajee. 2021. « Translational Readthrough of Ciliopathy Genes BBS2 and ALMS1 Restores Protein, Ciliogenesis and Function in Patient Fibroblasts ». *EBioMedicine* 70 (août):103515. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103515>.
- Evans, M. J., et M. H. Kaufman. 1981. « Establishment in Culture of Pluripotential Cells from Mouse Embryos ». *Nature* 292 (5819): 154-56. <https://doi.org/10.1038/292154a0>.
- Fadini, Gian Paolo, et Mattia Albiero. 2022. « Impaired Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Traffic and Multi-Organ Damage in Diabetes ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 40 (8): 716-23. <https://doi.org/10.1093/stmcls/sxac035>.
- Fadini, Gian Paolo, Elisa Boscaro, Saula de Kreutzenberg, Carlo Agostini, Florian Seeger, Stefanie Dimmeler, Andreas Zeiher, Antonio Tiengo, et Angelo Avogaro. 2010. « Time Course and Mechanisms of Circulating Progenitor Cell Reduction in the Natural History of Type 2 Diabetes ». *Diabetes Care* 33 (5): 1097-1102. <https://doi.org/10.2337/dc09-1999>.
- Falk, Nathalie, Marlene Lösl, Nadja Schröder, et Andreas Giebl. 2015. « Specialized Cilia in Mammalian Sensory Systems ». *Cells* 4 (3): 500-519. <https://doi.org/10.3390/cells4030500>.
- Favaretto, Francesca, Gabriella Milan, Gayle B. Collin, Jan D. Marshall, Fabio Stasi, Pietro Maffei, Roberto Vettor, et Jürgen K. Naggert. 2014. « GLUT4 Defects in Adipose Tissue Are Early Signs of Metabolic Alterations in Alms1GT/GT, a Mouse Model for Obesity and Insulin Resistance ». *PLOS ONE* 9 (10): e109540. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109540>.
- Ferent, Julien, Sandii Constable, Eduardo D. Gigante, Patricia T. Yam, Laura E. Mariani, Emilie Legué, Karel F. Liem, Tamara Caspary, et

- Frédéric Charron. 2019. « The Ciliary Protein Arl13b Functions Outside of the Primary Cilium in Shh-Mediated Axon Guidance ». *Cell reports* 29 (11): 3356-3366.e3. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.11.015>.
- Ferguson, Lee R., Sankarathi Balaiya, Bharani K. Mynampati, Kumar Sambhav, et Kakarla V. Chalam. 2015. « Deprivation of BFGF Promotes Spontaneous Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Retinal Pigment Epithelial Cells ». *Journal of Stem Cells* 10 (3): 159-70.
- Frank, Elie, Michel Cailleret, Constantin Nelep, Pascal Fragner, Jérôme Polentes, Elise Herardot, Lina El Kassar, Karine Giraud-Triboult, Christelle Monville, et Karim Ben M'Barek. 2023. « Semi-Automated Optimized Method to Isolate CRISPR/Cas9 Edited Human Pluripotent Stem Cell Clones ». *Stem Cell Research & Therapy* 14 (1): 110. <https://doi.org/10.1186/s13287-023-03327-2>.
- Friede, Tim, Christian Röver, Simon Wandel, et Beat Neuenschwander. 2017. « Meta-analysis of few small studies in orphan diseases ». *Research Synthesis Methods* 8 (1): 79-91. <https://doi.org/10.1002/jrsm.1217>.
- Fuhrmann, Sabine. 2008. « Wnt signaling in eye organogenesis ». *Organogenesis* 4 (2): 60-67. <https://doi.org/10.4161/org.4.2.5850>.
- Furukawa, T., E. M. Morrow, et C. L. Cepko. 1997. « Crx, a Novel Otx-like Homeobox Gene, Shows Photoreceptor-Specific Expression and Regulates Photoreceptor Differentiation ». *Cell* 91 (4): 531-41.
- Gage, Philip J., William Rhoades, Sandra K. Prucka, et Tord Hjalt. 2005. « Fate Maps of Neural Crest and Mesoderm in the Mammalian Eye ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 46 (11): 4200-4208. <https://doi.org/10.1167/iovs.05-0691>.
- Gagliardi, Giuliana, Karim Ben M'Barek, Antoine Chaffiol, Amélie Slembrouck-Brec, Jean-Baptiste Conart, Céline Nanteau, Oriane Rabesandratana, et al. 2018. « Characterization and Transplantation of CD73-Positive Photoreceptors Isolated from Human iPSC-Derived Retinal Organoids ». *Stem Cell Reports* 11 (3): 665-80. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.07.005>.
- Garcia, Hugo, Alice S. Serafin, Flora Silbermann, Esther Porée,

- Amandine Viau, Clémentine Mahaut, Katy Billot, et al. 2022. « Agonists of prostaglandin E2 receptors as potential first in class treatment for nephronophthisis and related ciliopathies ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 119 (18): e2115960119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2115960119>.
- Garcia-Gonzalo, Francesc R., et Jeremy F. Reiter. 2017. « Open Sesame: How Transition Fibers and the Transition Zone Control Ciliary Composition ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 9 (2): a028134. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028134>.
- Geberhiwot, Tarekegn, Shanat Baig, Cathy Obringer, Dorothee Girard, Charlotte Dawson, Konstantinos Manolopoulos, Nadia Messaddeq, et al. 2021. « Relative Adipose Tissue Failure in Alström Syndrome Drives Obesity-Induced Insulin Resistance ». *Diabetes* 70 (2): 364-76. <https://doi.org/10.2337/db20-0647>.
- Gheller, Flavia, Samanta Gallo, Patrizia Trevisi, Ezio Caserta, Francesca Dassie, Pietro Maffei, et Roberto Bovo. 2020. « Cochlear Implants in Alström Syndrome ». *The Annals of Otolaryngology, Rhinology, and Laryngology* 129 (8): 833-37. <https://doi.org/10.1177/0003489420903061>.
- Gilula, Norton B., et Peter Satir. 1972. « THE CILIARY NECKLACE: A Ciliary Membrane Specialization ». *Journal of Cell Biology* 53 (2): 494-509. <https://doi.org/10.1083/jcb.53.2.494>.
- Goerler, Heidi, Gregor Warnecke, Michael Winterhalter, Carsten Müller, Manfred Ballmann, Armin Wessel, Axel Haverich, Martin Strüber, et Andre Simon. 2007. « Heart-Lung Transplantation in a 14-year-old Boy With Alström Syndrome ». *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 26 (11): 1217-18. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2007.08.007>.
- Gozlan, Sandy, Vivien Batoumeni, Tara Fournier, Céline Nanteau, Anais Potey, Marilou Cléménçon, Gaël Orioux, et al. 2023. « Bankable Human iPSC-Derived Retinal Progenitors Represent a Valuable Source of Multipotent Cells ». *Communications Biology* 6 (1): 1-12. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-04956-2>.
- Graser, Susanne, York-Dieter Stierhof, Sébastien B. Lavoie, Oliver S. Gassner, Stefan Lamla, Mikael Le Clech, et Erich A. Nigg. 2007. « Cep164, a novel centriole appendage protein required for primary cilium formation ». *Journal of Cell Biology* 179 (2): 321-30. <https://doi.org/10.1083/jcb.200707181>.

- Grisanti, Laura, Ekaterina Revenkova, Ronald E. Gordon, et Carlo Iomini. 2016. « Primary Cilia Maintain Corneal Epithelial Homeostasis by Regulation of the Notch Signaling Pathway ». *Development (Cambridge, England)* 143 (12): 2160-71. <https://doi.org/10.1242/dev.132704>.
- Hall, Michael O., Martin S. Obin, Mary J. Heeb, Barry L. Burgess, et Toshka A. Abrams. 2005. « Both protein S and Gas6 stimulate outer segment phagocytosis by cultured rat retinal pigment epithelial cells ». *Experimental Eye Research* 81 (5): 581-91. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2005.03.017>.
- Hallam, Dean, Gerrit Hilgen, Birthe Dorgau, Lili Zhu, Min Yu, Sanja Bojic, Philip Hewitt, et al. 2018. « Human-Induced Pluripotent Stem Cells Generate Light Responsive Retinal Organoids with Variable and Nutrient-Dependent Efficiency ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 36 (10): 1535-51. <https://doi.org/10.1002/stem.2883>.
- Harrison, Peter W, M Ridwan Amode, Olanrewaju Austine-Orimoloye, Andrey G Azov, Matthieu Barba, If Barnes, Arne Becker, et al. 2024. « Ensembl 2024 ». *Nucleic Acids Research* 52 (D1): D891-99. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad1049>.
- Hayashi, T., J. F. Wojtaszewski, et L. J. Goodyear. 1997. « Exercise Regulation of Glucose Transport in Skeletal Muscle ». *The American Journal of Physiology* 273 (6): E1039-1051. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1997.273.6.E1039>.
- He, Shenghui, Daisuke Nakada, et Sean J. Morrison. 2009. « Mechanisms of Stem Cell Self-Renewal ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 25:377-406. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113248>.
- Hearn, Tom. 2019. « ALMS1 and Alström Syndrome: A Recessive Form of Metabolic, Neurosensory and Cardiac Deficits ». *Journal of Molecular Medicine* 97 (1): 1-17. <https://doi.org/10.1007/s00109-018-1714-x>.
- Hearn, Tom, Glenn L. Renforth, Cosma Spalluto, Neil A. Hanley, Karen Piper, Sarah Brickwood, Chris White, et al. 2002. « Mutation of ALMS1, a Large Gene with a Tandem Repeat Encoding 47 Amino Acids, Causes Alström Syndrome ». *Nature Genetics* 31 (1): 79-83. <https://doi.org/10.1038/ng874>.
- Hearn, Tom, Cosma Spalluto, Victoria J. Phillips, Glenn L. Renforth,

- Nane Copin, Neil A. Hanley, et David I. Wilson. 2005. « Subcellular Localization of ALMS1 Supports Involvement of Centrosome and Basal Body Dysfunction in the Pathogenesis of Obesity, Insulin Resistance, and Type 2 Diabetes ». *Diabetes* 54 (5): 1581-87. <https://doi.org/10.2337/diabetes.54.5.1581>.
- Heydet, Déborah, Lesley X. Chen, Claire Z. Larter, Chrystal Inglis, Michael A. Silverman, Geoffrey C. Farrell, et Michel R. Leroux. 2013. « A Truncating Mutation of Alms1 Reduces the Number of Hypothalamic Neuronal Cilia in Obese Mice ». *Developmental Neurobiology* 73 (1): 1-13. <https://doi.org/10.1002/dneu.22031>.
- Hildebrandt, Friedhelm, Thomas Benzing, et Nicholas Katsanis. 2011. « Ciliopathies ». *The New England Journal of Medicine* 364 (16): 1533-43. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1010172>.
- Hou, Yanan, Zhimao Wu, et Qing Wei. 2023. « Alström Syndrome Protein Alms1 Is Required for Maintaining Meiotic Centriole Engagement in Spermatocytes of Drosophila ». bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2023.09.12.557481>.
- Howe, Kerstin, Matthew D. Clark, Carlos F. Torroja, James Torrance, Camille Berthelot, Matthieu Muffato, John E. Collins, et al. 2013. « The Zebrafish Reference Genome Sequence and Its Relationship to the Human Genome ». *Nature* 496 (7446): 498-503. <https://doi.org/10.1038/nature12111>.
- Hryhorowicz, Magdalena, Daniel Lipiński, et Joanna Zeyland. 2023. « Evolution of CRISPR/Cas Systems for Precise Genome Editing ». *International Journal of Molecular Sciences* 24 (18): 14233. <https://doi.org/10.3390/ijms241814233>.
- Huang-Doran, I., et R. K. Semple. 2010. « Knockdown of the Alström Syndrome-Associated Gene Alms1 in 3T3-L1 Preadipocytes Impairs Adipogenesis but Has No Effect on Cell-Autonomous Insulin Action ». *International Journal of Obesity* 34 (10): 1554-58. <https://doi.org/10.1038/ijo.2010.92>.
- « Human eye | Definition, Anatomy, Diagram, Function, & Facts | Britannica ». s. d. <https://www.britannica.com/science/human-eye>.
- Husson, Hervé, Nikolay O Bukanov, Sarah Moreno, Mandy M Smith, Brenda Richards, Cheng Zhu, Tyler Picariello, et al. 2020. « Correction of cilia structure and function alleviates multi-organ pathology in Bardet–Biedl syndrome mice ». *Human*

- Molecular Genetics* 29 (15): 2508-22.  
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddaa138>.
- Hwang, Woong Y., Yanfang Fu, Deepak Reyon, Morgan L. Maeder, Shengdar Q. Tsai, Jeffry D. Sander, Randall T. Peterson, J.-R. Joanna Yeh, et J. Keith Joung. 2013. « Efficient Genome Editing in Zebrafish Using a CRISPR-Cas System ». *Nature Biotechnology* 31 (3): 227-29. <https://doi.org/10.1038/nbt.2501>.
- Insinna, Christine, et Joseph C. Besharse. 2008. « Intraflagellar Transport and the Sensory Outer Segment of Vertebrate Photoreceptors ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 237 (8): 1982-92. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21554>.
- Irion, Uwe, Jana Krauss, et Christiane Nüsslein-Volhard. 2014. « Precise and Efficient Genome Editing in Zebrafish Using the CRISPR/Cas9 System ». *Development (Cambridge, England)* 141 (24): 4827-30. <https://doi.org/10.1242/dev.115584>.
- Ishikawa, Hiroaki, et Wallace F. Marshall. 2011. « Ciliogenesis: Building the Cell's Antenna ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12 (4): 222-34. <https://doi.org/10.1038/nrm3085>.
- Jagger, Daniel, Gayle Collin, John Kelly, Emily Towers, Graham Nevill, Chantal Longo-Guess, Jennifer Benson, et al. 2011. « Alström Syndrome Protein ALMS1 Localizes to Basal Bodies of Cochlear Hair Cells and Regulates Cilium-Dependent Planar Cell Polarity ». *Human Molecular Genetics* 20 (3): 466-81. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq493>.
- Jaykumar, Ankita Bachhawat, Paulo S. Caceres, Keyona N. King-Medina, Tang-Dong Liao, Indrani Datta, Dipak Maskey, Jürgen K. Naggert, Mariela Mendez, William H. Beierwaltes, et Pablo A. Ortiz. 2018. « Role of Alström Syndrome 1 in the Regulation of Blood Pressure and Renal Function ». *JCI Insight* 3 (21). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.95076>.
- Jensen, Victor L, Chunmei Li, Rachel V Bowie, Lara Clarke, Swetha Mohan, Oliver E Blacque, et Michel R Leroux. 2015. « Formation of the transition zone by Mks5/Rpgrip1L establishes a ciliary zone of exclusion (CIZE) that compartmentalises ciliary signalling proteins and controls PIP2 ciliary abundance ». *The EMBO Journal* 34 (20): 2537-56. <https://doi.org/10.15252/embj.201488044>.

- Ji, Xiaoli, Qingyuan Tang, Chuanqing Tang, Ziyang Wu, Ling Ma, Xiaohong Guo, Guoqiang Cheng, et al. 2020. « Generation of an induced pluripotent stem cell line from an Alström Syndrome patient with *ALMS1* mutation (c.3902C > A, c.6436C > T) and a gene correction isogenic iPSC line ». *Stem Cell Research* 49 (décembre):102089. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2020.102089>.
- Jinek, Martin, Alexandra East, Aaron Cheng, Steven Lin, Enbo Ma, et Jennifer Doudna. 2013. « RNA-Programmed Genome Editing in Human Cells ». *ELife* 2 (janvier):e00471. <https://doi.org/10.7554/eLife.00471>.
- Joy, Tisha, Henian Cao, Graeme Black, Rayaz Malik, Valentine Charlton-Menys, Robert A. Hegele, et Paul N. Durrington. 2007. « Alstrom Syndrome (OMIM 203800): A Case Report and Literature Review ». *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2 (1): 49. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-2-49>.
- Kanda, Genki N, Taku Tsuzuki, Motoki Terada, Noriko Sakai, Naohiro Motozawa, Tomohiro Masuda, Mitsuhiro Nishida, et al. 2022. « Robotic search for optimal cell culture in regenerative medicine ». Édité par Simón Méndez-Ferrer, Mone Zaidi, Simón Méndez-Ferrer, Sujith Sebastian, et Christelle Monville. *eLife* 11 (juin):e77007. <https://doi.org/10.7554/eLife.77007>.
- Kaneko, Akimichi. 1987. « The Functional Role of Retinal Horizontal Cells ». *The Japanese Journal of Physiology* 37 (3): 341-58. <https://doi.org/10.2170/jjphysiol.37.341>.
- Kang, Sona. 2021. « Adipose Tissue Malfunction Drives Metabolic Dysfunction in Alström Syndrome ». *Diabetes* 70 (2): 323-25. <https://doi.org/10.2337/dbi20-0041>.
- Kay, Paul, Yit C Yang, et Luminita Paraoan. 2013. « Directional protein secretion by the retinal pigment epithelium: roles in retinal health and the development of age-related macular degeneration ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 17 (7): 833-43. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12070>.
- Keeling, Eloise, Andrew J. Lotery, David A. Tumbarello, et J. Arjuna Ratnayaka. 2018. « Impaired Cargo Clearance in the Retinal Pigment Epithelium (RPE) Underlies Irreversible Blinding Diseases ». *Cells* 7 (2): 16. <https://doi.org/10.3390/cells7020016>.
- Kegeles, Evgenii, Tatiana Perepelkina, et Petr Baranov. 2020. « Semi-Automated Approach for Retinal Tissue Differentiation ».

- Translational Vision Science & Technology* 9 (10): 24. <https://doi.org/10.1167/tvst.9.10.24>.
- Kevany, Brian M., et Krzysztof Palczewski. 2010. « Phagocytosis of Retinal Rod and Cone Photoreceptors ». *Physiology (Bethesda, Md.)* 25 (1): 8-15. <https://doi.org/10.1152/physiol.00038.2009>.
- Khoo, Eric Y. H., James Risley, Abed M. Zaitoun, Mohamed El-Sheikh, Richard B. Paisey, Austin G. Acheson, et Peter Mansell. 2009. « Alström Syndrome and Cecal Volvulus in 2 Siblings ». *The American Journal of the Medical Sciences* 337 (5): 383-85. <https://doi.org/10.1097/MAJ.0b013e3181926594>.
- Kieckhöfer, Emilia, Gisela G. Slaats, Lena K. Ebert, Marie-Christine Albert, Claudia Dafinger, Hamid Kashkar, Thomas Benzing, et Bernhard Schermer. 2022. « Primary Cilia Suppress Ripk3-Mediated Necroptosis ». *Cell Death Discovery* 8 (1): 477. <https://doi.org/10.1038/s41420-022-01272-2>.
- Kim, Kyeongmi, Seongju Lee, Jaerak Chang, et Kunsoo Rhee. 2008. « A Novel Function of CEP135 as a Platform Protein of C-NAP1 for Its Centriolar Localization ». *Experimental Cell Research* 314 (20): 3692-3700. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.09.016>.
- Kim, Ungsoo Samuel, Omar A. Mahroo, John D. Mollon, et Patrick Yu-Wai-Man. 2021. « Retinal Ganglion Cells—Diversity of Cell Types and Clinical Relevance ». *Frontiers in Neurology* 12. <https://www.frontiersin.org/journals/neurology/articles/10.3389/fneur.2021.661938>.
- Kim, Yong Joon, Sungsoo Kim, Yooju Jung, Eunji Jung, Ho Jeong Kwon, et Joon Kim. 2018. « Eupatilin Rescues Ciliary Transition Zone Defects to Ameliorate Ciliopathy-Related Phenotypes ». *The Journal of Clinical Investigation* 128 (8): 3642-48. <https://doi.org/10.1172/JCI99232>.
- Kluesner, Mitchell G., Derek A. Nedveck, Walker S. Lahr, John R. Garbe, Juan E. Abrahante, Beau R. Webber, et Branden S. Moriarity. 2018. « EditR: A Method to Quantify Base Editing from Sanger Sequencing ». *The CRISPR Journal* 1 (3): 239-50. <https://doi.org/10.1089/crispr.2018.0014>.
- Knorz, Victoria J., Cosma Spalluto, Mark Lessard, Tracey L. Purvis, Fiona F. Adigun, Gayle B. Collin, Neil A. Hanley, David I. Wilson, et Thomas Hearn. 2010. « Centriolar Association of ALMS1 and Likely Centrosomal Functions of the ALMS Motif-Containing

- Proteins C10orf90 and KIAA1731 ». *Molecular Biology of the Cell* 21 (21): 3617-29. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-03-0246>.
- Kobayashi, Tetsuo, et Brian D. Dynlacht. 2011. « Regulating the transition from centriole to basal body ». *The Journal of Cell Biology* 193 (3): 435-44. <https://doi.org/10.1083/jcb.201101005>.
- Kobayashi, Tetsuo, Kosuke Nakazono, Mio Tokuda, Yu Mashima, Brian David Dynlacht, et Hiroshi Itoh. 2017. « HDAC2 Promotes Loss of Primary Cilia in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma ». *EMBO Reports* 18 (2): 334-43. <https://doi.org/10.15252/embr.201541922>.
- Kocova, M., E. Sukarova-Angelovska, R. Kacarska, P. Maffei, G. Milan, et J. D. Marshall. 2011. « The Unique Combination of Dermatological and Ocular Phenotypes in Alström Syndrome: Severe Presentation, Early Onset and Two Novel ALMS1 Mutations ». *The British Journal of Dermatology* 164 (4): 878-80. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2010.10157.x>.
- Komor, Alexis C., Yongjoo B. Kim, Michael S. Packer, John A. Zuris, et David R. Liu. 2016. « Programmable Editing of a Target Base in Genomic DNA without Double-Stranded DNA Cleavage ». *Nature* 533 (7603): 420-24. <https://doi.org/10.1038/nature17946>.
- Komor, Alexis C., Kevin T. Zhao, Michael S. Packer, Nicole M. Gaudelli, Amanda L. Waterbury, Luke W. Koblan, Y. Bill Kim, Ahmed H. Badran, et David R. Liu. 2017. « Improved Base Excision Repair Inhibition and Bacteriophage Mu Gam Protein Yields C:G-to-T:A Base Editors with Higher Efficiency and Product Purity ». *Science Advances* 3 (8): eaao4774. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aao4774>.
- Kozminski, K. G., K. A. Johnson, P. Forscher, et J. L. Rosenbaum. 1993. « A Motility in the Eukaryotic Flagellum Unrelated to Flagellar Beating ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (12): 5519-23. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.12.5519>.
- Krebs, Mark P., Gayle B. Collin, Wanda L. Hicks, Minzhong Yu, Jeremy R. Charette, Lan Ying Shi, Jieping Wang, Jürgen K. Naggert, Neal S. Peachey, et Patsy M. Nishina. 2017. « Mouse Models of Human Ocular Disease for Translational Research ». *PLOS ONE* 12 (8): e0183837.

- <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183837>.
- Kruczek, Kamil, Zepeng Qu, James Gentry, Benjamin R. Fadl, Linn Gieser, Suja Hiriyanna, Zachary Batz, et al. 2021. « Gene Therapy of Dominant CRX-Leber Congenital Amaurosis Using Patient Stem Cell-Derived Retinal Organoids ». *Stem Cell Reports* 16 (2): 252-63. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.12.018>.
- Kruczek, Kamil, Zepeng Qu, Emily Welby, Hiroko Shimada, Suja Hiriyanna, Milton A. English, Wadih M. Zein, Brian P. Brooks, et Anand Swaroop. 2022. « In Vitro Modeling and Rescue of Ciliopathy Associated with IQCB1/NPHP5 Mutations Using Patient-Derived Cells ». *Stem Cell Reports* 17 (10): 2172-86. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2022.08.006>.
- Kuhara, Atsushi, Masatoshi Okumura, Tsubasa Kimata, Yoshinori Tanizawa, Ryo Takano, Koutarou D. Kimura, Hitoshi Inada, Kunihiro Matsumoto, et Ikue Mori. 2008. « Temperature Sensing by an Olfactory Neuron in a Circuit Controlling Behavior of *C. elegans* ». *Science* 320 (5877): 803-7. <https://doi.org/10.1126/science.1148922>.
- Kwon, Whijin, et Spencer A. Freeman. 2020. « Phagocytosis by the Retinal Pigment Epithelium: Recognition, Resolution, Recycling ». *Frontiers in Immunology* 11:604205. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.604205>.
- La Morgia, Chiara, Fred N. Ross-Cisneros, Alfredo A. Sadun, et Valerio Carelli. 2017. « Retinal Ganglion Cells and Circadian Rhythms in Alzheimer's Disease, Parkinson's Disease, and Beyond ». *Frontiers in Neurology* 8 (mai):162. <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00162>.
- Lachke, Salil A., et Richard L. Maas. 2010. « Building the Developmental Oculome: Systems Biology in Vertebrate Eye Development and Disease ». *Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine* 2 (3): 305-23. <https://doi.org/10.1002/wsbm.59>.
- Lakowski, Jorn, Anai Gonzalez-Cordero, Emma L. West, Ya-Ting Han, Emily Welby, Arifa Naeem, Samuel J. I. Blackford, et al. 2015. « Transplantation of Photoreceptor Precursors Isolated via a Cell Surface Biomarker Panel from Embryonic Stem Cell-Derived Self-Forming Retina ». *STEM CELLS* 33 (8): 2469-82. <https://doi.org/10.1002/stem.2051>.
- Lamba, Deepak A., Mike O. Karl, Carol B. Ware, et Thomas A. Reh. 2006.

- « Efficient generation of retinal progenitor cells from human embryonic stem cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (34): 12769-74. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601990103>.
- Lancaster, Madeline A., Magdalena Renner, Carol-Anne Martin, Daniel Wenzel, Louise S. Bicknell, Matthew E. Hurler, Tessa Homfray, Josef M. Penninger, Andrew P. Jackson, et Juergen A. Knoblich. 2013. « Cerebral Organoids Model Human Brain Development and Microcephaly ». *Nature* 501 (7467): 373-79. <https://doi.org/10.1038/nature12517>.
- Larkins, Christine E., Gladys D. Gonzalez Aviles, Michael P. East, Richard A. Kahn, et Tamara Caspary. 2011. « Arl13b regulates ciliogenesis and the dynamic localization of Shh signaling proteins ». *Molecular Biology of the Cell* 22 (23): 4694-4703. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-12-0994>.
- Leach, Lyndsay L., Roxanne H. Croze, Qirui Hu, Vignesh P. Nadar, Tracy N. Clevenger, Britney O. Pennington, David M. Gamm, et Dennis O. Clegg. 2016. « Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigmented Epithelium: A Comparative Study Between Cell Lines and Differentiation Methods ». *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 32 (5): 317-30. <https://doi.org/10.1089/jop.2016.0022>.
- Lee, Jong Geol, Young Hoon Sung, et In-Jeoung Baek. 2018. « Generation of Genetically-Engineered Animals Using Engineered Endonucleases ». *Archives of Pharmacal Research* 41 (9): 885-97. <https://doi.org/10.1007/s12272-018-1037-z>.
- Leitch, Carmen C., Sukanya Lodh, Victoria Prieto-Echagüe, Jose L. Badano, et Norann A. Zaghoul. 2014. « Basal body proteins regulate Notch signaling through endosomal trafficking ». *Journal of Cell Science* 127 (11): 2407-19. <https://doi.org/10.1242/jcs.130344>.
- Leong, Yeh Chwan, Valentina Di Foggia, Hema Pramod, Maria Bitner-Glindzicz, Aara Patel, et Jane C. Sowden. 2022. « Molecular Pathology of Usher 1B Patient-Derived Retinal Organoids at Single Cell Resolution ». *Stem Cell Reports* 17 (11): 2421-37. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2022.09.006>.
- Leroy, Bart P., David G. Birch, Jacque L. Duncan, Byron L. Lam, Robert K. Koenekoop, Fernanda B. O. Porto, Stephen R. Russell, et Aniz

- Girach. 2021. « Leber Congenital Amaurosis Due to CEP290 mutations—Severe Vision Impairment with a High Unmet Medical Need: A Review ». *Retina (Philadelphia, Pa.)* 41 (5): 898-907. <https://doi.org/10.1097/IAE.00000000000003133>.
- Li, Guochun, Raquel Vega, Keats Nelms, Nicholas Gekakis, Christopher Goodnow, Peter McNamara, Hua Wu, Nancy A. Hong, et Richard Glynn. 2007. « A Role for Alström Syndrome Protein, *Alms1*, in Kidney Ciliogenesis and Cellular Quiescence ». *PLOS Genetics* 3 (1): e8. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030008>.
- Li, Linfeng, Qiong Zhou, Ty C. Voss, Kevin L. Quick, et Daniel V. LaBarbera. 2016. « High-Throughput Imaging: Focusing in on Drug Discovery in 3D ». *Methods (San Diego, Calif.)* 96 (mars):97-102. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.11.013>.
- Li, Siwei, Jingjing An, Yaqiu Li, Xiagu Zhu, Dongdong Zhao, Lixian Wang, Yonghui Sun, et al. 2022. « Automated High-Throughput Genome Editing Platform with an AI Learning in Situ Prediction Model ». *Nature Communications* 13 (1): 7386. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35056-0>.
- Liu, Qin, Qi Zhang, et Eric Pierce. 2010. « Photoreceptor Sensory Cilia and Inherited Retinal Degeneration ». *Advances in experimental medicine and biology* 664:223-32. [https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1399-9\\_26](https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1399-9_26).
- Louw, Jacoba J., Anniek Corveleyn, Yaojuan Jia, Sajid Iqbal, Derize Boshoff, Marc Gewillig, Hilde Peeters, Philippe Moerman, et Koenraad Devriendt. 2014. « Homozygous loss-of-function mutation in *ALMS1* causes the lethal disorder mitogenic cardiomyopathy in two siblings ». *European Journal of Medical Genetics* 57 (9): 532-35. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2014.06.004>.
- Lu, Quanlong, Christine Insinna, Carolyn Ott, Jimmy Stauffer, Petra A. Pintado, Juliati Rahajeng, Ulrich Baxa, et al. 2015. « Early Steps in Primary Cilium Assembly Require EHD1/EHD3-Dependent Ciliary Vesicle Formation ». *Nature Cell Biology* 17 (3): 228-40. <https://doi.org/10.1038/ncb3109>.
- Lukovic, Dunja, Ana Artero Castro, Ana Belen Garcia Delgado, María de los Angeles Martín Bernal, Noelia Luna Pelaez, Andrea Díez Lloret, Rocío Perez Espejo, et al. 2015. « Human iPSC Derived

- Disease Model of MERTK-Associated Retinitis Pigmentosa ». *Scientific Reports* 5 (1): 12910. <https://doi.org/10.1038/srep12910>.
- Luo, Na, Callah C. West, Carlos A. Murga-Zamalloa, Lou Sun, Ryan M. Anderson, Clark D. Wells, Robert N. Weinreb, Jeffrey B. Travers, Hemant Khanna, et Yang Sun. 2012. « OCRL Localizes to the Primary Cilium: A New Role for Cilia in Lowe Syndrome ». *Human Molecular Genetics* 21 (15): 3333-44. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds163>.
- Ma, Shi-chao, Yi-lin Xie, Qian Wang, Shan-gui Fu, et Hong-ze Wu. 2024. « Application of eye organoids in the study of eye diseases ». *Experimental Eye Research* 247 (octobre):110068. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2024.110068>.
- Ma, Yuanwu, Lianfeng Zhang, et Xingxu Huang. 2014. « Genome Modification by CRISPR/Cas9 ». *The FEBS Journal* 281 (23): 5186-93. <https://doi.org/10.1111/febs.13110>.
- Makaryus, Amgad N., Michael E. Zubrow, Jan D. Marshall, Linda D. Gillam, et Judy R. Mangion. 2007. « Cardiac Manifestations of Alström Syndrome: Echocardiographic Findings ». *Journal of the American Society of Echocardiography: Official Publication of the American Society of Echocardiography* 20 (12): 1359-63. <https://doi.org/10.1016/j.echo.2007.04.033>.
- Malm, Eva, Vesna Ponjavic, Patsy M. Nishina, Jürgen K. Naggert, Elizabeth G. Hinman, Sten Andréasson, Jan D. Marshall, et Claes Möller. 2008. « Full-Field Electroretinography and Marked Variability in Clinical Phenotype of Alström Syndrome ». *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill.: 1960)* 126 (1): 51-57. <https://doi.org/10.1001/archophthalmol.2007.28>.
- Marmorstein, Alan D. 2001. « The Polarity of the Retinal Pigment Epithelium ». *Traffic* 2 (12): 867-72. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2001.21202.x>.
- Marozio, Luca, Francesca Dassie, Gianluca Bertschy, Emilie M. Canuto, Gabriella Milan, Stefano Cosma, Pietro Maffei, et Chiara Benedetto. 2022. « Case Report: Pregnancy and birth in a mild phenotype of Alström syndrome ». *Frontiers in Genetics* 13 (octobre):995947. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.995947>.
- Marshall, Jan D., Sebastian Beck, Pietro Maffei, et Jürgen K. Naggert. 2007. « Alström Syndrome ». *European Journal of Human*

- Genetics* 15 (12): 1193-1202.  
<https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201933>.
- Marshall, Jan D., Roderick T. Bronson, Gayle B. Collin, Anne D. Nordstrom, Pietro Maffei, Richard B. Paisey, Catherine Carey, et al. 2005. « New Alström Syndrome Phenotypes Based on the Evaluation of 182 Cases ». *Archives of Internal Medicine* 165 (6): 675-83. <https://doi.org/10.1001/archinte.165.6.675>.
- Marshall, Jan D., Elizabeth G. Hinman, Gayle B. Collin, Sebastian Beck, Rita Cerqueira, Pietro Maffei, Gabriella Milan, et al. 2007. « Spectrum of ALMS1 variants and evaluation of genotype-phenotype correlations in Alström syndrome ». *Human Mutation* 28 (11): 1114-23. <https://doi.org/10.1002/humu.20577>.
- Marshall, Jan D., Pietro Maffei, Gayle B. Collin, et Jürgen K. Naggert. 2011. « Alstrom Syndrome: Genetics and Clinical Overview ». *Current Genomics* 12 (3): 225-35. <https://doi.org/10.2174/138920211795677912>.
- Marshall, Jan D., Pietro Maffei, Sebastian Beck, Timothy G. Barrett, Richard Paisey, et Jürgen K. Naggert. 2013. « Clinical Utility Gene Card for: Alström Syndrome - Update 2013 ». *European Journal of Human Genetics: EJHG* 21 (11). <https://doi.org/10.1038/ejhg.2013.61>.
- Marshall, Jan D., Jean Muller, Gayle B. Collin, Gabriella Milan, Stephen F. Kingsmore, Darrell Dinwiddie, Emily G. Farrow, et al. 2015. « Alström Syndrome: Mutation Spectrum of ALMS1 ». *Human Mutation* 36 (7): 660-68. <https://doi.org/10.1002/humu.22796>.
- Martin, G. R. 1981. « Isolation of a Pluripotent Cell Line from Early Mouse Embryos Cultured in Medium Conditioned by Teratocarcinoma Stem Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (12): 7634-38. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.12.7634>.
- Matsumoto, Erino, Naoshi Koide, Hiroko Hanzawa, Masaharu Kiyama, Mari Ohta, Junichi Kuwabara, Shizu Takeda, et Masayo Takahashi. 2019. « Fabricating Retinal Pigment Epithelial Cell Sheets Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells in an Automated Closed Culture System for Regenerative Medicine ». *PLOS ONE* 14 (3): e0212369. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212369>.

- Maurya, Meenakshi, Kiran Bora, Alexandra K. Blomfield, Madeline C. Pavlovich, Shuo Huang, Chi-Hsiu Liu, et Jing Chen. 2023. « Oxidative stress in retinal pigment epithelium degeneration: from pathogenesis to therapeutic targets in dry age-related macular degeneration ». *Neural Regeneration Research* 18 (10): 2173-81. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.369098>.
- May-Simera, Helen Louise, Qin Wan, Balendu Shekhar Jha, Juliet Hartford, Vladimir Khristov, Roba Dejene, Justin Chang, et al. 2018. « Primary Cilium-Mediated Retinal Pigment Epithelium Maturation Is Disrupted in Ciliopathy Patient Cells ». *Cell reports* 22 (1): 189-205. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.12.038>.
- May-Simera, Helen, Kerstin Nagel-Wolfrum, et Uwe Wolfrum. 2017. « Cilia - The Sensory Antennae in the Eye ». *Progress in Retinal and Eye Research* 60 (septembre):144-80. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2017.05.001>.
- Metzger, Daniel, et Pierre Chambon. 2001. « Site- and Time-Specific Gene Targeting in the Mouse ». *Methods* 24 (1): 71-80. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1159>.
- Meurs, Kathryn M., Brian G. Williams, Dylan DeProspero, Steven G. Friedenberg, David E. Malarkey, J. Ashley Ezzell, Bruce W. Keene, Darcy B. Adin, Teresa C. DeFrancesco, et Sandra Tou. 2021. « A Deleterious Mutation in the ALMS1 Gene in a Naturally Occurring Model of Hypertrophic Cardiomyopathy in the Sphynx Cat ». *Orphanet Journal of Rare Diseases* 16 (1): 108. <https://doi.org/10.1186/s13023-021-01740-5>.
- Meyer, Jason S., Sara E. Howden, Kyle A. Wallace, Amelia D. Verhoeven, Lynda S. Wright, Elizabeth E. Capowski, Isabel Pinilla, et al. 2011. « Optic Vesicle-like Structures Derived from Human Pluripotent Stem Cells Facilitate a Customized Approach to Retinal Disease Treatment ». *Stem Cells* 29 (8): 1206-18. <https://doi.org/10.1002/stem.674>.
- Meyer, Jason S., Rebecca L. Shearer, Elizabeth E. Capowski, Lynda S. Wright, Kyle A. Wallace, Erin L. McMillan, Su-Chun Zhang, et David M. Gamm. 2009. « Modeling early retinal development with human embryonic and induced pluripotent stem cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (39): 16698-703. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905245106>.
- Minton, J. A. L., K. R. Owen, C. J. Ricketts, N. Crabtree, G. Shaikh, S.

- Ehtisham, J. R. Porter, et al. 2006. « Syndromic Obesity and Diabetes: Changes in Body Composition with Age and Mutation Analysis of ALMS1 in 12 United Kingdom Kindreds with Alström Syndrome ». *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 91 (8): 3110-16. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-2633>.
- Molday, Robert S., et Orson L. Moritz. 2015. « Photoreceptors at a glance ». *Journal of Cell Science* 128 (22): 4039-45. <https://doi.org/10.1242/jcs.175687>.
- Moorman, Stephen J., et Ardon Z. Shorr. 2008. « The Primary Cilium as a Gravitational Force Transducer and a Regulator of Transcriptional Noise ». *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 237 (8): 1955-59. <https://doi.org/10.1002/dvdy.21493>.
- Morizur, Lise, Elise Herardot, Christelle Monville, et Karim Ben M'Barek. 2020. « Human pluripotent stem cells: A toolbox to understand and treat retinal degeneration ». *Molecular and Cellular Neuroscience* 107 (septembre):103523. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2020.103523>.
- Mukhopadhyay, Saikat, Hemant B. Badgandi, Sun-hee Hwang, Bandarigoda Somatilaka, Issei S. Shimada, et Kasturi Pal. 2017. « Trafficking to the primary cilium membrane ». *Molecular Biology of the Cell* 28 (2): 233-39. <https://doi.org/10.1091/mbc.e16-07-0505>.
- Muller, Otto Friedrik. 1786. *Animalcula infusoria fluviatilia et marina, quae detexit, systematice descripsit et ad vivum delineari curavit Otho Fridericus Muller ... sistit opus hoc posthumum quod ... in lucem tradit vidua ejus nobilissima, cura Othonis Fabricii*.
- Muñiz, Alberto, Kaini R. Ramesh, Whitney A. Greene, Jae-Hyek Choi, et Heuy-Ching Wang. 2015. « Deriving Retinal Pigment Epithelium (RPE) from Induced Pluripotent Stem (IPS) Cells by Different Sizes of Embryoid Bodies ». *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, n° 96 (février), 52262. <https://doi.org/10.3791/52262>.
- Nakano, Tokushige, Satoshi Ando, Nozomu Takata, Masako Kawada, Keiko Muguruma, Kiyotoshi Sekiguchi, Koichi Saito, Shigenobu Yonemura, Mototsugu Eiraku, et Yoshiki Sasai. 2012. « Self-Formation of Optic Cups and Storable Stratified Neural Retina from Human ESCs ». *Cell Stem Cell* 10 (6): 771-85. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.05.009>.

- Nesmith, Jessica E., Timothy L. Hostalley, Carmen C. Leitch, Maggie S. Matern, Saumil Sethna, Rebecca McFarland, Sukanya Lodh, et al. 2019. « Genomic Knockout of *Alms1* in Zebrafish Recapitulates Alström Syndrome and Provides Insight into Metabolic Phenotypes ». *Human Molecular Genetics* 28 (13): 2212-23. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddz053>.
- Newsome, David A., Michael V. Miceli, Mark R. Liles, David J. Tate, et Peter D. Oliver. 1994. « Antioxidants in the retinal pigment epithelium ». *Progress in Retinal and Eye Research* 13 (1): 101-23. [https://doi.org/10.1016/1350-9462\(94\)90006-X](https://doi.org/10.1016/1350-9462(94)90006-X).
- Niederlova, Veronika, Martin Modrak, Oksana Tsyklauri, Martina Huranova, et Ondrej Stepanek. 2019. « Meta-Analysis of Genotype-Phenotype Associations in Bardet-Biedl Syndrome Uncovers Differences among Causative Genes ». *Human Mutation* 40 (11): 2068-87. <https://doi.org/10.1002/humu.23862>.
- Niehrs, Christof, Fabio Da Silva, et Carina Seidl. 2024. « Cilia as Wnt Signaling Organelles ». *Trends in Cell Biology* 0 (0). <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2024.04.001>.
- Niles, Andrew L., Richard A. Moravec, et Terry L. Riss. 2008. « Caspase Activity Assays ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 414:137-50.
- Ning, Ke, Ziming Luo, Tia J. Kowal, Matthew Tran, Rishab Majumder, Trent M. Jarin, Albert Y. Wu, Jeffrey L. Goldberg, et Yang Sun. 2023. « Characterization of Primary Cilia Formation in Human ESC-Derived Retinal Organoids ». *Stem Cells International* 2023 (janvier):6494486. <https://doi.org/10.1155/2023/6494486>.
- Norris, Dominic P., et Daniel T. Grimes. 2012. « Mouse models of ciliopathies: the state of the art ». *Disease Models & Mechanisms* 5 (3): 299-312. <https://doi.org/10.1242/dmm.009340>.
- Oh, Edwin C. T., Naheed Khan, Elena Novelli, Hemant Khanna, Enrica Strettoi, et Anand Swaroop. 2007. « Transformation of cone precursors to functional rod photoreceptors by bZIP transcription factor NRL ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (5): 1679-84. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605934104>.
- Ortolan, Davide, Ruchi Sharma, Andrei Volkov, Arvydas Maminishkis, Nathan A. Hotaling, Laryssa A. Huryn, Catherine Cukras, Stefano

- Di Marco, Silvia Bisti, et Kapil Bharti. 2022. « Single-Cell-Resolution Map of Human Retinal Pigment Epithelium Helps Discover Subpopulations with Differential Disease Sensitivity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 119 (19): e2117553119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2117553119>.
- Osakada, Fumitaka, Hanako Ikeda, Michiko Mandai, Takafumi Wataya, Kiichi Watanabe, Nagahisa Yoshimura, Akinori Akaike, Yoshiki Sasai, et Masayo Takahashi. 2008. « Toward the Generation of Rod and Cone Photoreceptors from Mouse, Monkey and Human Embryonic Stem Cells ». *Nature Biotechnology* 26 (2): 215-24. <https://doi.org/10.1038/nbt1384>.
- Osakada, Fumitaka, Zi-Bing Jin, Yasuhiko Hirami, Hanako Ikeda, Teruko Danjyo, Kiichi Watanabe, Yoshiki Sasai, et Masayo Takahashi. 2009. « In vitro differentiation of retinal cells from human pluripotent stem cells by small-molecule induction ». *Journal of Cell Science* 122 (17): 3169-79. <https://doi.org/10.1242/jcs.050393>.
- Ozantürk, Ayşegül, Jan D. Marshall, Gayle B. Collin, Selma Düzenli, Robert P. Marshall, Şükrü Candan, Tülay Tos, et al. 2015. « The Phenotypic and Molecular Genetic Spectrum of Alström Syndrome in 44 Turkish Kindreds and a Literature Review of Alström Syndrome in Turkey ». *Journal of Human Genetics* 60 (1): 1-9. <https://doi.org/10.1038/jhg.2014.85>.
- Paisey, R. B., C. M. Carey, L. Bower, J. Marshall, P. Taylor, P. Maffei, et P. Mansell. 2004. « Hypertriglyceridaemia in Alström's Syndrome: Causes and Associations in 37 Cases ». *Clinical Endocrinology* 60 (2): 228-31. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2004.01952.x>.
- Paisey, Richard B., Tarekeng Geberhiwot, Michael Waterson, Robert Cramb, Rick Steeds, Kathleen Williams, Alison White, et Carol Hardy. 2014. « Modification of Severe Insulin Resistant Diabetes in Response to Lifestyle Changes in Alström Syndrome ». *European Journal of Medical Genetics* 57 (2-3): 71-75. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2013.12.008>.
- Paisey, Richard B., Rosamund M. Paisey, Mary P. Thomson, Lynne Bower, Pietro Maffei, Julian P. H. Shield, Sue Barnett, et Jan D. Marshall. 2009. « Protection from Clinical Peripheral Sensory Neuropathy in Alström Syndrome in Contrast to Early-Onset

- Type 2 Diabetes ». *Diabetes Care* 32 (3): 462-64. <https://doi.org/10.2337/dc08-1584>.
- Palfi, Arpad, Adlet Yesmambetov, Pete Humphries, Karsten Hokamp, et G. Jane Farrar. 2020. « Non-Photoreceptor Expression of Tulp1 May Contribute to Extensive Retinal Degeneration in Tulp1<sup>-/-</sup> Mice ». *Frontiers in Neuroscience* 14 (juin). <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00656>.
- Pan, Deng, Xiao Zhang, Kangxin Jin, et Zi-Bing Jin. 2023. « CRX haploinsufficiency compromises photoreceptor precursor translocation and differentiation in human retinal organoids ». *Stem Cell Research & Therapy* 14 (1): 346. <https://doi.org/10.1186/s13287-023-03590-3>.
- Papermaster, D. S., et W. J. Dreyer. 1974. « Rhodopsin Content in the Outer Segment Membranes of Bovine and Frog Retinal Rods ». *Biochemistry* 13 (11): 2438-44. <https://doi.org/10.1021/bi00708a031>.
- Parinot, Célia, Jonathan Chatagnon, Quentin Rieu, Solène Roux, Dorine Néel, Florian Hamieh, et Emeline F. Nandrot. 2024. « Gas6 and Protein S Ligands Cooperate to Regulate MerTK Rhythmic Activity Required for Circadian Retinal Phagocytosis ». *International Journal of Molecular Sciences* 25 (12): 6630. <https://doi.org/10.3390/ijms25126630>.
- Patnaik, Sarita Rani, Rakesh Kotapati Raghupathy, Xun Zhang, David Mansfield, et Xinhua Shu. 2015. « The Role of RPGR and Its Interacting Proteins in Ciliopathies ». *Journal of Ophthalmology* 2015:414781. <https://doi.org/10.1155/2015/414781>.
- Phillips, M. Joseph, Enio T. Perez, Jessica M. Martin, Samantha T. Reshel, Kyle A. Wallace, Elizabeth E. Capowski, Ruchira Singh, et al. 2014. « Modeling Human Retinal Development with Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Reveals Multiple Roles for Visual System Homeobox 2 ». *Stem Cells* 32 (6): 1480-92. <https://doi.org/10.1002/stem.1667>.
- Phillips, M. Joseph, Kyle A. Wallace, Sarah J. Dickerson, Michael J. Miller, Amelia D. Verhoeven, Jessica M. Martin, Lynda S. Wright, et al. 2012. « Blood-Derived Human IPS Cells Generate Optic Vesicle-like Structures with the Capacity to Form Retinal Laminae and Develop Synapses ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 53 (4): 2007-19. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-9313>.

- Phua, Siew Cheng, Shuhei Chiba, Masako Suzuki, Emily Su, Elle C. Roberson, Ganesh V. Pusapati, Mitsutoshi Setou, et al. 2017. « Dynamic Remodeling of Membrane Composition Drives Cell Cycle through Primary Cilia Excision ». *Cell* 168 (1): 264-279.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.032>.
- Pugacheva, Elena N., Sandra A. Jablonski, Tiffiney R. Hartman, Elizabeth P. Henske, et Erica A. Golemis. 2007. « HEF1-Dependent Aurora A Activation Induces Disassembly of the Primary Cilium ». *Cell* 129 (7): 1351-63. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.035>.
- Purves, Dale, Elizabeth Brannon, Roberto Cabeza, Scott A. Huettel, et Kevin S. LaBar. 2008. *Principles of Cognitive Neuroscience*. Édité par Dale Purves. *Principles of Cognitive Neuroscience*. 1st éd. Sinauer Associates, Incorporated. <https://search.worldcat.org/title/234174857>.
- Quinn, Peter M. J., et Jan Wijnholds. 2019. « Retinogenesis of the Human Fetal Retina: An Apical Polarity Perspective ». *Genes* 10 (12): 987. <https://doi.org/10.3390/genes10120987>.
- Quiros-Tejeira, R. E., J. Vargas, et M. E. Ament. 2001. « Early-Onset Liver Disease Complicated with Acute Liver Failure in Alstrom Syndrome ». *American Journal of Medical Genetics* 101 (1): 9-11. <https://doi.org/10.1002/ajmg.1292>.
- Regent, Florian, Lise Morizur, Léa Lesueur, Walter Habeler, Alexandra Plancheron, Karim Ben M'Barek, et Christelle Monville. 2019. « Automation of Human Pluripotent Stem Cell Differentiation toward Retinal Pigment Epithelial Cells for Large-Scale Productions ». *Scientific Reports* 9 (1): 10646. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47123-6>.
- Reichenbach, Andreas, et Andreas Bringmann. 2013. « New Functions of Müller Cells ». *Glia* 61 (5): 651-78. <https://doi.org/10.1002/glia.22477>.
- Reichman, Sacha, Amélie Slembrouck, Giuliana Gagliardi, Antoine Chaffiol, Angélique Terray, Céline Nanteau, Anais Potey, et al. 2017. « Generation of Storable Retinal Organoids and Retinal Pigmented Epithelium from Adherent Human IPS Cells in Xeno-Free and Feeder-Free Conditions ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, février. <https://doi.org/10.1002/stem.2586>.
- Reichman, Sacha, Angélique Terray, Amélie Slembrouck, Céline Nanteau, Gaël Orioux, Walter Habeler, Emeline F. Nandrot, José-

- Alain Sahel, Christelle Monville, et Olivier Goureau. 2014. « From Confluent Human IPS Cells to Self-Forming Neural Retina and Retinal Pigmented Epithelium ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (23): 8518-23. <https://doi.org/10.1073/pnas.1324212111>.
- Renner, Henrik, Martha Grabos, Katharina J Becker, Theresa E Kagermeier, Jie Wu, Mandy Otto, Stefan Peischard, et al. 2020. « A fully automated high-throughput workflow for 3D-based chemical screening in human midbrain organoids ». Édité par Didier YR Stainier, Benjamin S Freedman, et Jessica Young. *eLife* 9 (novembre):e52904. <https://doi.org/10.7554/eLife.52904>.
- Riedmayr, Lisa Maria, Klara Sonnie Hinrichsmeyer, Stefan Bernhard Thalhammer, David Manuel Mittas, Nina Karguth, Dina Yehia Otify, Sybille Böhm, et al. 2023. « MRNA Trans-Splicing Dual AAV Vectors for (Epi)Genome Editing and Gene Therapy ». *Nature Communications* 14 (1): 6578. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-42386-0>.
- Rigato, Mauro, Angelo Avogaro, et Gian Paolo Fadini. 2016. « Levels of Circulating Progenitor Cells, Cardiovascular Outcomes and Death: A Meta-Analysis of Prospective Observational Studies ». *Circulation Research* 118 (12): 1930-39. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.308366>.
- Riley, Richard D., Paul C. Lambert, et Ghada Abo-Zaid. 2010. « Meta-Analysis of Individual Participant Data: Rationale, Conduct, and Reporting ». *BMJ (Clinical Research Ed.)* 340 (février):c221. <https://doi.org/10.1136/bmj.c221>.
- Ringers, Christa, Emilie W. Olstad, et Nathalie Jurisch-Yaksi. 2019. « The role of motile cilia in the development and physiology of the nervous system ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 375 (1792): 20190156. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0156>.
- Rizzolo, Lawrence J. 2008. « Glucose Transporters in Retinal Pigment Epithelium Development ». In *Ocular Transporters In Ophthalmic Diseases And Drug Delivery: Ophthalmology Research*, édité par Joyce Tombran-Tink et Colin J. Barnstable, 185-99. Ophthalmology Research. Totowa, NJ: Humana Press. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-375-2\\_10](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-375-2_10).
- Roca, Xavier, Ravi Sachidanandam, et Adrian R. Krainer. 2003. « Intrinsic

- differences between authentic and cryptic 5' splice sites ». *Nucleic Acids Research* 31 (21): 6321-33. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg830>.
- Rodrigues, Amélie, Amélie Slembrouck-Brec, Céline Nanteau, Angélique Terray, Yelyzaveta Tymoshenko, Yvrick Zagar, Sacha Reichman, et al. 2022. « Modeling PRPF31 Retinitis Pigmentosa Using Retinal Pigment Epithelium and Organoids Combined with Gene Augmentation Rescue ». *Npj Regenerative Medicine* 7 (1): 1-22. <https://doi.org/10.1038/s41536-022-00235-6>.
- Romano, Sara, Gabriella Milan, Caterina Veronese, Gayle B. Collin, Jan D. Marshall, Cinzia Centobene, Francesca Favaretto, et al. 2008. « Regulation of Alström syndrome gene expression during adipogenesis and its relationship with fat cell insulin sensitivity ». *International Journal of Molecular Medicine* 21 (6): 731-36. <https://doi.org/10.3892/ijmm.21.6.731>.
- Romijn, H. J., F. van Huizen, et P. S. Wolters. 1984. « Towards an Improved Serum-Free, Chemically Defined Medium for Long-Term Culturing of Cerebral Cortex Tissue ». *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 8 (3): 301-34. [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(84\)90055-1](https://doi.org/10.1016/0149-7634(84)90055-1).
- Rozanska, Agata, Rodrigo Cerna-Chavez, Rachel Queen, Joseph Collin, Darin Zerti, Birthe Dorgau, Chia Shyan Beh, et al. 2022. « pRB-Depleted Pluripotent Stem Cell Retinal Organoids Recapitulate Cell State Transitions of Retinoblastoma Development and Suggest an Important Role for pRB in Retinal Cell Differentiation ». *Stem Cells Translational Medicine* 11 (4): 415-33. <https://doi.org/10.1093/stcltm/szac008>.
- Russell, W. L., E. M. Kelly, P. R. Hunsicker, J. W. Bangham, S. C. Maddux, et E. L. Phipps. 1979. « Specific-Locus Test Shows Ethylnitrosourea to Be the Most Potent Mutagen in the Mouse ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76 (11): 5818-19. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.11.5818>.
- Russell-Eggitt, I. M., P. T. Clayton, R. Coffey, A. Kriss, D. S. Taylor, et J. F. Taylor. 1998. « Alström Syndrome. Report of 22 Cases and Literature Review ». *Ophthalmology* 105 (7): 1274-80. [https://doi.org/10.1016/S0161-6420\(98\)97033-6](https://doi.org/10.1016/S0161-6420(98)97033-6).
- Saint-Geniez, Magali, Tomoki Kurihara, Eiichi Sekiyama, Angel E.

- Maldonado, et Patricia A. D'Amore. 2009. « An Essential Role for RPE-Derived Soluble VEGF in the Maintenance of the Choriocapillaris ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (44): 18751-56. <https://doi.org/10.1073/pnas.0905010106>.
- Salesse, C. 2017. « Physiologie du signal visuel rétinien : de la phototransduction jusqu'au cycle visuel ». *Journal Français d'Ophthalmologie* 40 (3): 239-50. <https://doi.org/10.1016/j.jfo.2016.12.006>.
- Salisbury, Jeffrey L, Kelly M Suino, Robert Busby, et Margaret Springett. 2002. « Centrin-2 Is Required for Centriole Duplication in Mammalian Cells ». *Current Biology* 12 (15): 1287-92. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)01019-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)01019-9).
- Salobrar-Garcia, Elena, José Ramírez, Bastian Rojas, Gallego B.I., Ana Ramírez, Juan Salazar, Rosa Hoz, et Triviño A. 2014. « Glia and blood retinal barrier: effects of ocular hypertension ». In , 123-62.
- Sánchez, Irma, et Brian David Dynlacht. 2016. « Cilium Assembly and Disassembly ». *Nature Cell Biology* 18 (7): 711-17. <https://doi.org/10.1038/ncb3370>.
- Sanyoura, May, Cédric Woudstra, George Halaby, Patrick Baz, Valérie Senée, Pierre-Jean Guillausseau, Pierre Zalloua, et Cécile Julier. 2014. « A Novel ALMS1 Splice Mutation in a Non-Obese Juvenile-Onset Insulin-Dependent Syndromic Diabetic Patient ». *European Journal of Human Genetics: EJHG* 22 (1): 140-43. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2013.87>.
- Satir, P. 1995. « Landmarks in Cilia Research from Leeuwenhoek to Us ». *Cell Motility and the Cytoskeleton* 32 (2): 90-94. <https://doi.org/10.1002/cm.970320203>.
- Satir, Peter, et Søren Tvorup Christensen. 2007. « Overview of Structure and Function of Mammalian Cilia ». *Annual Review of Physiology* 69:377-400. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.040705.141236>.
- Satir, Peter, Lotte B. Pedersen, et Søren T. Christensen. 2010. « The Primary Cilium at a Glance ». *Journal of Cell Science* 123 (Pt 4): 499-503. <https://doi.org/10.1242/jcs.050377>.
- Schacter, Daniel L. 2011. *Psychology*. New York, NY: Worth Publishers. <http://archive.org/details/psychology0000scha>.

- Schmidt, Kerstin N., Stefanie Kuhns, Annett Neuner, Birgit Hub, Hanswalter Zentgraf, et Gislene Pereira. 2012. « Cep164 mediates vesicular docking to the mother centriole during early steps of ciliogenesis ». *Journal of Cell Biology* 199 (7): 1083-1101. <https://doi.org/10.1083/jcb.201202126>.
- Schwartz, Steven D., Jean-Pierre Hubschman, Gad Heilwell, Valentina Franco-Cardenas, Carolyn K. Pan, Rosaleen M. Ostrick, Edmund Mickunas, Roger Gay, Irina Klimanskaya, et Robert Lanza. 2012. « Embryonic Stem Cell Trials for Macular Degeneration: A Preliminary Report ». *The Lancet* 379 (9817): 713-20. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60028-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60028-2).
- Sedmak, Tina, et Uwe Wolfrum. 2011. « Intraflagellar Transport Proteins in Ciliogenesis of Photoreceptor Cells ». *Biology of the Cell* 103 (10): 449-66. <https://doi.org/10.1042/BC20110034>.
- Sharma, Ruchi, Vladimir Khristov, Aaron Rising, Balendu Shekhar Jha, Roba Dejene, Nathan Hotaling, Yichao Li, et al. 2019. « Clinical-Grade Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium Patch Rescues Retinal Degeneration in Rodents and Pigs ». *Science Translational Medicine* 11 (475): eaat5580. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat5580>.
- Shenje, Lincoln T., Peter Andersen, Marc K. Halushka, Cecillia Lui, Laviel Fernandez, Gayle B. Collin, Nuria Amat-Alarcon, et al. 2014. « Mutations in Alström Protein Impair Terminal Differentiation of Cardiomyocytes ». *Nature Communications* 5 (1): 3416. <https://doi.org/10.1038/ncomms4416>.
- Simó, Rafael, Marta Villarroel, Lúdia Corraliza, Cristina Hernández, et Marta Garcia-Ramírez. 2010. « The Retinal Pigment Epithelium: Something More than a Constituent of the Blood-Retinal Barrier—Implications for the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy ». *BioMed Research International* 2010 (février):e190724. <https://doi.org/10.1155/2010/190724>.
- Sinha, Sunil K., Amrit Bhangoo, Henry Anhalt, Noel Maclaren, Jan D. Marshall, Gayle B. Collin, Jürgen K. Naggert, et Svetlana Ten. 2007. « Effect of Metformin and Rosiglitazone in a Prepubertal Boy with Alström Syndrome ». *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism: JPEM* 20 (9): 1045-52. <https://doi.org/10.1515/jpem.2007.20.9.1045>.
- Slembrouck-Brec, Amélie, Amélie Rodrigues, Oriane Rabesandratana,

- Giuliana Gagliardi, Céline Nanteau, Stéphane Fouquet, Gilles Thuret, Sacha Reichman, Gael Orioux, et Olivier Goureau. 2019. « Reprogramming of Adult Retinal Müller Glial Cells into Human-Induced Pluripotent Stem Cells as an Efficient Source of Retinal Cells ». *Stem Cells International* 2019:7858796. <https://doi.org/10.1155/2019/7858796>.
- Song, Ping, Lynn Dudinsky, Joseph Fogerty, Robert Gaivin, et Brian D. Perkins. 2016. « Arl13b Interacts With Vangl2 to Regulate Cilia and Photoreceptor Outer Segment Length in Zebrafish ». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 57 (10): 4517-26. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-19898>.
- Sorokin, S. P. 1968. « Reconstructions of Centriole Formation and Ciliogenesis in Mammalian Lungs ». *Journal of Cell Science* 3 (2): 207-30. <https://doi.org/10.1242/jcs.3.2.207>.
- Sorokin, Sergei. 1962. « CENTRIOLES AND THE FORMATION OF RUDIMENTARY CILIA BY FIBROBLASTS AND SMOOTH MUSCLE CELLS ». *The Journal of Cell Biology* 15 (2): 363-77.
- Spasic, Milos, et Christopher R. Jacobs. 2017. « Primary cilia: Cell and molecular mechanosensors directing whole tissue function ». *Seminars in cell & developmental biology* 71 (novembre):42-52. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.08.036>.
- Stanford, William L., Jason B. Cohn, et Sabine P. Cordes. 2001. « Gene-Trap Mutagenesis: Past, Present and Beyond ». *Nature Reviews Genetics* 2 (10): 756-68. <https://doi.org/10.1038/35093548>.
- Stern, Allysa, Brandon Thompson, Keith Williams, Rob McClellan, Steven Gebhart, et Jessica Hartman. 2022. « The CellRaft AIR® system: A novel system enabling organoid imaging, identification, and isolation ». *SLAS Discovery* 27 (3): 201-8. <https://doi.org/10.1016/j.slasd.2021.11.003>.
- Stewart, L. A., et M. J. Clarke. 1995. « Practical Methodology of Meta-Analyses (Overviews) Using Updated Individual Patient Data. Cochrane Working Group ». *Statistics in Medicine* 14 (19): 2057-79. <https://doi.org/10.1002/sim.4780141902>.
- Stottmann, Rolf, et David R. Beier. 2014. « ENU Mutagenesis in the Mouse ». *Current protocols in human genetics / editorial board, Jonathan L. Haines ... [et al.]* 82 (juillet):15.4.1-15.4.10. <https://doi.org/10.1002/0471142905.hg1504s82>.
- Sugiyama, Yuki, Richard J. W. Stump, Anke Nguyen, Li Wen, Yongjuan

- Chen, Yanshu Wang, Jennifer N. Murdoch, Frank J. Lovicu, et John W. McAvoy. 2010. « Secreted Frizzled-Related Protein Disrupts PCP in Eye Lens Fiber Cells That Have Polarised Primary Cilia ». *Developmental Biology* 338 (2): 193-201. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.11.033>.
- Sun, Chunjiao, Jun Zhou, et Xiaoqian Meng. 2021. « Primary cilia in retinal pigment epithelium development and diseases ». *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 25 (19): 9084-88. <https://doi.org/10.1111/jcmm.16882>.
- Sun, Ning, et Huimin Zhao. 2013. « Transcription Activator-like Effector Nucleases (TALENs): A Highly Efficient and Versatile Tool for Genome Editing ». *Biotechnology and Bioengineering* 110 (7): 1811-21. <https://doi.org/10.1002/bit.24890>.
- Swaroop, Anand, Douglas Kim, et Douglas Forrest. 2010. « Transcriptional Regulation of Photoreceptor Development and Homeostasis in the Mammalian Retina ». *Nature Reviews. Neuroscience* 11 (8): 563-76. <https://doi.org/10.1038/nrn2880>.
- Swartz, J. G., et J. E. Mitchell. 1973. « Phospholipase Activity of Retina and Pigment Epithelium ». *Biochemistry* 12 (26): 5273-78. <https://doi.org/10.1021/bi00750a008>.
- Takahashi, Kazutoshi, Koji Tanabe, Mari Ohnuki, Megumi Narita, Tomoko Ichisaka, Kiichiro Tomoda, et Shinya Yamanaka. 2007. « Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors ». *Cell* 131 (5): 861-72. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>.
- Takahashi, Kazutoshi, et Shinya Yamanaka. 2006. « Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors ». *Cell* 126 (4): 663-76. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>.
- Tanos, Barbara E., Hui-Ju Yang, Rajesh Soni, Won-Jing Wang, Frank P. Macaluso, John M. Asara, et Meng-Fu Bryan Tsou. 2013. « Centriole Distal Appendages Promote Membrane Docking, Leading to Cilia Initiation ». *Genes & Development* 27 (2): 163-68. <https://doi.org/10.1101/gad.207043.112>.
- Taşdemir, S., A. Güzel-Ozantürk, J. D. Marshall, G. B. Collin, R. K. Özgül, N. Narin, M. Dündar, et J. K. Naggert. 2013. « Atypical Presentation and a Novel Mutation in ALMS1: Implications for Clinical and Molecular Diagnostic Strategies for Alström

- Syndrome ». *Clinical Genetics* 83 (1): 96-98.  
<https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2012.01883.x>.
- Tewary, Mukul, Nika Shakiba, et Peter W. Zandstra. 2018. « Stem Cell Bioengineering: Building from Stem Cell Biology ». *Nature Reviews Genetics* 19 (10): 595-614.  
<https://doi.org/10.1038/s41576-018-0040-z>.
- Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall, et J. M. Jones. 1998. « Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts ». *Science (New York, N.Y.)* 282 (5391): 1145-47.  
<https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>.
- Thomson, J. A., J. Kalishman, T. G. Golos, M. Durning, C. P. Harris, R. A. Becker, et J. P. Hearn. 1995. « Isolation of a Primate Embryonic Stem Cell Line ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (17): 7844-48.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.92.17.7844>.
- Toms, Maria, Waheeda Pagarkar, et Mariya Moosajee. 2020. « Usher Syndrome: Clinical Features, Molecular Genetics and Advancing Therapeutics ». *Therapeutic Advances in Ophthalmology* 12:2515841420952194.  
<https://doi.org/10.1177/2515841420952194>.
- Truong, Vincent, Kevin Viken, Zhaohui Geng, Samantha Barkan, Blake Johnson, Mara C. Ebeling, Sandra R. Montezuma, Deborah A. Ferrington, et James R. Dutton. 2021. « Automating Human Induced Pluripotent Stem Cell Culture and Differentiation of iPSC-Derived Retinal Pigment Epithelium for Personalized Drug Testing ». *SLAS Technology* 26 (3): 287-99.  
<https://doi.org/10.1177/2472630320972110>.
- Turba, Maria Elena, Paolo Ferrari, Raffaella Milanese, Fabio Gentilini, et Maria Longeri. 2023. « HCM-Associated ALMS1 Variant: Allele Drop-out and Frequency in Italian Sphynx Cats ». *Animal Genetics* 54 (5): 643-46. <https://doi.org/10.1111/age.13340>.
- Urnov, Fyodor D., Edward J. Rebar, Michael C. Holmes, H. Steve Zhang, et Philip D. Gregory. 2010. « Genome Editing with Engineered Zinc Finger Nucleases ». *Nature Reviews Genetics* 11 (9): 636-46.  
<https://doi.org/10.1038/nrg2842>.
- Vallone, Valeria Fernandez, Narasimha Swamy Telugu, Iris Fischer, Duncan Miller, Sandra Schommer, Sebastian Diecke, et Harald

- Stachelscheid. 2020. « Methods for Automated Single Cell Isolation and Sub-Cloning of Human Pluripotent Stem Cells ». *Current Protocols in Stem Cell Biology* 55 (1): e123. <https://doi.org/10.1002/cpsc.123>.
- Vergara, M. Natalia, Miguel Flores-Bellver, Silvia Aparicio-Domingo, Minda McNally, Karl J. Wahlin, Meera T. Saxena, Jeff S. Mumm, et M. Valeria Canto-Soler. 2017. « Three-dimensional automated reporter quantification (3D-ARQ) technology enables quantitative screening in retinal organoids ». *Development* 144 (20): 3698-3705. <https://doi.org/10.1242/dev.146290>.
- Viets, Kayla, Kiara Eldred, et Robert J. Johnston. 2016. « Mechanisms of Photoreceptor Patterning in Vertebrates and Invertebrates ». *Trends in Genetics: TIG* 32 (10): 638-59. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2016.07.004>.
- Vingolo, Enzo Maria, Serena Salvatore, Pier Luigi Greda, Pietro Maffei, Gabriella Milan, et Jan Marshall. 2010. « High-Resolution Spectral Domain Optical Coherence Tomography Images of Alström Syndrome ». *Journal of Pediatric Ophthalmology and Strabismus* 47 Online (mai):e1-3. <https://doi.org/10.3928/01913913-20100507-05>.
- Volkman, Gerrit, et Hideo Iwai. 2010. « Protein Trans-Splicing and Its Use in Structural Biology: Opportunities and Limitations ». *Molecular BioSystems* 6 (11): 2110-21. <https://doi.org/10.1039/C0MB00034E>.
- Völkner, Manuela, Marlen Zschätzsch, Maria Rostovskaya, Rupert W. Overall, Volker Busskamp, Konstantinos Anastasiadis, et Mike O. Karl. 2016. « Retinal Organoids from Pluripotent Stem Cells Efficiently Recapitulate Retinogenesis ». *Stem Cell Reports* 6 (4): 525-38. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.03.001>.
- Wagstaff, Ellie, Andrea Berzal, Camiel Boon, Peter Quinn, Anneloor Asbroek, et Arthur Bergen. 2021. « The Role of Small Molecules and Their Effect on the Molecular Mechanisms of Early Retinal Organoid Development ». *International Journal of Molecular Sciences* 22 (juin):7081. <https://doi.org/10.3390/ijms22137081>.
- Wang, Aline Yen Ling, et Charles Yuen Yung Loh. 2019. « Episomal Induced Pluripotent Stem Cells: Functional and Potential Therapeutic Applications ». *Cell Transplantation* 28 (1 Suppl):

- 112S-131S. <https://doi.org/10.1177/0963689719886534>.
- Wang, Jennifer T., et Tim Stearns. 2017. « The ABCs of Centriole Architecture: The Form and Function of Triplet Microtubules ». *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 82 (janvier):145-55. <https://doi.org/10.1101/sqb.2017.82.034496>.
- Wang, Jing, et Dusanka Deretic. 2014. « Molecular complexes that direct rhodopsin transport to primary cilia ». *Progress in retinal and eye research* 38 (janvier):10.1016/j.preteyeres.2013.08.004. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2013.08.004>.
- Wang, Juan, Xin Chen, Fang Wang, Jieping Zhang, Peng Li, Zongyi Li, Jingying Xu, et al. 2016. « OFD1, as a Ciliary Protein, Exhibits Neuroprotective Function in Photoreceptor Degeneration Models ». *PLOS ONE* 11 (5): e0155860. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155860>.
- Wang, Lei, et Brian D. Dynlacht. 2018. « The regulation of cilium assembly and disassembly in development and disease ». *Development* 145 (18): dev151407. <https://doi.org/10.1242/dev.151407>.
- Warren, S. E., S. J. Schnitt, A. J. Bauman, R. E. Gianelly, L. Landsberg, et D. S. Baim. 1987. « Late Onset Dilated Cardiomyopathy in a Unique Familial Syndrome of Hypogonadism and Metabolic Abnormalities ». *American Heart Journal* 114 (6): 1522-24. [https://doi.org/10.1016/0002-8703\(87\)90561-8](https://doi.org/10.1016/0002-8703(87)90561-8).
- Webb, Tom R., David A. Parfitt, Jessica C. Gardner, Ariadna Martinez, Dalila Bevilacqua, Alice E. Davidson, Ilaria Zito, et al. 2012. « Deep intronic mutation in OFD1, identified by targeted genomic next-generation sequencing, causes a severe form of X-linked retinitis pigmentosa (RP23) ». *Human Molecular Genetics* 21 (16): 3647-54. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddc194>.
- Welsh, Louis W. 2007. « Alström Syndrome: Progressive Deafness and Blindness ». *The Annals of Otology, Rhinology, and Laryngology* 116 (4): 281-85. <https://doi.org/10.1177/000348940711600411>.
- Wheatley, D. N. 1995. « Primary Cilia in Normal and Pathological Tissues ». *Pathobiology: Journal of Immunopathology, Molecular and Cellular Biology* 63 (4): 222-38. <https://doi.org/10.1159/000163955>.
- Williams, Corey L., Chunmei Li, Katarzyna Kida, Peter N. Inglis, Swetha

- Mohan, Lucie Semenec, Nathan J. Bialas, et al. 2011. « MKS and NPHP modules cooperate to establish basal body/transition zone membrane associations and ciliary gate function during ciliogenesis ». *The Journal of Cell Biology* 192 (6): 1023-41. <https://doi.org/10.1083/jcb.201012116>.
- Woerz, Franziska, Felix Hoffmann, Shibu Antony, Sylvia Bolz, Mohamed Ali Jarboui, Katrin Junger, Franziska Klose, et al. 2024. « Interactome Analysis Reveals a Link of the Novel ALMS1-CEP70 Complex to Centrosomal Clusters ». *Molecular & Cellular Proteomics* 23 (1). <https://doi.org/10.1016/j.mcpro.2023.100701>.
- Wu, Yu, Sisi Peng, Richard H. Finnell, et Yufang Zheng. 2021. « Organoids as a New Model System to Study Neural Tube Defects ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 35 (4): e21545. <https://doi.org/10.1096/fj.202002348R>.
- Xia, Tina, et Lawrence J. Rizzolo. 2017. « Effects of Diabetic Retinopathy on the Barrier Functions of the Retinal Pigment Epithelium ». *Vision Research* 139 (octobre):72-81. <https://doi.org/10.1016/j.visres.2017.02.006>.
- Xu, Chunhui, Elen Rosler, Jianjie Jiang, Jane S. Lebkowski, Joseph D. Gold, Chris O'Sullivan, Karen Delavan-Boorsma, Michael Mok, Adrienne Bronstein, et Melissa K. Carpenter. 2005. « Basic Fibroblast Growth Factor Supports Undifferentiated Human Embryonic Stem Cell Growth without Conditioned Medium ». *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 23 (3): 315-23. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0211>.
- Yadav, Sharda Prasad, Neel Kamal Sharma, Chunqiao Liu, Lijin Dong, Tiansen Li, et Anand Swaroop. 2016. « Centrosomal protein CP110 controls maturation of the mother centriole during cilia biogenesis ». *Development* 143 (9): 1491-1501. <https://doi.org/10.1242/dev.130120>.
- Yan, Ziyong, Yulong Zhang, Dongsheng Duan, et John F. Engelhardt. 2000. « Trans-splicing vectors expand the utility of adeno-associated virus for gene therapy ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (12): 6716-21. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.12.6716>.
- Yang, Jun, Xiaoqing Liu, Guohua Yue, Michael Adamian, Oleg Bulgakov,

- et Tiansen Li. 2002. « Rootletin, a novel coiled-coil protein, is a structural component of the ciliary rootlet ». *Journal of Cell Biology* 159 (3): 431-40. <https://doi.org/10.1083/jcb.200207153>.
- Yang, T. Tony, Weng Man Chong, et Jung-Chi Liao. 2016. « STED and STORM Superresolution Imaging of Primary Cilia ». In *Cilia: Methods and Protocols*, édité par Peter Satir et Søren Tvorup Christensen, 169-92. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3789-9\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3789-9_11).
- Zhang, Wei, Linjing Li, Qin Su, Guangping Gao, et Hemant Khanna. 2018. « Gene Therapy Using a MiniCEP290 Fragment Delays Photoreceptor Degeneration in a Mouse Model of Leber Congenital Amaurosis ». *Human Gene Therapy* 29 (1): 42-50. <https://doi.org/10.1089/hum.2017.049>.
- Zhao, Zixuan, Xinyi Chen, Anna M. Dowbaj, Aleksandra Slijkic, Kaitlin Bratlie, Luda Lin, Eliza Li Shan Fong, et al. 2022. « Organoids ». *Nature reviews. Methods primers* 2:94. <https://doi.org/10.1038/s43586-022-00174-y>.
- Zhong, Xiufeng, Christian Gutierrez, Tian Xue, Christopher Hampton, M. Natalia Vergara, Li-Hui Cao, Ann Peters, et al. 2014. « Generation of Three-Dimensional Retinal Tissue with Functional Photoreceptors from Human iPSCs ». *Nature Communications* 5 (1): 4047. <https://doi.org/10.1038/ncomms5047>.
- Zulato, Elisabetta, Francesca Favaretto, Caterina Veronese, Stefano Campanaro, Jan D. Marshall, Sara Romano, Anna Cabrelle, et al. 2011. « ALMS1-Deficient Fibroblasts Over-Express Extra-Cellular Matrix Components, Display Cell Cycle Delay and Are Resistant to Apoptosis ». *PLOS ONE* 6 (4): e19081. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019081>.

## ANNEXES

---

Annexe 1 : Tableau récapitulatif des modèles animaux.

Annexe 2 : Figures de l'étude 2 en grand format

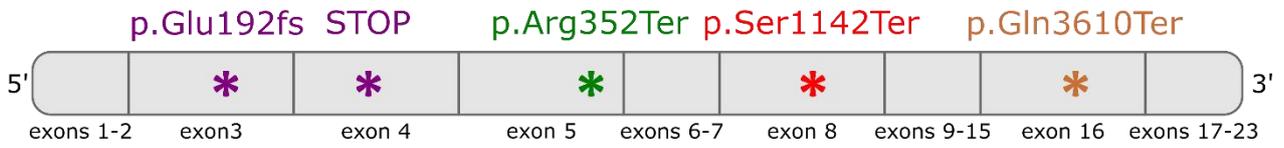
|                             | Souris ( <i>Mus musculus</i> )  |   | Rat ( <i>Rattus norvegicus</i> )   |   | Chat Sphynx ( <i>Felis catus</i> )  |   |
|-----------------------------|---|---|--|---|---|---|
|                             | <i>Alms1<sup>GM142321g</sup></i>  | <i>Alms1<sup>FO262</sup></i>  | <i>Alms1<sup>12333X1233X</sup></i>   | <i>Alms<sup>100g</sup></i>  | <i>Alms1<sup>Prm102</sup></i>   | <i>ALMS1-KO</i>   |
| <b>Références</b>           | (G.B. Collin et al. 2005)   | (Arsov et al. 2006)   | (Li et al. 2007)   | (Gaberhwo et al. 2021)  | (Krebs et al. 2017)   | (Jaykumar et al. 2018)  |
| <b>Mutation</b>             | Insertion par "piégeage de gène" dans l'intron 13   | Délétion spontanée de 11 pb dans l'exon 8   | Mutation non-sens induite par ENU dans l'exon 10   | Insertion d'une cassette par Cre-LoxP entre les exons 6 et 7          | Mutation induite par ENU dans l'intron 6 qui démasque un site cryptique   | Délétion de 17 pb dans l'exon 1 à l'aide de nucléases à doigt de zinc |
| <b>Atteintes visuelles</b>  | ERG anormal, des cônes, dégenérescence lente et progressive des photorécepteurs, accumulation de vésicules intracellulaires, mauvaise localisation de la rhodopsine | ERG plat et amincissement de la rétine chez les souris de 1 an  | Altération du transport de la rhodopsine   | /   | ERG granuleux présentant des taches blanches brillantes avec le temps, amincissement de la CNE de la rétine, dégenérescence des photorécepteurs, altération du transport de la rhodopsine | /   |
| <b>Atteintes auditives</b>  | ABR anormal, stéréodilis anormaux, perte des cellules ciliées externes, lésion de la strie vasculaire du canal cochléaire   | ABR anormal après 1 an  | /  | /   | /   | /   |
| <b>Obésité</b>              | Apparition vers 8-12 semaines   | Apparition vers 3 mois, mâles et femelles hyperphagiques  | Apparition vers 7-10 semaines  | Apparition vers 3 mois, hypertrophie des adipocytes                   | Prise de poids anormale à partir de 8-12 semaines   | Prise de poids légèrement anormale vers 10-11 semaines                |
| <b>Diabète de type 2</b>    | Hypertension, hyperglycémie précoce, hyperglycémie manifeste des mâles, glycémie élevée des femelles  | Hypertension, hyperglycémie avant 50 jours, hyperphagie et kystes des îlots pancréatiques   | Cas d'hyperinsulinémie, mais majorité ont glycémie normale   | Hyperglycémie à jeun, intolérance au glucose, résistance à l'insuline | /   | /   |
| <b>Atteintes lipidiques</b> | Hypercholestérolémie, taux de triglycérides normal  | Hypercholestérolémie, taux de triglycérides normal  | Hypercholestérolémie, taux de triglycérides élevés   | /   | /   | /   |
| <b>Atteintes cardiaques</b> | /   | /   | /  | /   | /   | Hypertension  |
| <b>Hypogonadisme</b>        | Hypogonadisme des mâles et atrophie des tubes séminifères, absence de sperme, fertilité des femelles avant l'apparition de l'obésité                                | Femelles fertiles avant l'apparition de l'obésité, perte progressive des cellules germinales, arrêt du développement des spermatozoïdes, défauts du flagelle des spermatozoïdes | Malformation des spermatozoïdes  | /   | /   | /   |
| <b>Atteintes rénales</b>    | Reins élargis, dilatation des tubes proximaux rénaux, protéinurie, chance de développer des kystes rénaux   | Tubules corticaux dilatés, perte du cil rénal dans les tubules proximaux rénaux des souris âgées  | Tubules corticaux dilatés, protéinurie, perte spécifique du cil rénal dans les tubules proximaux rénaux des souris âgées | /   | /   | Dérégulation rénale, forte sensibilité au sel                         |
| <b>Atteintes hépatiques</b> | Stéatose, hépatostéatite, fibrose   | Sous régime de Chow: stéatose. Sous régime riche en graisses: hépatostéatite, inflammation et fibrose   | Stéatose   | /   | /   | /   |

|                             | Poisson-zébre ( <i>Danio rerio</i> )  |                              |  |   |                                 |   |   |
|-----------------------------|---|------------------------------|--|---|---------------------------------|---|---|
|                             | <i>dms1<sup>-/-</sup></i><br>(Nasrith et al. 2019)  | <i>UAS-dms1<sup>4M</sup></i> | <i>UAS-dms1a-EGFP</i><br>(C. Chen et Yamashita 2020) | Drosophile [ <i>Drosophila melanogaster</i> ] | <i>UAS-dms1a-Vm9</i>            | <i>dms1<sup>2</sup></i><br>(Hou, Wu, et Wei 2023) | <i>dms1aΔCT-GFP</i> , <i>dms1bΔCT-GFP</i> |
| <b>Références</b>           |   |                              |  |   |                                 |   |   |
| <b>Mutation</b>             | Mutation par CRISPR/Cas9 ciblant l'exon 4 de <i>dms1</i> , délétion de 7 pb menant à un codon STOP précoce  | /                            | /  | /   | /                               | /   | /   |
| <b>Atteintes visuelles</b>  | Amincissement de la couche des photorécepteurs de la rétine, ERG anormal, mobilité réduite et baisse du comportement de recherche de nourriture         | /                            | /  | /   | /                               | /   | /   |
| <b>Atteintes auditives</b>  | /   | /                            | /  | /   | /                               | /   | /   |
| <b>Obésité</b>              | Prise de poids excessive  | /                            | /  | /   | /                               | /   | /   |
| <b>Diabète de type 2</b>    | Dépôts de graisse excessifs, hypertrophie hépato-pancréatique, réduction des zones positives aux granules d'insuline, réduction du nombre de cellules β | /                            | /  | /   | /                               | /   | /   |
| <b>Atteintes lipidiques</b> |   | /                            | /  | /   | /                               | /   | /   |
| <b>Atteintes cardiaques</b> | Œdèmes cardiaques, coeurs de taille réduite   | /                            | /  | /   | /                               | /   | /   |
| <b>Hypogonadisme</b>        | Survie jusqu'au stade adulte, reproduction possible   | Stérilité                    | Stérilité  | Stérilité                                     | Stérilité des drosophiles mâles | /   | /   |
| <b>Atteintes rénales</b>    | Dégradation intestinale, dilatation des tubules proximaux et distaux  | /                            | /  | /   | /                               | /   | /   |
| <b>Atteintes hépatiques</b> | /   | /                            | /  | /   | /                               | /   | /   |

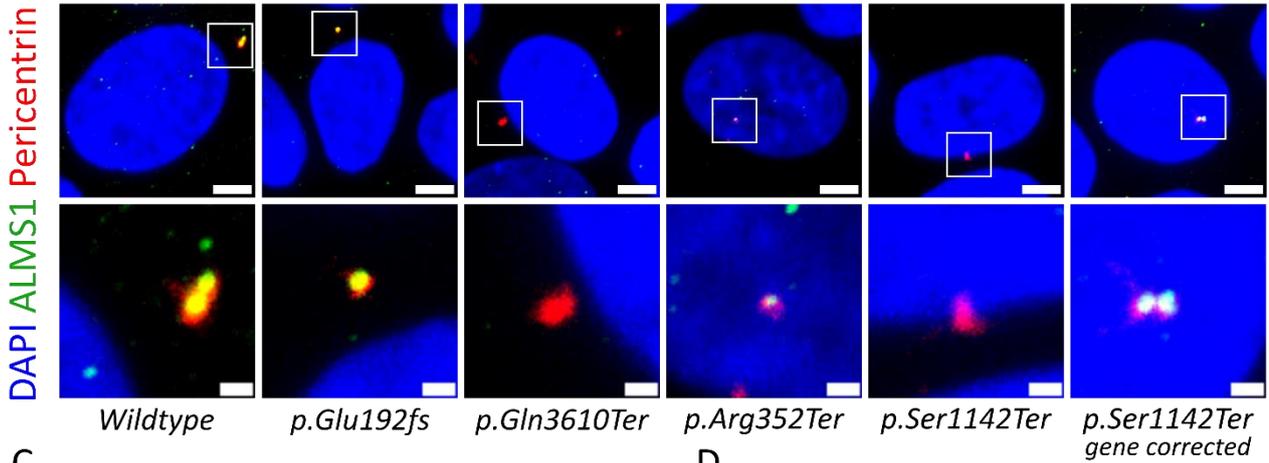
# Figure 1

A.

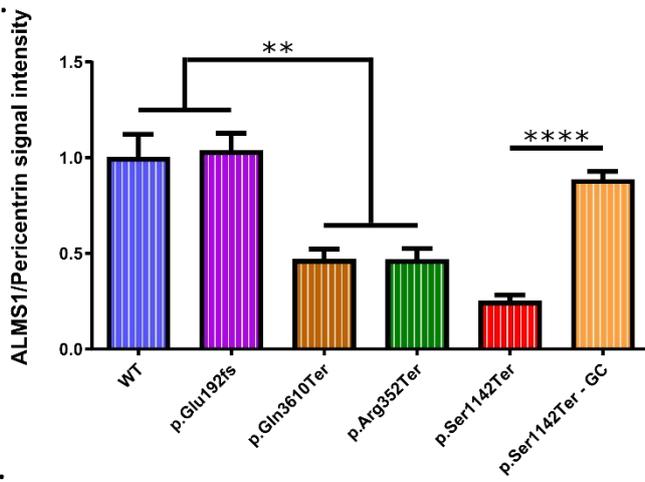
## ALMS1



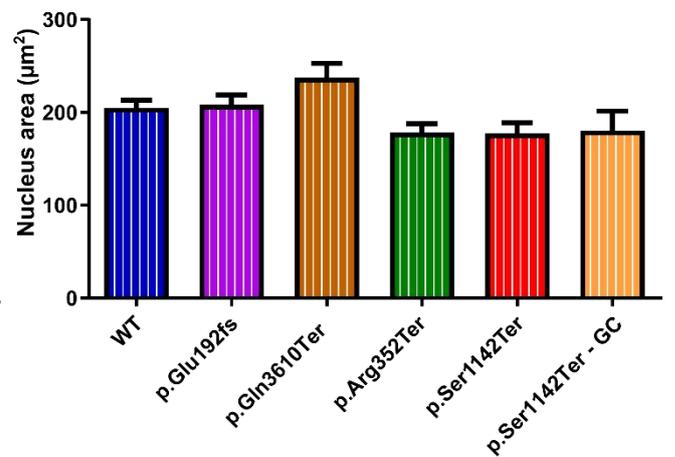
B.



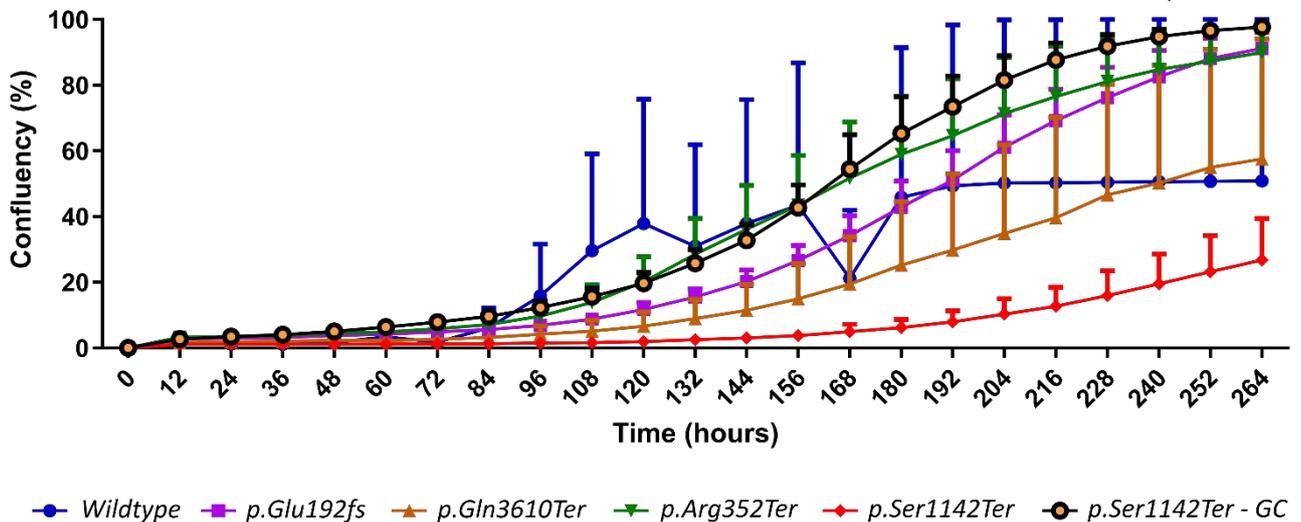
C.



D.

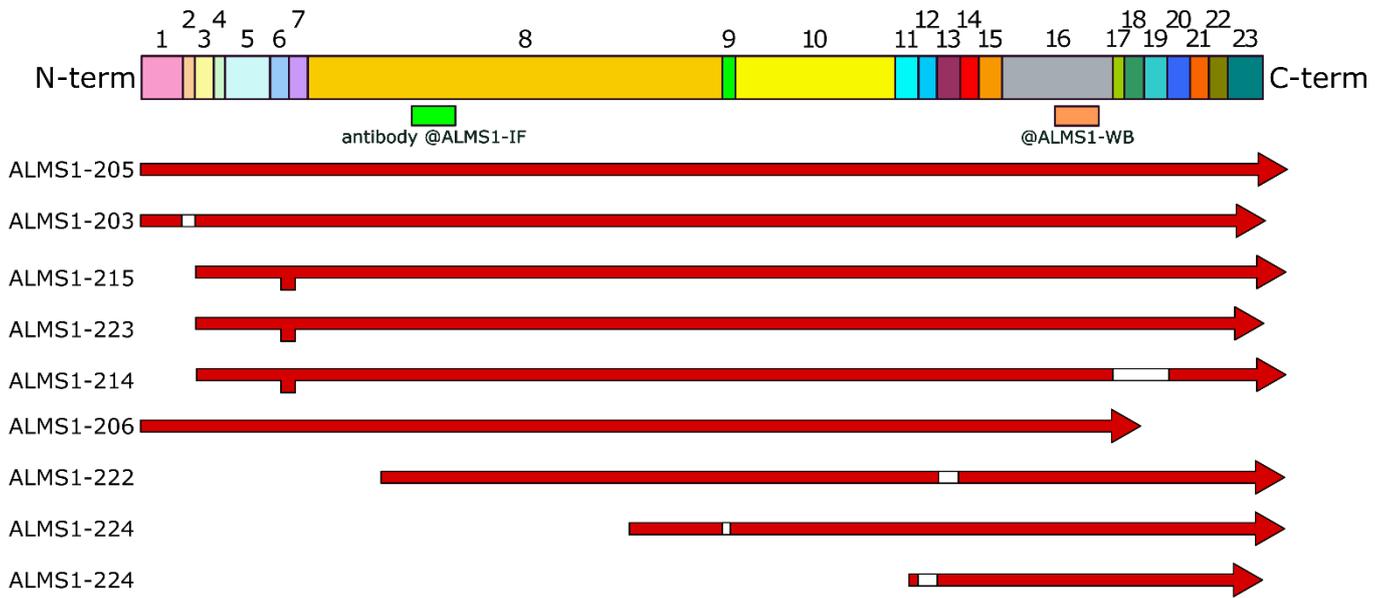


E.

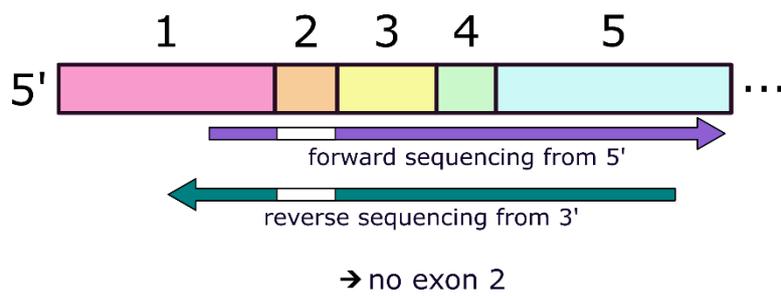


# Figure 2

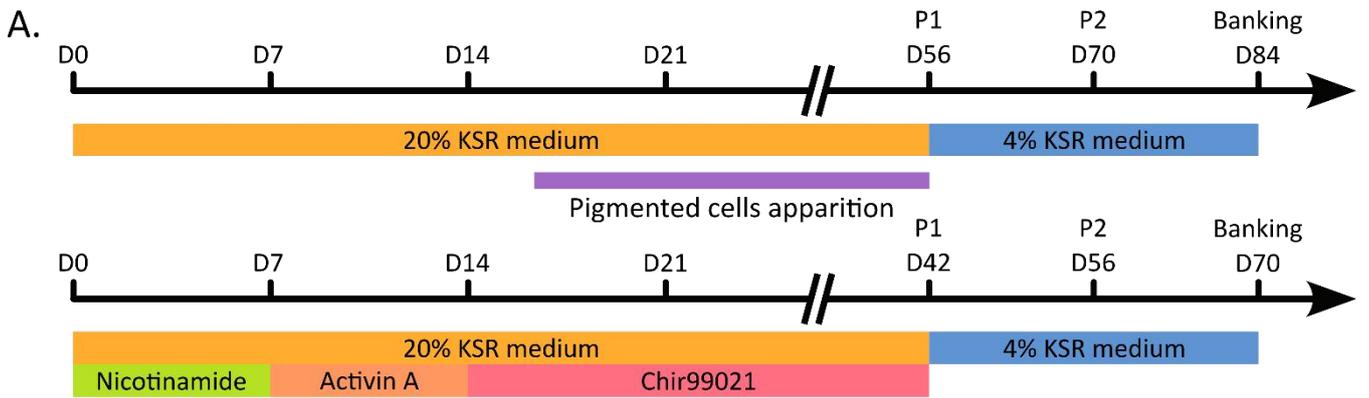
A.



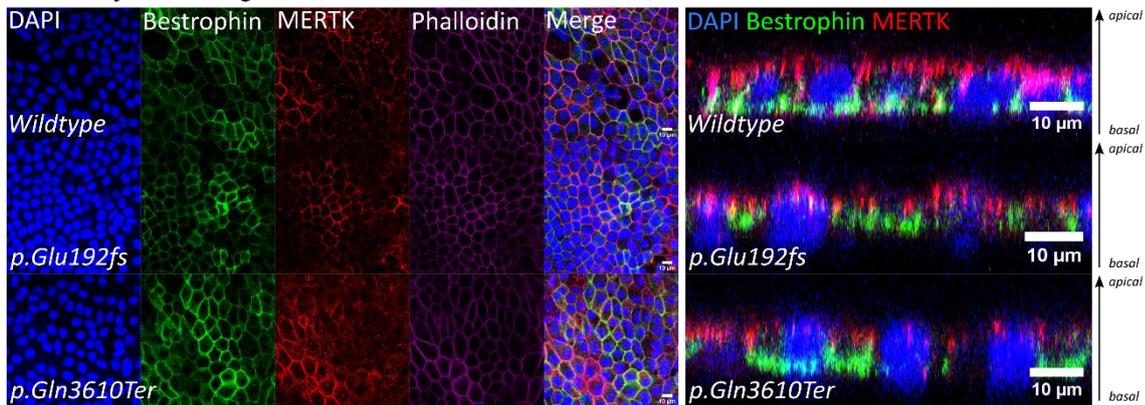
B.



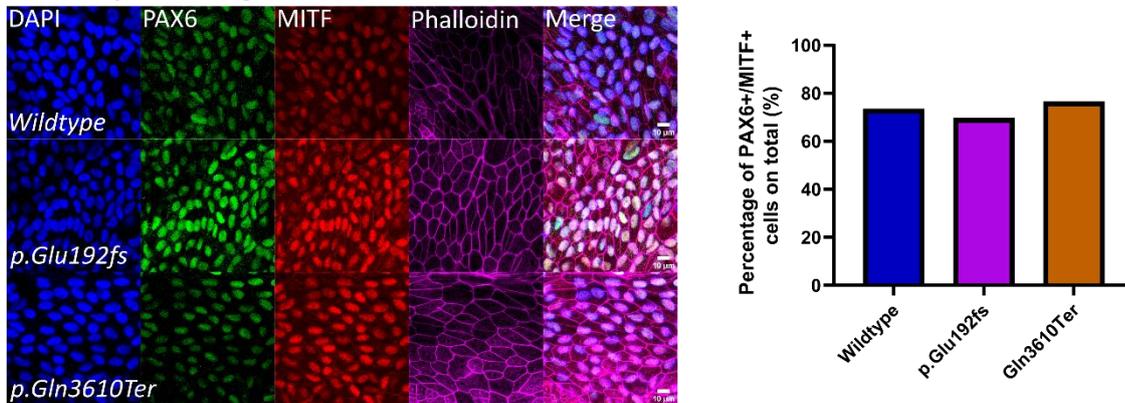
# Figure 3



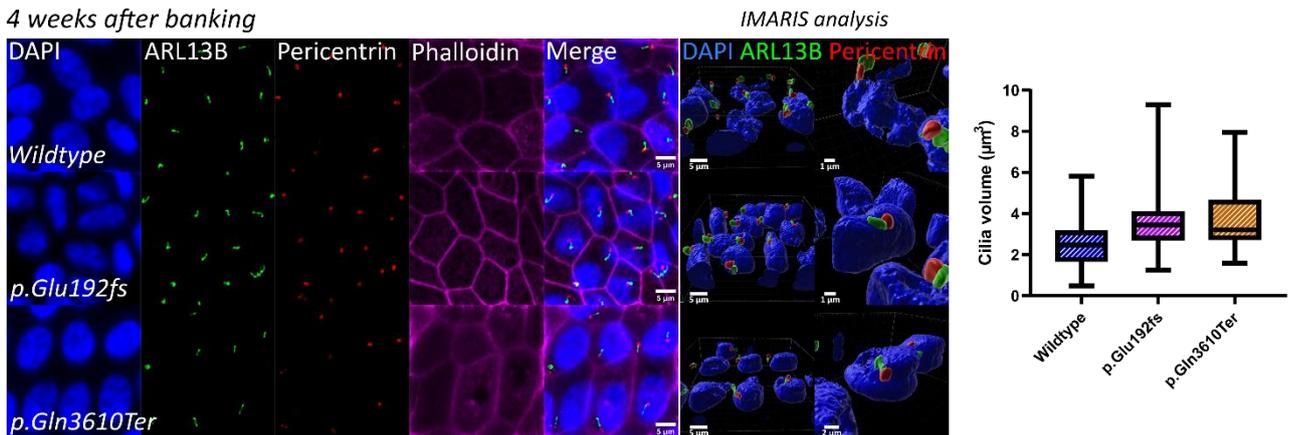
**B. 6 weeks after banking**



**C. 4 weeks after banking**

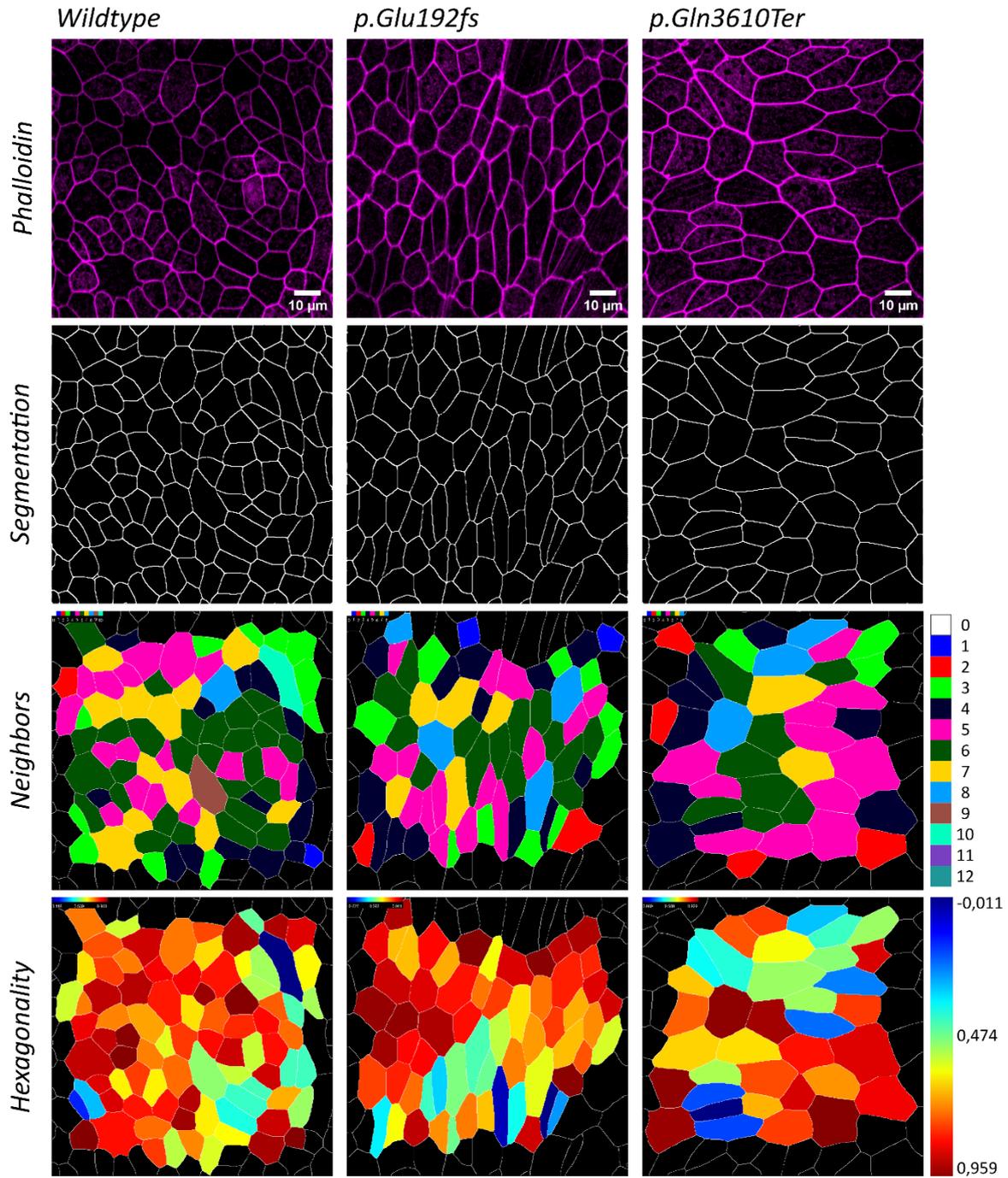


**D. 4 weeks after banking**

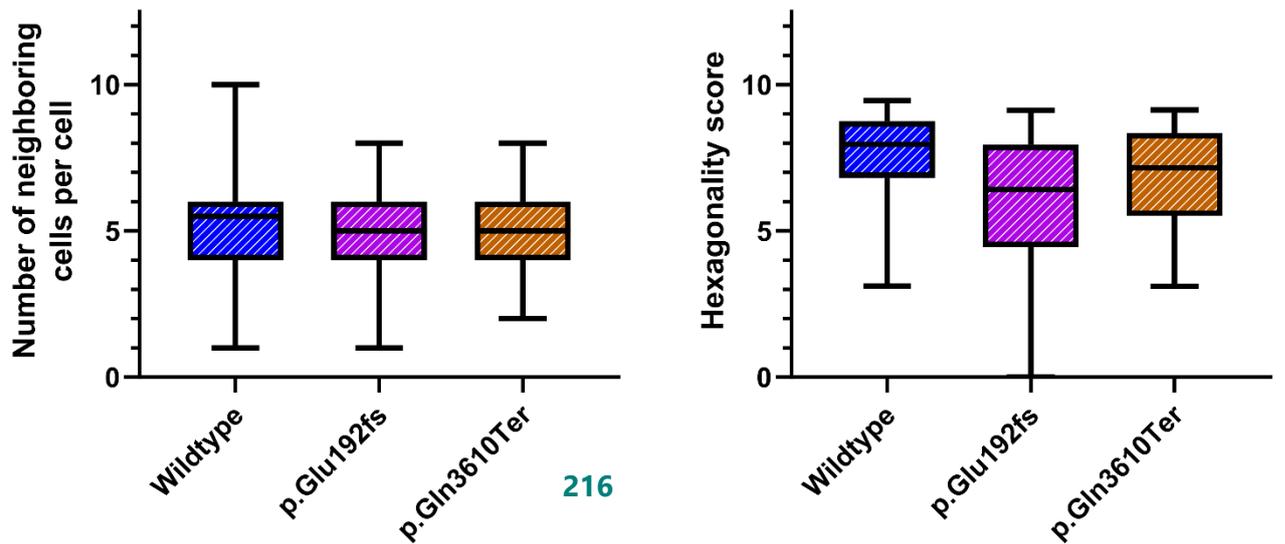


# Figure 4

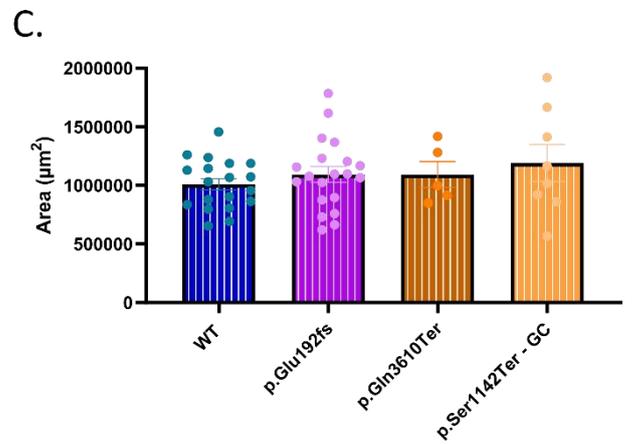
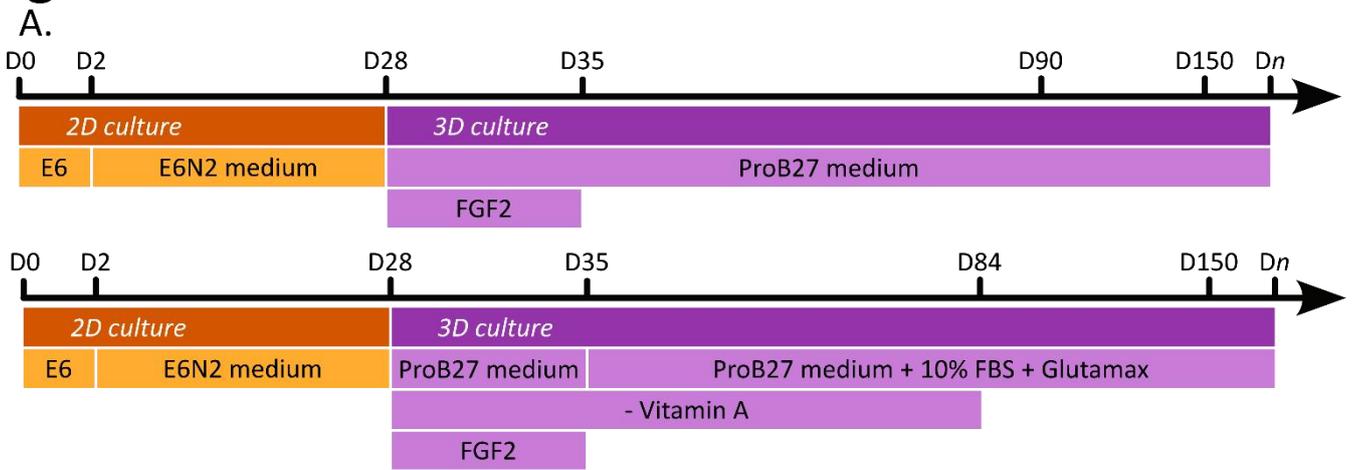
A.



B.

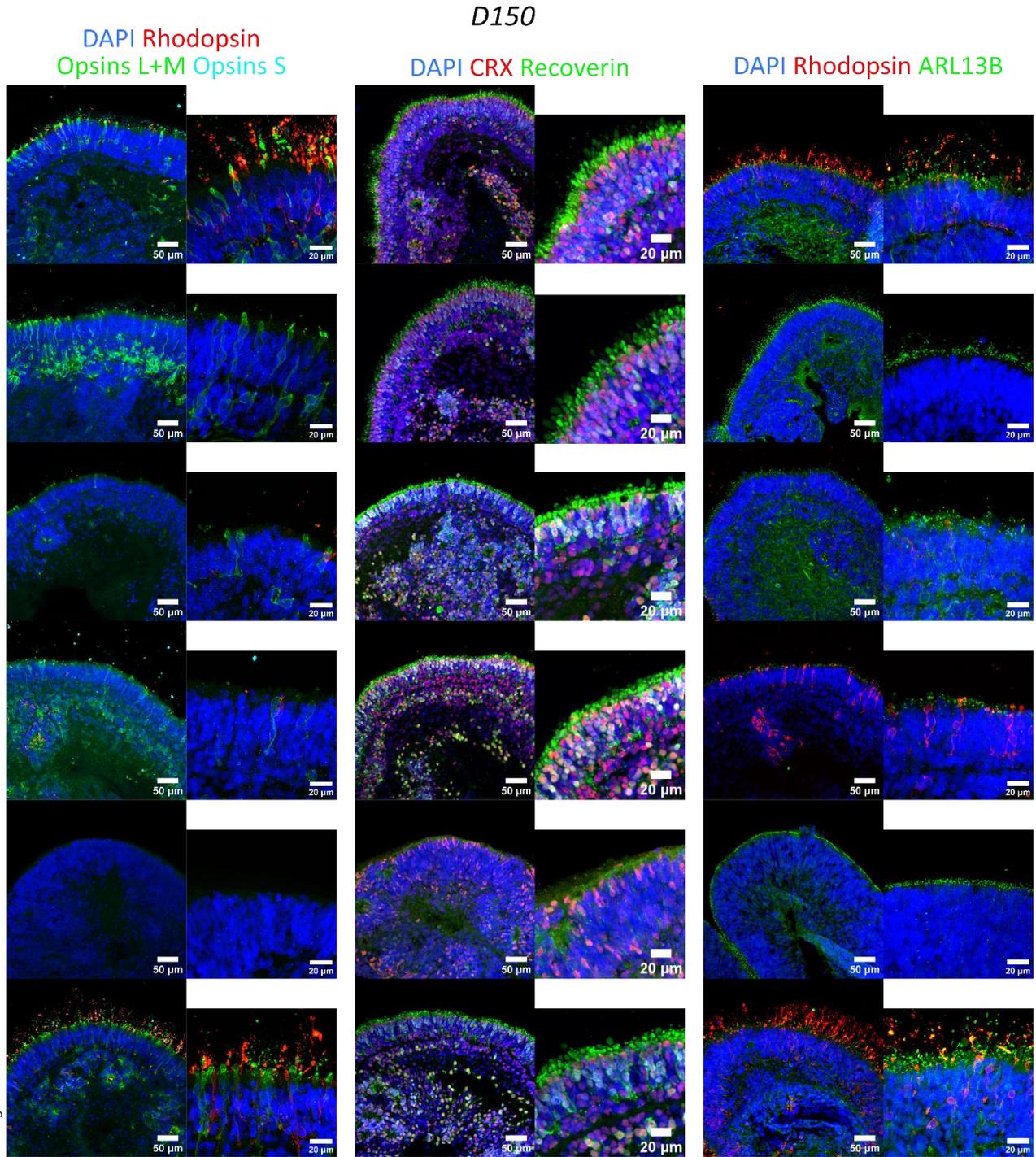


# Figure 5



# Figure 6

A.



B.

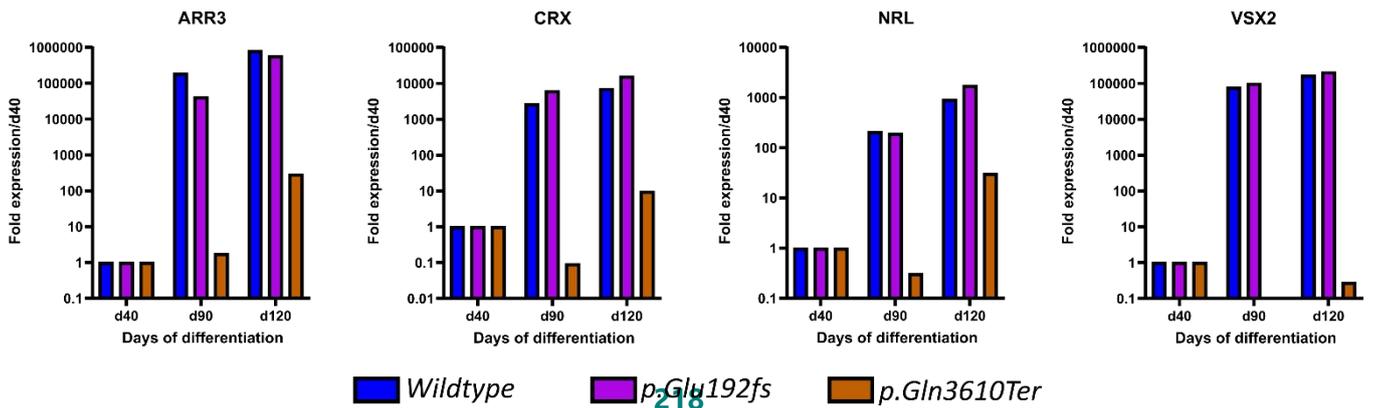
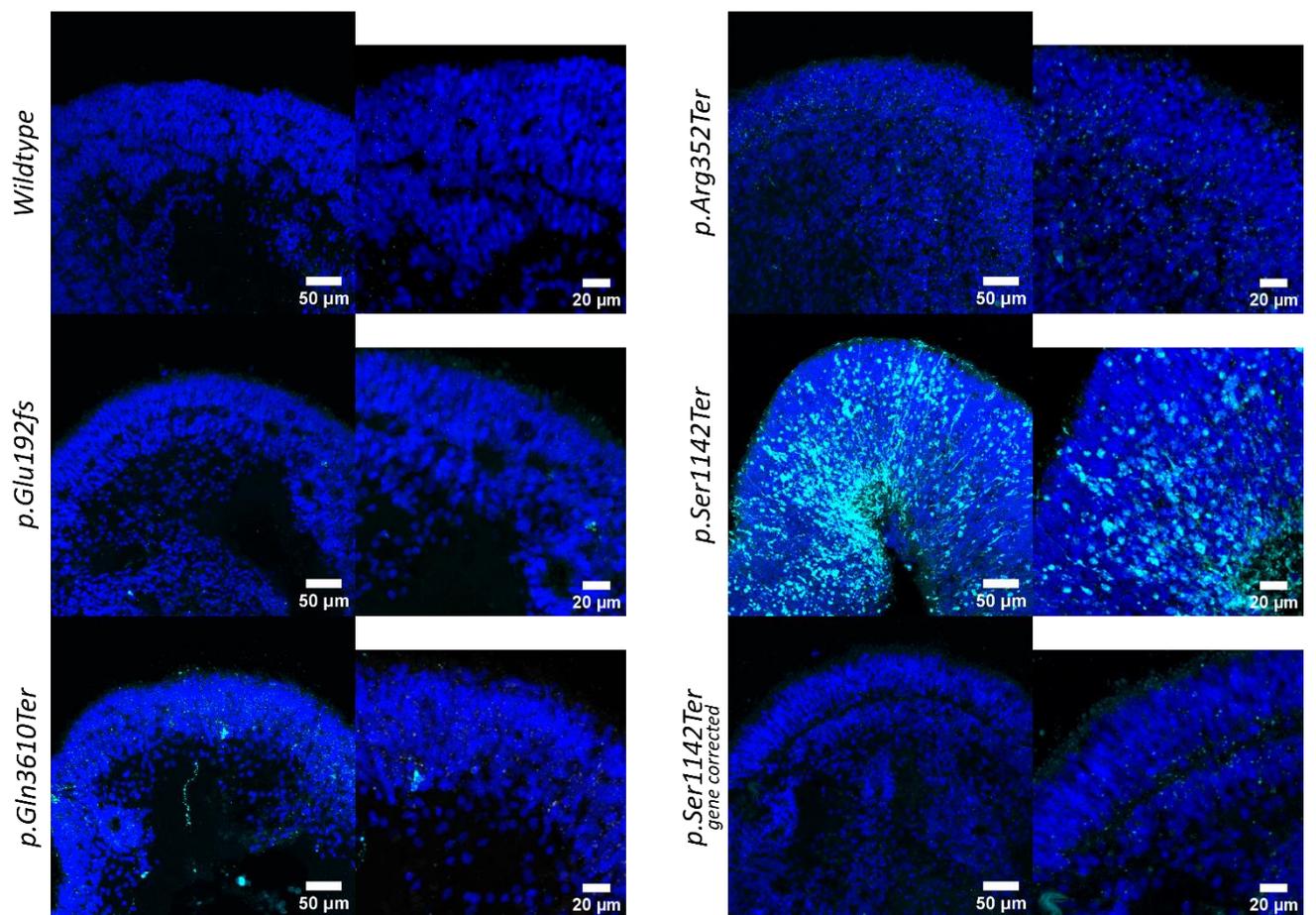


Figure 7

DAPI Cleaved Casp3





**Titre :** Modélisation du Syndrome d'Alström à partir de cellules souches pluripotentes humaines pour l'identification de cibles moléculaires d'intérêt thérapeutique.

**Mots clés :** Syndrome d'Alström, ciliopathie, CSPh, organoïdes neuro-rétiniens, CRISPR/Cas9, modélisation pathologique

**Résumé :** Le syndrome d'Alström (SA) est une maladie monogénique récessive multi-systémique, caractérisée notamment par une perte de l'audition et de la vue, une obésité, un diabète de type II, une cardiomyopathie et une insuffisance hépatique et rénale progressive. Les symptômes affectant la vision se développent dès les premières semaines après la naissance et mènent progressivement à une perte totale de la vue. À l'heure actuelle, aucun traitement ne permet de soigner cette maladie et seules des solutions permettant de réduire les effets des symptômes peuvent être proposées.

L'objet de la thèse est de mettre au point un modèle cellulaire du SA dans le but de comprendre les mécanismes moléculaires entraînant la maladie et d'identifier des cibles thérapeutiques.

Nous avons obtenu différents clones présentant des mutations pathologiques ou *de novo* à l'aide de systèmes d'édition génomique associés à CRISPR/Cas9. Nous avons caractérisé ces clones modèles en cherchant à identifier des marqueurs phénotypiques particuliers au sein des CSPih. Les mutations engendrées ne provoquent pas de changement des propriétés de ces cellules.

Dans un second temps, toujours dans le but d'identifier un phénotype pathologique, nous avons différencié les lignées de CSPih modèles en cellules de l'EPR.

Là encore, nous n'avons pas identifié de marqueur phénotypique spécifique. Enfin, nous avons différencié les lignées de CSPih modèles en organoïdes neuro-rétiniens afin d'étudier le développement des cellules rétiniennes au sein de ces structures avec une attention particulière apportée aux photorécepteurs. Nous avons ainsi pu constater une absence ou une réduction d'expression des opsines caractéristiques des cônes et des bâtonnets dans les organoïdes issus de CSPih mutées dans *ALMS1*. De plus, ces organoïdes présentent une mortalité cellulaire accrue par rapport aux organoïdes issus des lignées de CSPih saines. Ces éléments laissent penser que les photorécepteurs dégénèrent durant leur différenciation au sein des organoïdes. Les mécanismes par lesquels les mutations dans *ALMS1* entraînent cette dégénérescence ne sont pas élucidés à l'heure actuelle.

Les modèles cellulaires du SA présentés dans cette thèse reproduisent donc un phénotype pathologique et seront des outils précieux pour la compréhension des mécanismes responsables des symptômes visuels de la maladie et pavent la voie à des stratégies de criblage visant à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.