



HAL
open science

Les organoïdes cérébraux : nouvelle plateforme pour la modélisation de pathologies neurodéveloppementales et neurodégénératives

Ambre Leleu

► To cite this version:

Ambre Leleu. Les organoïdes cérébraux : nouvelle plateforme pour la modélisation de pathologies neurodéveloppementales et neurodégénératives. Biologie cellulaire. Université Paris-Saclay, 2024. Français. NNT : 2024UPASL110 . tel-04906627

HAL Id: tel-04906627

<https://theses.hal.science/tel-04906627v1>

Submitted on 22 Jan 2025

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.

Les organoïdes cérébraux : nouvelle plateforme pour la modélisation de pathologies neurodéveloppementales et neurodégénératives

Cerebral organoids: new platform for modeling neurodevelopmental and neurodegenerative pathologies

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 568, signalisations et réseaux intégratifs en biologie
(Biosigne)

Spécialité : Biologie moléculaire et cellulaire

Graduate School: Life Sciences and Health.

Référent: Faculté de médecine

Thèse préparée dans le service **Service d'Etude des Prions et Infections Atypiques (SEPIA)**, (CEA, Université Paris Saclay), sous la direction de **Jean-Philippe DESLYS**, directeur du Laboratoire d'innovation diagnostique et thérapeutique (LIDT) du SEPIA (CEA), et du co-encadrement de **Frank YATES**, Responsable de l'équipe CellTechs (SupBiotech).

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 19 décembre 2024, par

Ambre LELEU

Composition du Jury

Membres du jury avec voix délibérative

Christelle MONVILLE

PR Université d'Evry-Val-d'Essonne,
UMR861

Présidente

Nathalie JANEL

PR Université Paris Cité, UMR 8251

Rapportrice & Examinatrice

Vincent EL GHOUZZI

CR INSERM, Hôpital Robert Debré,
Université Paris Cité

Rapporteur & Examineur

Emmanuel NIVET

DR CNRS, Université Aix-Marseille

Examineur

Titre : Les organoïdes cérébraux : nouvelle plateforme pour la modélisation de pathologies neurodéveloppementales et neurodégénératives

Mots clefs : Organoïdes cérébraux, iPSCs, syndrome MARCH, maladie d'Alzheimer, maturation

Résumé : Les désordres du système nerveux central sont des pathologies qui peuvent se développer dès le neurodéveloppement du fœtus jusqu'à la mort de l'individu. La capacité d'évaluer la façon dont les cellules humaines reprogrammées (iPSCs) peuvent se développer et s'autoorganiser en trois dimensions en se transformant en organoïdes cérébraux a le potentiel de révolutionner notre approche à la fois de la recherche scientifique fondamentale et du traitement des maladies neurologiques humaines qui s'avèrent désormais comme la première cause de morbidité mondiale

Nous avons exploré ce potentiel pour modéliser deux de ces pathologies : le syndrome MARCH, un syndrome neurodéveloppemental caractérisé par une hydranencéphalie, et la maladie d'Alzheimer, pathologie neurodégénérative. Nous décrivons la mise en place de ces modèles pathologiques ainsi que leurs avantages pour reproduire les symptômes physiopathologiques associés, tout en soulignant les limites inhérentes à l'utilisation de cellules souches pluripotentes pour modéliser ces pathologies complexes.

Title: Cerebral organoids: a new platform for modeling neurodevelopmental and neurodegenerative pathologies

Keywords: Cerebral organoids, iPSCs, MARCH syndrome, Alzheimer disease, maturation

Abstract: Central nervous system disorders are pathologies that can develop from fetal neurodevelopment through to individual death. The ability to assess how reprogrammed human cells (iPSCs) can develop and self-organize in three dimensions into brain organoids has the potential to revolutionize our approach to both basic scientific research and the treatment of human neurological diseases, now emerging as the leading cause of overall disease burden in the world.

We have explored this potential to model two of these pathologies: MARCH syndrome, a neurodevelopmental syndrome characterized by hydranencephaly, and Alzheimer's disease, a neurodegenerative pathology. We describe the set-up of these pathological models and their advantages in reproducing the associated physiopathological symptoms, while highlighting the inherent limitations of using pluripotent stem cells to model these complex pathologies.

Table des matières

Table des matières	3
Remerciements	8
Liste des Abréviations	11
Liste des Figures	14
Liste des Tableaux	18
Introduction générale	19
Introduction	21
1. Les Pathologies neurologiques : des maladies neurodéveloppementales aux maladies neurodégénératives	24
1.1. Le syndrome de neurones multinucléés-anhydramnios-dysplasie rénale-hypoplasie cérébelleuse-hydranencéphalie (MARCH)	25
1.1.1. Introduction du syndrome	25
1.1.2. Centrosomal protein 55 (CEP55)	27
1.1.3. Modèles pathologiques <i>in vivo</i>	29
1.2. Le cycle cellulaire	32
1.2.1. Introduction	32
1.2.2. La Mitose	34
1.2.3. Régulateurs du cycle cellulaire	35
1.2.4. Cytocinèse	37
1.3. Maladie d'Alzheimer	39
1.3.1. Introduction	39
1.3.2. Protéinopathies : agrégation protéique dans les désordres du système nerveux central	41
1.3.3. Evolution de la maladie	44
1.3.4. Protéines impliquées dans la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer	46
1.3.4.1. Protéine précurseur de l'amyloïde (APP)	46
1.3.4.2. Préséniline 1 et présélinine 2 (PSEN1/PSEN2)	51
1.3.4.3. Protéine associée aux microtubules tau (MAPT)	51
1.3.5. Théories de genèse et propagation de la maladie d'Alzheimer	54
1.3.5.1. La théorie cascade bêta-amyloïde	54
1.3.5.2. La théorie de la protéine Tau	55
1.3.5.3. Alzheimer et le cycle cellulaire	56

1.3.5.3.1.	Dynamique du cytosquelette pendant le cycle cellulaire	56
1.3.5.3.2.	La théorie de l'implication du cycle cellulaire dans la maladie d'Alzheimer	57
1.3.6.	Lien entre maladie d'Alzheimer et syndrome de Down (Trisomie 21)	62
1.3.7.	Les facteurs environnementaux impliqués dans la maladie d'Alzheimer	63
1.3.7.1.	Introduction	63
1.3.7.2.	Aftin-5	65
2.	Cellules souches pluripotentes	68
2.1.	Introduction	68
2.2.	Cellules souches embryonnaires et cellules souches pluripotentes induites	68
2.2.1.	Contexte historique	68
2.2.2.	Reprogrammation de cellules différenciées en cellules souches pluripotentes induites (iPSCs)	70
2.2.2.1.	Rôles des différents facteurs de reprogrammation	70
2.2.2.2.	Techniques de reprogrammation	72
2.2.2.3.	Conditions de culture des iPSCs	74
2.2.2.4.	Caractérisation des iPSCs	75
3.	Modélisation de pathologies neurologiques	76
3.1.	Technologie CRISPR-Cas9	76
3.2.	Lignées tumorales humaines	78
3.3.	Modèles de neurones en 2D	79
3.4.	Modèles en 3D	82
3.4.1.	Sphéroïdes et organoïdes cérébraux	82
3.4.2.	Assembloïdes	84
	<i>Problématique et objectifs</i>	87
	<i>Résultats</i>	90
1.	Modélisation d'une pathologie neurodéveloppementale : le Syndrome MARCH	90
1.1.	Génération des lignées cellulaires saines, MARCH et corrigées	90
1.1.1.	Génération de lignées contrôles	90
1.1.1.1.	Objectif	90
1.1.1.2.	Génération d'un modèle iPSC	90
1.1.1.3.	Matériel et méthode	91
1.1.1.3.1.	Origine des AFC sain et pathologiques et déclaration éthique	91

1.1.1.3.2.	Génération de cellules souches pluripotentes induites humaines	92
1.1.1.3.3.	Différenciation dans les trois feuilletts embryonnaires	93
1.1.1.3.4.	Marquage par immunofluorescence	93
1.1.1.3.6.	Isolation d'ADN et analyse du SNP	93
1.1.1.3.7.	Extraction d'ARN et analyses RT-PCR	94
1.1.1.3.8.	Détection de mycoplasmes	94
1.1.1.3.9.	Test de l'identité des lignées cellulaires	94
1.1.2.	Génération des lignées corrigées à l'aide de l'outil CRISPR-Cas9	108
1.1.2.1.	Introduction	108
1.1.2.2.	Stratégie développée	108
1.2.	Génération des organoïdes cérébraux sains, MARCH et corrigés	111
1.2.1.	Matériel et méthode	111
1.2.1.1.	Protocole de génération d'organoïdes cérébraux	111
1.2.1.2.	Suivi de croissance	112
1.2.1.3.	Cryopréservation et coupes d'organoïdes cérébraux	112
1.2.1.4.	Immunomarquages	112
1.2.1.5.	Différenciation des iPSCs en cardiomyocytes	114
1.2.2.	Résultats : génération d'organoïdes sains et MARCH	115
1.2.2.1.	Caractérisation et comparaison des organoïdes cérébraux sains et MARCH	115
1.2.2.2.	Résultats des productions d'organoïdes cérébraux MARCH corrigés	125
1.3.	Caractérisation des effets physiopathologiques du syndrome MARCH sur un autre type tissulaire : cardiomyocytes	128
1.4.	Conclusion générale	130

2.	Modélisation d'une pathologie neurodégénérative : la maladie d'Alzheimer	131
2.1.	Lignées cellulaires contrôle et mutées Alzheimer	131
2.2.	Développement de méthode et d'outils pour la caractérisation fonctionnelle des organoïdes cérébraux	134
2.2.1.	Etablissement d'un modèle de neurones en 2 dimensions	135
2.2.1.1.	Génération de neurones 2D à partir d'iPSCs et de cellules progénitrices neurales	135
2.2.1.1.1.	Matériel et méthode	135
2.2.1.1.1.1.	Génération des NPCs à partir d'iPSCs	135
2.2.1.1.1.2.	Différenciation des NPCs en neurones	136
2.2.1.1.1.3.	Culture des NPCs	136

2.2.1.1.2.	Résultats de la différenciation des iPSCs en neurones 2D	137
2.2.1.2.	Développement d'un protocole de neurone en 2D à l'aide de la protéine neurogénine 2.....	139
2.2.1.2.1.	Matériel et méthode.....	139
2.2.1.2.1.1.	Plasmides.....	140
2.2.1.2.1.2.	Préparation de plasmides.....	140
2.2.1.2.1.3.	Production des vecteurs lentiviraux et infections	141
2.2.1.2.1.4.	Extraction d'ARN	141
2.2.1.2.1.5.	RT-PCR.....	142
2.2.1.2.2.	Génération et caractérisation des neurones en 2D générés par l'expression de neurogénine 2	142
2.2.2.	Suivi du flux calcique à l'aide de sonde.....	147
2.2.2.1.	Test Fluo-4	147
2.2.2.1.1.	Matériel et méthode.....	147
2.2.2.1.2.	Résultats	147
2.2.2.2.	Mise au point de la sonde GCaMP8m	150
2.2.2.2.1.	Matériel et méthode.....	150
2.2.2.2.1.1.	Culture de neurones en 2D infectée par AAV GCaMP	150
2.2.2.2.1.2.	Organoïdes cérébraux infectés par des AAV GCaMP	150
2.2.2.2.2.	Résultats des infections AAV GCaMP sur neurones en 2D	151
2.2.2.2.3.	Résultats des infections AAV GCaMP sur les organoïdes cérébraux	154
2.2.3.	Génération de lignées rapportrices	156
2.2.3.1.	Introduction.....	156
2.2.3.2.	CRISPR-Cas9 au sein du locus AAVS1	157
2.2.3.2.1.	Matériel et méthode.....	157
2.2.3.2.1.1.	Plasmides utilisés et lignées cellulaires	157
2.2.3.2.1.2.	Préparation de plasmides.....	158
2.2.3.2.1.3.	Transfection cellulaire.....	158
2.2.3.2.2.	Obtention des lignées tumorales AAVS1	158
2.2.3.3.	Stratégie de développement du modèle rapporteur iPSC- GCaMP	161
2.2.4.	Mise au point d'un protocole d'utilisation du MEA.....	162
2.2.4.1.	Matériel et méthode.....	162
2.2.4.2.	Développement du protocole de MEA.....	163
2.3.	Adaptation du protocole d'organoïdes corticaux.....	170
2.3.1.	Limites du protocole d'organoïdes cérébraux Lancaster	170

2.3.2.	Développement et mise au point d'organoïdes corticaux	171
2.4.	Mise en place d'un modèle cortical pour la maladie d'Alzheimer	172
2.4.1.	Matériel et méthode	172
2.4.1.1.	Suivi de croissance	172
2.4.1.2.	Fixation et préparation des échantillons pour des immunofluorescences	173
2.4.1.3.	Immunofluorescence	173
2.4.2.	Caractérisation des organoïdes corticaux.....	174
2.4.3.	Traitement des organoïdes corticaux avec Aftin-5.....	179
2.4.4.	Conclusion générale.....	187
	Discussion	189
	1. Modélisation d'une pathologie neurodéveloppementale : le syndrome MARCH	189
	2. Modélisation d'une pathologie neurodégénérative : la maladie d'Alzheimer.....	191
2.1.	Caractérisation fonctionnelle des organoïdes cérébraux	194
2.1.1.	Suivi du flux calcique.....	194
2.1.2.	Utilisation d'un dispositif MEA pour suivre la maturation des organoïdes cérébraux.....	195
2.2.	Limites du modèle organoïde cérébral	196
2.2.1.	Développement de systèmes micro-fluidiques	196
2.2.2.	Complexification du modèle d'organoïde cérébral.....	199
2.2.2.1.	Microglie	200
2.2.2.2.	Vascularisation.....	201
2.2.2.3.	Assembloïdes	203
2.3.	La maladie d'Alzheimer : une maladie multifactorielle.....	204
2.3.1.	Implication du fond génétique d'un individu dans la maladie d'Alzheimer.....	205
2.3.2.	Utilisation de molécules pour induire la maladie d'Alzheimer.....	206
2.3.3.	L'implication du vieillissement dans le développement de la maladie d'Alzheimer.....	207
2.4.	L'identification de mécanismes générant la pathologie.....	208
	Conclusion et perspectives	210
	Comparaison de l'utilisation des organoïdes cérébraux pour modéliser des maladies neurodéveloppementales et des maladies neurodégénératives	210
	Bibliographie	214
	Annexe	243

Remerciements

Arrivée à la fin de ce long et périlleux voyage, je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué à la réussite de ce projet.

Je remercie d'abord tout particulièrement mon directeur de thèse, Jean-Philippe Deslys, et mon co-encadrant, Frank Yates, pour ce travail sur un sujet passionnant, pour leur soutien et leur disponibilité durant ces quatre années.

Mes remerciements vont également à Vanessa Proux, directrice générale de SupBiotech, qui a cru en moi et m'a permis d'aller au-delà de mon diplôme d'Ingénieurs en Biotechnologies de SupBiotech en m'offrant la possibilité de faire cette thèse.

Je tiens également à exprimer ma sincère gratitude à Cécile Martinat et Emmanuel Nivet, pour avoir consacré de leur temps et apporté leur expertise pour m'aider à avancer durant cette thèse. Un grand merci également à la présidente de mon jury, Christelle Monville, ainsi qu'aux membres de mon jury, Emmanuel Nivet, Nathalie Janel et Vincent El Ghouzzi. Je tiens à remercier tout particulièrement mes rapporteurs, Nathalie Janel et Vincent El Ghouzzi, pour leurs commentaires et leurs remarques précieuses sur mon manuscrit.

J'exprime ma sincère reconnaissance à mes stagiaires, Agathe, Axelle et Aelin, pour leur travail de grande qualité et leur dévouement pour m'aider à avancer dans ce voyage parfois ardu. Leurs contributions ont été remarquables et laisseront un impact durable.

Je tiens également à remercier chaleureusement Mikaël Boullé. La collaboration que tu as établi entre nos deux équipes a été fructueuse à tout point de vue. Tu as été pour moi un collaborateur d'exception, toujours à l'écoute et disponible. Nos discussions ont toujours été source d'un grand apprentissage et ton humanité a rendu mon expérience de thèse plus facile. Un grand merci aux autres collaborateurs Fabrice Agou, Siham Schacre, Nathalie Lefort et Céline Banal qui ont également permis que l'aventure soit aussi belle.

Merci également aux collaborateurs de l'équipe Quantum and Molecular Photonics Laboratory dirigé par François Treussart. Une pensée plus particulière pour Steve et Fabienne avec qui j'ai eu la chance de collaborer pour la partie MEA. Devant de nombreux échecs, merci Fabienne pour ta bonne humeur, ta positivité

et les discussions que nous avons eues qui ont permis de rendre ce travail plus facile.

Merci à toute l'équipe du SEPIA qui nous accueille au CEA. Merci à Emmanuel pour toutes nos discussions, l'aide que tu as pu m'apporter et pour m'avoir fait découvrir un peu plus en profondeur le monde des prions notamment grâce aux journées Prions. Merci infiniment Jérôme pour ton écoute, ta bienveillance et tes qualités de couteau-suisse, qui ont adouci cette expérience dans ce fameux bâtiment 60. Merci également à Vincent, Anne, Dolorès, Mme Mikol, Alexandre, Axel, Quentin et Marine pour leur bonne humeur quotidienne, les fous rires et les petits verres.

Enfin, mille mercis à mon équipe CellTechs qui a été là au quotidien, Lucie, Thomas, Elise, Pierre-Antoine et Héloïse. J'espère que Pierre-Antoine n'oubliera pas que les panneaux de signalisation sont dangereux et qu'il faut manger du popcorn avec modération. Lucie, à tes « non-chutes » lors de notre séjour au ski. Lucie et Hélo, à nos ménages endiablés (qui je l'espère auront revisité la chose pour longtemps). Thomas, merci pour le co-encadrement de « nos petits » pas toujours évident mais toujours fait dans la bonne humeur. Elise, pour les perles de tes étudiants qui nous ont valu bien des fous rires. Merci à Elena et Marta avec qui j'ai eu la chance de partager une partie de l'aventure « Thèse ».

Ce voyage qu'est la thèse n'est pas un long fleuve tranquille. Je souhaite également remercier toutes les personnes qui m'ont portée et m'ont permis de garder la tête hors de l'eau en dehors de cette activité de thèse.

Mes petites fées du mardi, Alex, Manon, Delphine, Margaux, Sarah et Nabilla qui sont des femmes d'exception. Merci pour votre écoute, votre bienveillance et votre soutien sans faille. Merci à celle qui nous a permis de nous surpasser et de nous faire évoluer. J'étais venue tester un sport et j'ai gagné des amies en or, Olivia, merci pour cela !

Merci à mes amis et amies d'exception, Valentina pour ton soutien si particulier et nos discussions sans fin. Ma Mary, ma copine de galère, de fous rires, de larmes aussi, Docteure un mois avant moi, notre amitié est scellée depuis de nombreuses années d'années. Merci à Yanou, Sophie, Roro, Maxou, Max, Constance, et la bande du lycée d'avoir rendu quelques soirées de cette thèse exceptionnelles.

Merci à TOUTE MA FAMILLE qui, malgré mes sautes d'humeur, mes découragements et parfois ma « non-disponibilité », a toujours cru en moi et a été constamment à mes côtés. Vous m'avez toujours donné la force de continuer et

ce travail est donc également un peu le vôtre. Maman, merci d'être la femme exceptionnelle, forte et courageuse que tu es, j'espère te rendre fière. Alo, merci pour toutes les « private jokes » envoyées au quotidien, je t'aime. A tous ceux qui sont partis trop tôt, et sans qui, ce travail n'aurait pas pu exister.

Je terminerai par remercier les quantités de tomates cerises mangées qui m'ont apporté soutien et réconfort, le chocolat noir que j'aime à la folie et les récoltes des xicoies, couteaux, noix, pommes ainsi que les fruits et légumes du jardin de mamie qui m'ont permis de rester en forme.

Liste des Abréviations

α -Syn : alpha-synucléine
 β -CTF : béta C-terminal
 $A\beta$: amyloïde béta
AAV : adéno virus associé
AAVS1 : site d'intégration 1 AAV
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
AFC : cellules primaires du liquide amniotique
Aftin. : molécules inductrices de l'amyloïde béta quarante-deux (*Amyloid- β Forty-Two Inducers*)
AICD : domaine intracellulaire de la protéine précurseur de l'amyloïde (*Amyloid precursor protein intracellular domain*)
APC/C : complexe promouvant l'anaphase/Cyclosome
APH-1 : anterior pharynx-defective 1
ApoE : Apolipoprotéine E
APP : protéine précurseur de l'amyloïde
ARN : acide ribonucléique
ARNc : ARN CRISPR
AVCI : années de vie corrigées de l'incapacité
AVI : années vécues avec une incapacité
AVP : années de vie perdues
BACE1 : Enzyme de clivage APP β -site 1
BNLC : banque nationale de lignée cellulaire d'Espagne
cAMP : APM cyclique
Cas : protéine associée à CRISPR
CDK : kinase cycline dépendante (*cyclin dependant-kinase*)
CKI : inhibiteur de kinase cycline dépendante
CE : carcinome embryonnaire
CEP55 : protéine centrosomale 55
c-Myc : Cellular-Myelocytomatosis
CRISPR : *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*
DBS : coupures doubles brins
DFT : démence fronto-temporales
DMSO : diméthylsulfoxyde
DNF : dégénérescence neurofibrillaire
DPC : division prématurée du centrosome
DUB : domaine d'ubiquitination

EB : corps embryoïde (*embryoid body*)
ECH : exposome chimique humain
EDTA : acide éthylènediaminetétraacétique
EHS : Engelbreth-Holm-Swarm
ES : cellule souche embryonnaire
ESCRT : endosomal sorting complexes required for transport
F-actine : filament d'actine
FWD : forward
G-actine : actine globulaire
GCaMP : GFP-based Calcium Indicators
GFP : protéine fluorescente verte (*green fluorescent protein*)
GSK3 : glycogène synthase kinase 3
HDR : réparation dirigée homologue
HSV : virus hémagglutinant du Japon
hSyn : synapsine humaine
hTERT : télomérase humaine
HUVEC : cellules endothéliales humaines
IHC : immunohistochimie
iPSCs: cellules souches pluripotentes induites (*induced pluripotent stem cells*)
Klf4 : Krüppel-like factor 4
LCR : liquide céphalorachidien
MA : Maladie d'Alzheimer
MAD2 : *Mitotic Arrest Deicient 2-like protein*
MARCH : neurone Multinuclés, Anhydramnios, dysplasie Rénale, hypoplasie Cérébelleuse, Hydrancéphalie
MCI : masse cellulaire interne
MEA : réseau multi-électrodes (*multielectrode array*)
MEA-HD : MEA à haute densité
MEFs : fibroblastes embryonnaires murins
MOI : multiplicité de l'infection
MP : Maladie de Parkinson
N-cad : N-Cadhérine
nCas9 : nickase Cas9
NCSTN : nicastrine
NE : cellule neuroépithéliale
NEAA : acide aminé non essentiel
Ngn2 : Neurogénine 2
NHEJ : *Non homologous end-joining*
NOA : NEMO-Optineurine-ABIN
NPCs : cellule progénitrice neurale
OC : organoïde cérébral

l'OCT : *optimal cutting temperature*
PAM : motif adjacent au protospacer
PB : transposon PiggyBac
PBS : Phosphate buffered Saline
PCR : amplification en chaîne par polymérase (*polymerase chain reaction*)
PFA : paraformaldéhyde
PNH : primates non-humain
Pou5f1 (Oct3/4) : *POU-domain transcription factor*
PrP : protéine du prion
PSEN1 : préséniline 1
PSEN2. Préséniline 2
Rb : protéine du rétinoblastome
REV : reverse
RT : Rétrotranscriptase
SB : *Sleeping Beauty*
SD: Syndrome de Down
SeV : virus de Sendai
SKO : Sox2, Klf4, Oct3/4
SLA : sclérose latérale amyotrophique
SNC : système nerveux central
SOX2 : *Sex determining region Y- box transcription factor 2*
spCas9 : *streptococcus pyogenes* Cas9
SV40 : virus simien 40
Swe : swedish
T21 : Trisomie 21
TA : température ambiante
TALEN : *transcription activator-like effector nuclease*
tracrRNA : ARNc transactivateur
VHB : virus de l'hépatite B
VHC : virus de l'hépatite C
VIH : virus de l'immuno-déficience humaine
VL : ventricule latéral
ZF : doigt de zinc (*zinc finger*)
ZFN : nucléases à doigt de zinc
ZV : zone ventriculaire
ZSV : zone subventriculaire

Liste des Figures

Figure 1 : Phénotypes du système nerveux central dans le syndrome MARCH	25
Figure 2 : Représentation schématique des domaines structuraux de la protéine CEP55 humaine	28
Figure 3 : Développement craniofacial du poisson-zèbre	30
Figure 4 : Souris CEP55 knock-out viables	31
Figure 5 : Schéma représentation les divisions cellulaires symétriques et asymétriques au niveau cérébral	33
Figure 6 : Schéma du cycle cellulaire et de sa régulation.....	36
Figure 7 : Représentation schématique de l'abscission dans une cellule de mammifère.....	38
Figure 8 : Evolution du nombre de publications contenant <i>Alzheimer's disease</i> de 1913 à 2025.....	40
Figure 9 : Schéma du processus de l'agrégation protéique dans les protéinopathies	42
Figure 10 : Schéma de différentes protéines impliquées dans des protéinopathies	43
Figure 11 : Différentes fonctions cérébrales attribuées à la protéine APOE...	45
Figure 12 : Deux voies de maturation de l'amyloïde précurseur protéine (APP)	48
Figure 13 : Sites de phosphorylation dans le domaine cytoplasmique de APP695	49
Figure 14 : Représentation de la protéine APP.....	50
Figure 15 : Les six isoformes de la protéine Tau.....	53
Figure 16 : Schéma des relations des principales voies impliquées dans la maladie d'Alzheimer.....	56
Figure 17 : Causes et conséquences de la réactivation du cycle cellulaire dans les neurones matures et différenciés en tant que composante pathogène importante de la maladie d'Alzheimer.....	60
Figure 18 : Relation entre l'aneuploïdie des progéniteurs neuronaux (au cours du développement et dans le cerveau adulte) et les peptides A β toxiques dans la maladie d'Alzheimer et le syndrome de Down.....	61
Figure 19 : Principales voies de signalisation de la préséniline 1 (PS1) affectant l'embryogenèse et le cycle cellulaire.....	62
Figure 20 : Le vieillissement et l'exposome humain	64

Figure 21 : Structure du composé Roscovitine, l'Amyloid- β Forty-Two Inducers 4 et l'Amyloid- β Forty-Two Inducers 5.....	65
Figure 22 : L'induction chimique du clivage de APP <i>in vitro</i> augmente le ratio A β 42 et A β 42/A β 40 sans modifier les niveaux de A β 40.....	67
Figure 23 : Diverses sources cellulaires et stratégies de transfert pour la génération d'iPSCs.....	74
Figure 24 : CRISPR Cas 9 system	76
Figure 25 : Diagramme récapitulant les différentes voies de différenciation et d'obtention des cellules cérébrales à partir d'iPSCs.....	81
Figure 26 : Diagramme descriptif des différentes étapes de différenciation des iPSCs en organoïdes cérébraux entier du protocole de Lanster <i>et al.</i>	83
Figure 27 : Régionalisation cérébrale	84
Figure 28 : Panorama des modèles en cours de développement d'organoïdes et leurs potentielles applications.....	86
Figure 29 : Gène CEP55 avec la mutation S425* responsable du syndrome MARCH	108
Figure 30 : Diagramme du protocole de différenciation des iPSCs en cardiomyocytes.....	115
Figure 31 : Plan de manipulation de la première production d'organoïdes cérébraux.....	116
Figure 32 : Suivi de croissance de la première production des organoïdes cérébraux.....	117
Figure 33 : Images représentatives d'un marquage hématoxyline et éosine sur des organoïdes cérébraux générés à partir des trois clones MARCH et des trois clones contrôle.....	118
Figure 34 : Représentation illustrative de coupes histologiques d'organoïdes cérébraux marquées par immunofluorescence GFAP et β 3-tubuline.....	119
Figure 35 : Représentation illustrative de coupes histologiques d'organoïdes cérébraux marquées par immunofluorescence SOX2, β 3-Tubuline et N-cadhérine.	120
Figure 36 : Représentation illustrative de coupes histologiques d'organoïdes cérébraux marquées par immunofluorescence OTX1+2, PAX2 et PAX6	121
Figure 37 : Résumé des marquages d'immunofluorescence réalisé sur des coupes histologiques d'organoïdes sains et MARCH	123
Figure 38 : Représentation graphique de la taille, la surface ou la fréquence d'apparition de cils primaires sur des cellules PAX6 positives.....	124
Figure 39 : Représentation graphique de la taille, la surface ou la fréquence d'apparition de cils primaires sur des cellules N-cadhérine positives.	125
Figure 40 : Plan d'expérience des productions d'organoïdes cérébraux avec les clones révertés.....	126

Figure 41 : Suivi de croissance des deux productions avec les clones révertés	127
Figure 42 : Images représentatives d'un marquage hématoxyline et éosine sur des organoïdes cérébraux générés à partir des trois lignées CTRL MB, MARCH et KI MARCH.....	128
Figure 43 : Illustration représentative de cardiomyocytes des trois lignées, saine, MARCH et MARCH KI.....	130
Figure 44 : Vérification par séquençage de la présence des mutations Alzheimer	134
Figure 45 : Illustration représentative des différentes lignées iPSCs différenciées en NPCs puis en neurones.....	139
Figure 46 : Système neurogénine 2	139
Figure 47 : Gel de vérification des plasmides amplifiés après MaxiPrep.....	143
Figure 48 : Gel de vérification de l'expression des différents transgènes en absence de doxycycline au sein des iPSCs par RT-PCR.....	144
Figure 49 : Gel de vérification de l'expression des différents transgènes en présence de doxycycline au sein des iPSCs par RT-PCR	145
Figure 50 : Images représentatives de la différenciation en neurones 2D grâce à l'expression de la Neurogénine 2	147
Figure 51 : Images illustratives de l'imagerie calcique d'organoïdes corticaux	150
Figure 52 : Images illustratives de l'activité calcique des neurones en 2D en suivant la protéine GCaMP	154
Figure 53 : Stratégie expérimentale d'une transduction d'organoïde cérébrale avec des vecteurs AAV	154
Figure 54 : Images illustratives de la transduction d'un organoïde de la protéine GFP sous le contrôle du promoteur synapsine	155
Figure 55 : Images illustratives de l'activité calcique d'un organoïde cérébral non-guidé en suivant la protéine GCaMP8m	156
Figure 56 : Insertion de la protéine eGFP dans le locus AAVS1	160
Figure 57 : Design du transgène GCaMP8m	162
Figure 58 : Résultats d'un enregistrement MEA sur un organoïde WT-7889SA	166
Figure 59 : Résultat d'un enregistrement MEA sur un organoïde APP/PSEN1 Ki	167
Figure 60 : Représentation illustrative d'une analyse de transcriptomique spatiale d'un organoïde APP/PSEN1 Ki	169
Figure 61 : Frise récapitulative du protocole de génération d'organoïdes corticaux adaptés des protocoles (Xiang et al., 2017, 2019)	172
Figure 62 : Schéma explicatif de la réalisation et de la disposition des coupes d'organoïdes au cryostat	173

Figure 63 : Plan expérimental d'une production d'organoïdes corticaux sur 6 mois.....	175
Figure 64 : Suivi de croissance de production d'organoïdes corticaux sur 3 et 6 mois.....	176
Figure 65 : Images illustratives de caractérisation des organoïdes corticaux au cours du temps avec les marqueurs MAP2 et GFAP	177
Figure 66 : Images illustratives de l'évolution du marquage 6E10 par immunofluorescence sur des organoïdes corticaux WT-7889SA et APP/PSEN1 Ki au cours du temps.....	178
Figure 67 : Plan de manipulation pour la génération d'organoïdes corticaux traités avec de l'Aftin-5.....	179
Figure 68 : Images illustratives des marquages 6E10 et GFAP par immunofluorescence sur des organoïdes corticaux WT-7889SA et APP/PSEN1 Ki âgés de 2 mois	180
Figure 69 : Images illustratives du comptage des agrégats A β	181
Figure 70 : Résumé des résultats des immunofluorescences du marquage 6E10 réalisées sur les productions d'organoïdes corticaux WT-7889SA, APPKi, PSEN1 et APP/PSEN1 Ki traitées avec de l'Aftin-5.....	184
Figure 71 : Comparaison des données obtenues par immunofluorescence du marquage 6E10 entre les productions d'organoïdes corticaux WT-7889SA et APP/PSEN1 KI à 2 et 3 mois de culture	185
Figure 72 : Le knockdown de la protéine CEP55 induit une mort cellulaire dans les cellules progénitrices neurales au sein des organoïdes corticaux.....	190
Figure 73 : Résultats obtenus par d'autres équipes d'organoïdes cérébraux sur le MEA	196
Figure 74 : Représentation graphique des différents modèles existants.....	197
Figure 75: Représentation schématique des différents dispositifs micro-fluidiques existants	198
Figure 76 : Limites des protocoles organoïdes actuels	200
Figure 77 : Représentation des trois phénotypes microgliaux distincts	200
Figure 78 : Approche micro-fluidique pour obtenir un réseau vasculaire.....	201
Figure 79 : Schéma représentatif de la greffe d'organoïdes cérébraux au sein d'un cerveau murin	202
Figure 80 : Génération d'organoïdes de vascularisation et de cerveau fusionnés (fVBOs) avec une structure de barrière hémato-encéphalique (BHE).....	203
Figure 81 : Schéma représentatif de génération d'un assemloïde pour modéliser la jonction neuro-musculaire.....	204
Figure 82 : Graphique représentant l'augmentation de la production en fragment protéique A β -42 en fonction des différents composés pyrazole utilisés	207

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Différentes mutations identifiées provoquant le syndrome MARCH	27
Tableau 2 : Niveau d'expression des différents transcrits de MAPT par RT-qPCR dans différents tissus humains.....	54
Tableau 3 : Comparaison de la cytotoxicité des aftines 4 et 5.	66
Tableau 4 : Différentes souches de Cas9 avec leurs principales caractéristiques	78
Tableau 5 : Résumé des différents assembloïdes générés afin de modéliser des troubles cérébraux.....	85
Tableau 6 : Liste des guides ARN pour modifier le codon stop 425 en sérine	109
Tableau 7 : Liste des matrices de réparation pour modifier le codon stop 425 en sérine	110
Tableau 8 : Tableau récapitulatif des anticorps utilisés pour les immunofluorescences du projet MARCH	114
Tableau 9 : Tableau recensant le nombre de contractions de cardiomyocytes	129
Tableau 10 : Tableau récapitulatif des mutations des lignées Alzheimer.....	133
Tableau 11 : Liste des amorces utilisées pour réaliser les RT-PCR.....	142
Tableau 12 : Liste des primers utilisés pour la construction du plasmide bras d'homologie AAVS1-promoteur synapsine-GCaMP8m.....	161
Tableau 13 : Echantillons murins testés sur le MEA sur puce Stimulo 04	164
Tableau 14 : Tableau récapitulatif des anticorps utilisés pour les marquages des productions d'organoïdes corticaux Alzheimer	174
Tableau 15 : Tableau récapitulatif des différentes productions d'organoïdes générées	175
Tableau 16 : Tableau comparatif des caractéristiques physiopathologiques recherchées dans la modélisation du syndrome MARCH et la maladie d'Alzheimer	211

Introduction générale

L'allongement de l'espérance de vie est sans doute l'une des plus grandes réussites des systèmes de santé dans le monde avec cependant, comme conséquence, une hausse des troubles neurologiques liés à l'âge, tels que la maladie d'Alzheimer et les autres démences, les accidents vasculaires cérébraux et la maladie de Parkinson.

En incluant d'importants troubles neurologiques et neuro-développementaux qui n'étaient pas pris en compte auparavant et en ajoutant les conséquences d'affections non neurologiques qui affectent le système nerveux, une récente évaluation de la perte de santé globale associée aux affections du système nerveux tout au long de la vie a estimé la mortalité, la prévalence, les années vécues avec une incapacité (AVI), les années de vie perdues (AVP) et les années de vie corrigées de l'incapacité (AVCI), avec les intervalles d'incertitude à 95 % correspondants, par âge et par sexe, dans 204 pays et territoires, de 1990 à 2021. **Au niveau mondial, les 37 affections touchant le système nerveux ont ainsi été classées collectivement comme la principale cause collective d'AVCI en 2021 (443 millions, d'années de vie 378-521), affectant 3,40 milliards (3,20-3,62) d'individus (43,1%, 40,5-45,9 de la population mondiale).** Les dix pathologies entraînant le plus grand nombre d'AVCI normalisées selon l'âge en 2021 étaient les suivantes : accident vasculaire cérébral, encéphalopathie néonatale, migraine, maladie d'Alzheimer et autres démences, neuropathie diabétique, méningite, épilepsie, complications neurologiques dues à une naissance prématurée, troubles du spectre autistique et cancer du système nerveux. **Principales causes jusqu'ici sous-évaluées de la charge globale de morbidité dans le monde, avec un nombre croissant d'AVCI touchant finalement plus de 40% de la population mondiale, les atteintes du système nerveux devraient être considérées comme une véritable priorité de santé publique** (Steinmetz et al., 2024).

Cependant, face au manque d'accessibilité des tissus cérébraux humains en développement et à la complexité des maladies neurologiques, les études scientifiques se heurtent aux limitations des modèles animaux et des cultures cellulaires classiques tandis que les modèles précliniques traditionnels de l'industrie pharmaceutique sont dans une impasse.

La découverte de la possibilité de reprogrammer des cellules humaines adultes en cellules souches pluripotentes induites (iPSCs: *induced pluripotent stem cells*) a élargi le potentiel d'étude de la biologie humaine comme jamais auparavant. Ainsi, la capacité d'évaluer la façon dont ces cellules humaines reprogrammées peuvent se développer et s'autoorganiser en trois dimensions en se transformant en organoïdes cérébraux dans une boîte de Pétri a le potentiel de révolutionner notre approche à la fois de la recherche scientifique fondamentale et du traitement des maladies neurologiques humaines.

Les organoïdes cérébraux sont ainsi extrêmement prometteurs pour l'étude des caractéristiques cellulaires, moléculaires et génétiques atypiques qui caractérisent les maladies neurologiques et pour dévoiler des caractéristiques précédemment inaccessibles de la neurobiologie qui émergent d'interactions cellulaires complexes. En outre, les organoïdes peuvent servir de plate-forme pour tester des produits thérapeutiques dans des cellules humaines et constituent une source potentielle pour des approches de réimplantation de cellules dans le cas de lésions ou de maladies cérébrales.

Toutefois cet immense potentiel dans les domaines de la neurobiologie du développement et de la neurodégénérescence se heurte à de fortes limitations liées à des contraintes non résolues (maturation limitée, physiologie atypique, manque de types de cellules, manque de régionalisation, stress cellulaire, hypoxie, nécrose) qui nécessitent des travaux supplémentaires avant qu'il soit envisageable de les utiliser à grande échelle pour les études de génomique fonctionnelle, la découverte de médicaments ou encore l'étude des effets toxiques induits par les composés chimiques.

Le but de cette thèse consiste à contribuer à l'exploration de ce potentiel et de ces contraintes pour modéliser deux situations :

- une pathologie neurodéveloppementale, le syndrome MARCH, reposant sur une collaboration avec l'Institut Pasteur
- une pathologie neurodégénérative, la maladie d'Alzheimer, correspondant à la problématique du laboratoire concernant les mécanismes de type prion qui sous-tendent les accumulations de protéines mal conformées considérées comme étant à l'origine de toutes les maladies neurodégénératives humaines.

Introduction

Les pathologies cérébrales englobent un large spectre de maladies, allant des affections d'origine génétique aux maladies acquises ou multifactorielles. Les maladies génétiques du cerveau, telles que les pathologies neurodégénératives ou les syndromes neurodéveloppementaux, résultent souvent de mutations héréditaires qui altèrent la fonction des neurones et d'autres cellules du système nerveux. Ces affections peuvent se manifester des premiers stades du développement jusqu'à l'âge adulte, avec des impacts variés sur le développement et la dégénérescence du système nerveux.

D'autres types de pathologies, maladies complexes et multifactorielles, comme la maladie d'Alzheimer, résultent de l'interaction entre des prédispositions génétiques et des facteurs environnementaux. La maladie d'Alzheimer, l'une des pathologies neurodégénératives les plus répandues, touche des millions de personnes dans le monde et pose un défi croissant en raison du vieillissement de la population. Ces diverses formes de pathologies cérébrales partagent souvent des mécanismes communs, comme l'accumulation de protéines mal repliées ou une dysfonction neuronale, et nécessitent des approches thérapeutiques distinctes en raison de la diversité de leurs causes et de leurs manifestations cliniques. Parmi les facteurs importants contribuant à l'apparition de ces pathologies, le vieillissement occupe une place centrale. En effet, de nombreuses maladies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer ou la maladie de Parkinson, sont étroitement liées au processus de vieillissement.

L'évolution et les progrès en matière de santé ont permis depuis des années d'allonger l'espérance de vie moyenne (Zijdeman & Ribeira da Silva, 2023). En 2019, le nombre de personnes âgées de plus de soixante ans atteignait 1 milliard d'individus et il pourrait atteindre plus de 2 milliards d'individus en 2050¹. L'augmentation de l'espérance de vie a contribué à l'apparition de ces nouvelles pathologies regroupées sous la terminologie de démences (Shin, 2022). Les démences sont des maladies neurodégénératives qui touchent le cerveau et ont pour conséquence une détérioration des capacités de mémorisation ainsi que des capacités de raisonnement (Maresova et al., 2020). Le nombre de cas de démences, regroupant plusieurs pathologies neurodégénératives, serait estimé à

¹ World Health Organization, Ageing, https://www.who.int/health-topics/ageing#tab=tab_1, consulté le 14 septembre 2024

plus de 55 millions cas actuellement². Chaque année environ 10 millions de nouveaux cas sont diagnostiqués². Les principales démences répertoriées sont la maladie d'Alzheimer (MA), la maladie de Parkinson (MP), les démences fronto-temporales (DTF) ou encore la maladie d'Huntington³. Au-delà du problème de santé publique, ces maladies représentent une charge globale sur l'économie mondiale estimée à plus de 1300 milliards de dollars américains annuels en incluant les coûts indirects liés aux personnes aidant les malades².

Ces maladies neurodégénératives représentant actuellement un problème de santé publique majeur, l'industrie pharmaceutique a un rôle important à jouer dans l'exploration de nouvelles approches thérapeutiques et la recherche de traitements efficaces. Les traitements médicaux existants visent principalement à diminuer les symptômes, ralentir la progression de la maladie mais aucun traitement curatif n'a été trouvé malgré des efforts considérables déployés par la communauté scientifique et l'industrie pharmaceutique (Dyer et al., 2018; Gale et al., 2018; J. Zhang et al., 2024). Bien que le nombre de candidats-médicaments pour le traitement des maladies neurodégénératives soit important, l'incapacité de sélection des molécules d'intérêt en raison de la complexité des mécanismes pathologiques entraîne des échecs lors des essais cliniques (C. K. Kim et al., 2022). Il devient donc crucial de développer des modèles plus représentatifs et prédictifs. Il est nécessaire pour trouver un traitement pour ces différentes pathologies d'avoir une bonne compréhension des mécanismes physiopathologiques de chacune de ces maladies.

Parmi les modèles existants, ceux issus de cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) dérivés de patients ou portant des formes génétiques de ces maladies peuvent servir d'outils pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents de ces pathologies ainsi que de pouvoir servir de plate-forme pour identifier des cibles et cribler des bibliothèques de molécules actives. Ces modèles, basés sur des techniques de biologie cellulaire en 2 et 3 dimensions, ne récapitulent qu'une partie des symptômes physiopathologiques observés chez les patients. Ils ne peuvent prendre en compte les nombreux facteurs pouvant intervenir dans la physiopathologie, dont le vieillissement. Cependant, la culture 3D présente un avantage significatif pour modéliser les protéinopathies en permettant une organisation cellulaire plus proche de la situation physiologique, favorisant ainsi une meilleure reproduction des interactions entre les cellules. De plus, ces modèles tridimensionnels permettent une accumulation plus naturelle

² World Health Organization, Dementia, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia>, consulté le 14 septembre 2024

³ LES MALADIES NEURODÉGÉNÉRATIVES : LE DÉFI DES NEUROSCIENCES, <https://anr.fr/fr/ressources/cahiers-thematiques/les-maladies-neurodegeneratives-le-defi-des-neurosciences/>

des protéines mal repliées, mimant les dépôts pathologiques observés dans les maladies neurodégénératives. Depuis 2010, le développement d'organoïdes à partir d'iPSCs a ouvert une nouvelle voie, permettant de modéliser plus fidèlement les tissus humains *in vitro*, en particulier pour des organes complexes comme le cerveau. Ces avancées technologiques permettent de mieux étudier les processus pathologiques dans un contexte tridimensionnel et à partir de cellules spécifiques de patients, fournissant ainsi des modèles plus pertinents pour la recherche. Les iPSCs, éléments de départ pour la génération de nombreux modèles, ont cependant tendance à conserver des marques épigénétiques fœtales après avoir initié la différenciation *in vitro*. La mise en place de culture en 3 dimensions d'organoïdes cérébraux peut être adaptée pour favoriser la culture à long terme de ces modèles, ce qui constitue un pas vers l'introduction du facteur du vieillissement dans ces modèles. L'équipe de Sergiu Pașca a cependant démontré qu'un organoïde cérébral mûrissait à peu près à la même vitesse que le développement embryonnaire et qu'à partir de 9 mois de culture le profil transcriptionnel de l'organoïde est équivalent à celui d'un nourrisson (Gordon et al., 2021). De plus, certains éléments sont manquants dans les modèles organoïdes, comme un système de vascularisation cérébral ; les oligodendrocytes, responsables de la myélinisation des neurones dans le système nerveux central (SNC) ; ou la microglie, le système immunitaire cérébral. L'absence de ces cellules peut ralentir ou interférer sur la maturation et le vieillissement de l'organoïde.

Le travail exposé dans cette thèse vise à déterminer si les organoïdes cérébraux constituent un bon outil pour modéliser à la fois des pathologies neurodéveloppementales et neurodégénératives. Un premier projet a été développé pour contribuer à la compréhension des mécanismes physiopathologiques d'une maladie neurodéveloppementale : le syndrome MARCH. Des modèles animaux existent mais ne récapitulent pas tous les signes physiopathologiques du syndrome. Cette première étude a eu pour but d'évaluer si, grâce aux iPSCs de patients, il est possible de reproduire l'une des principales caractéristiques de cette pathologie, à savoir l'hydranencéphalie, caractérisée par une absence de développement du cerveau qui est remplacé par du liquide céphalo-rachidien (LCR) (Frosk et al., 2017). Dans un second projet, nous avons entrepris la modélisation de la maladie d'Alzheimer, ce qui a nécessité l'élaboration de stratégies spécifiques en raison de sa complexité pour réussir à obtenir un modèle *in vitro* pertinent et reproductible. En particulier, comme discuté précédemment avec l'article de (Gordon et al., 2021), l'état de maturation a été poussé en gardant en culture des organoïdes jusqu'à 6 mois. En parallèle, une molécule favorisant l'apparition des symptômes de la maladie d'Alzheimer a été utilisée, l'Aftin-5.

1. Les Pathologies neurologiques : des maladies neurodéveloppementales aux maladies neurodégénératives

Comme évoqué précédemment, les pathologies neurologiques sont en constante augmentation dans la société. Ces maladies affectent le cerveau humain qui est un organe complexe qu'il a longtemps été compliqué d'étudier. Cependant, une récente étude publiée dans *The Lancet Neurology* qui recense les désordres du système nerveux indique qu'ils affecteraient plus de 40% de la population mondiale (Steinmetz et al., 2024). Parmi les désordres du système nerveux, les maladies neurodégénératives affectent 20,3% (Feigin et al., 2020; Woolley et al., 2011) et les maladies neurodéveloppementales d'origine génétique affectent environ 2,5% de la population (Wilfert et al., 2017; McRae et al., 2017; López-Rivera et al., 2020). Dans un premier temps, les informations récoltées sur les différentes pathologies ont pu l'être grâce à l'étude d'échantillons *post-mortem* (K. Stelzmann et al., 1995; Kun et al., 2018; Wu et al., 2022; Li et al., 2023; Banerjee et al., 2024). L'étude de prélèvements *post-mortem* ne permet d'étudier que les phases tardives de la pathologie. L'objectif serait de comprendre ce qui se passe lors des phases précoces de la maladie afin de pouvoir développer des stratégies thérapeutiques efficaces pour empêcher le développement de ces maladies. Pour essayer de mieux comprendre ces pathologies, des modèles animaux, qui peuvent être humanisés, ont été développés. Cependant, les modèles animaux ne sont parfois pas totalement adaptés pour comprendre et mimer des pathologies qui n'existent pas chez l'animal ou dont les mécanismes physiopathologiques peuvent différer en fonction des espèces (Esquerda-Canals et al., 2017; Yokoyama et al., 2022). Dans le cas de syndromes complexes, dont les causes sont multiples, le développement de modèles animaux, même lorsqu'ils reproduisent assez fidèlement la pathologie, n'ont pas permis de trouver des traitements efficaces chez l'homme. Dans les cas de la sclérose latérale amyotrophique (SLA), des souris SOD1 ont été développées mais ne correspondent dans les faits qu'à moins de 1% des malades. De plus, il faut souligner que les mécanismes des différentes formes génétiques qui conduisent à la mort des cellules ne sont pas toujours les mêmes. Ainsi, les molécules qui auraient un effet protecteur chez les souris ne sont pas obligatoirement efficaces chez l'homme. Le développement d'autres modèles complémentaires, notamment issus de cellules de patients et récapitulant l'environnement pathologiques, semble nécessaire. Depuis la généralisation de l'utilisation des cellules pluripotentes humaines après leur première dérivation par Thomson en 1998 (Thomson et al., 1998), le développement d'outils tels que les iPSCs et les organoïdes offrent de nouvelles possibilités pour modéliser des pathologies jusqu'alors inaccessibles.

La première pathologie étudiée dans cette thèse est le syndrome de MARCH, une maladie neurodéveloppementale. Notre hypothèse de départ, définie en

collaboration avec Dr Mikael Boullé de l'Institut Pasteur, repose sur l'idée que les organoïdes cérébraux générés à partir des iPSCs peuvent constituer des modèles pertinents pour l'étude des mécanismes physiopathologiques de cette maladie. Dans un second temps, cette même approche a été appliquée à une pathologie neurodégénérative : la maladie d'Alzheimer. L'objectif a consisté à tester l'hypothèse selon laquelle les organoïdes cérébraux, au-delà des maladies neurodéveloppementales, pourraient permettre de modéliser efficacement les processus pathologiques associés à des maladies neurodégénératives comme Alzheimer.

1.1. Le syndrome de neurones multinucléés-anhydramnios-dysplasie rénale-hypoplasie cérébelleuse-hydranencéphalie (MARCH)

1.1.1. Introduction du syndrome

Le syndrome MARCH est un syndrome qui a été décrit pour la première fois en 2017 par Frosk et ses collègues (Frosk et al., 2017). C'est un syndrome neurodéveloppemental qui affecte les progéniteurs neuronaux, en particulier l'étape de la cytoténèse et qui conduit à un surnombre de neurones multinucléés. Frosk et ses collègues décrivent cinq caractéristiques principales qui donneront l'acronyme MARCH :

Neurones Multinucléés : neurones qui contiennent plusieurs noyaux, ce qui perturbe la fonction neuronale (**Figure 1**)

Anhydramnios : présence de très peu de liquide amniotique

Dysplasie Rénale : problème de développement au niveau du rein caractérisé par la présence d'un ou plusieurs kystes, rendant le rein non fonctionnel

Hypoplasie Cérébelleuse : développement insuffisant ou atrophie du cervelet et du tronc cérébral qui sont impliqués dans des fonctions vitales telles que la respiration

Hydranencéphalie : absence presque complète des hémisphères cérébraux qui sont remplacés par du liquide (**Figure 1**)

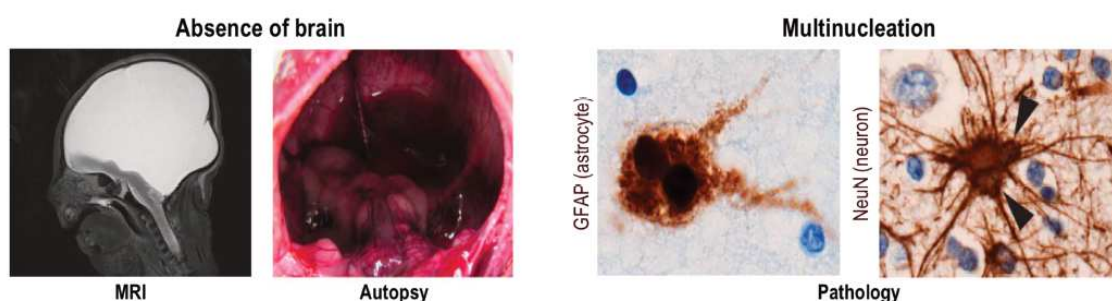


Figure 1 : Phénotypes du système nerveux central dans le syndrome MARCH

Source : extrait de (Frosk et al., 2017)

Avant d'être réellement caractérisé et diagnostiqué comme une pathologie à part entière, le syndrome MARCH a pu être associé à des syndromes similaires. Une autre pathologie due à des mutations sur 13 autres gènes différents, le syndrome de Mecker-Gruber et ses syndromes associés ont des symptômes très similaires au syndrome MARCH. Les principales caractéristiques sont (Itchimouh et al., 2016; Yaqoubi & Fatema, 2018) :

- Des problèmes neurodéveloppementaux du système nerveux central avec l'encéphalocèle occipitale, l'hydrocéphalie, l'anencéphalie, l'holoprosencéphalie, ainsi que le syndrome de Dandy-Walker.
- Des gros reins polykystiques avec dysplasie rénale kystique
- Une polydactylie

(Frosk et al., 2017) décrit plusieurs origines possibles de ce syndrome :

- Des éléments tératogènes comme une infection congénitale ou une exposition à de l'acide valproïque
- Des anomalies chromosomiques comme une triploïdie (T13)
- Des anomalies sur un gène spécifique peuvent entraîner une vasculopathie proliférative, une hydranencéphalie liée à l'X et au développement anormal des organes sexués

Les affections pathologiques cérébrales accompagnant le syndrome MARCH sont d'après ces auteurs dues à un problème lié à l'établissement de la vascularisation cérébrale entraînant à terme la dégradation des neurones (Yanagi et al., 2019). Or, Frosk et ses collègues vont mettre en évidence l'origine génétique de la maladie, en montrant l'implication du gène CEP55 (centrosomal protein 55) sur le chromosome 10 dans l'établissement de la maladie. Une des mutations identifiées sur le gène CEP55 en C-terminal produit une protéine tronquée de 40 acides aminés (Frosk et al., 2017).

Ce syndrome est autosomique récessif, et sa prévalence est inférieure à 1 individu sur un million (ORPHA : 500135⁴, OMIM : 236500⁵, Juillet 2024) et la fréquence d'apparition de la mutation dans la population serait de 0.02% (Rawlins et al., 2019). Après analyse de la littérature, au moins une dizaine de cas

⁴ Syndrome de neurones multinucléés-anhydramnios-dysplasie rénale-hypoplasie cérébelleuse-hydranencéphalie, <https://www.orpha.net/fr/disease/detail/500135>, consulté le 12/10/2024

⁵ MULTINUCLEATED NEURONS, ANHYDRAMNIOS, RENAL DYSPLASIA, CEREBELLAR HYPOPLASIA, AND HYDRANENCEPHALY; MARCH, <https://omim.org/entry/236500>, consulté le 12/10/2024

répertoriés, présentés dans **Tableau 1**, avec plusieurs mutations identifiées toujours dans le même gène.

Nombre de cas	Mutation	Maladie	Référence
3	S425*	Syndrome MARCH	(Frosk <i>et al.</i> , 2017)
2	R86*	Syndrome MARCH	(Bondeson <i>et al.</i> , 2017)
2	Ile172Asnfs*17	Syndrome MARCH	(Rawlins <i>et al.</i> , 2019)
2	R453C + R453H	Syndrome MARCH	(Fu <i>et al.</i> , 2024)
4	E24K + S425*	Microcéphalie	(Barrie <i>et al.</i> , 2020)
3	1191 + 2T>C	Microcéphalie	(Barrie <i>et al.</i> , 2020)

Tableau 1 : Différentes mutations identifiées provoquant le syndrome MARCH

Dès la première échographie réalisée lors de la grossesse, l'absence de cerveau, un des principaux signes cliniques, est détectable. Le fœtus porteur de cette mutation n'est pas viable et décède *in utero* ou après sa naissance.

1.1.2. Centrosomal protein 55 (CEP55)

La protéine centrosomale 55 (CEP55) est codée par le gène du même nom, aussi appelé C10orf3, CT111, FLJ10540, URCC6 ou MARCH (GeneCards, GC10P093496⁶). CEP55 se trouve sur le chromosome 10 en position 10q23.33 sur le génome humain de référence GRCh38.p14 (NCBI, Gene ID 55165⁷). Ce gène comporte 9 exons et seul un transcrit protéique traduit d'une séquence de 464 acides aminés (NCBI, NM8018131.5) fait consensus bien qu'un second variant existe (voir **Figure 2**).

⁶CEP55, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CEP55&keywords=GC10P095247>, consulté 12/10/2024

⁷CEP55 centrosomal protein 55 [Homo sapiens (human)], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/55165>, consulté le 12/10/2024

CEP55 est une protéine qui a de multiples rôles au sein de la cellule et joue notamment un rôle dans la cytokinèse, dernière étape de la division cellulaire qui permet la séparation cytoplasmique entre les deux cellules filles (W. M. Zhao et al., 2006). CEP55 est également connue pour sa sur-expression dans de nombreux cancers (cerveau, seins, foie, ...) (Jeffery et al., 2015).

La **Figure 2** présente la protéine CEP55 qui comporte 3 domaines coiled-coil (CC) avec un domaine riche en proline en C-terminal. Les deux premiers domaines CC sont séparés par un domaine de liaison aux protéines ESCRT et ALIX-binding Region (EABR) ainsi qu'un séparateur flexible. Enfin, la protéine contient également deux domaines d'ubiquitination (DUB). Un premier domaine est le domaine NEMO-Optineurine-ABIN (NOA) qui se superpose à la fin du deuxième CC et sur la quasi-entièreté du troisième CC. Le deuxième domaine d'ubiquitination se trouve en C-terminal de la protéine et correspond à un domaine en doigt de zinc (ZF), séparé de la fin du CC3 par un domaine riche en proline (Said Halidi et al., 2019).

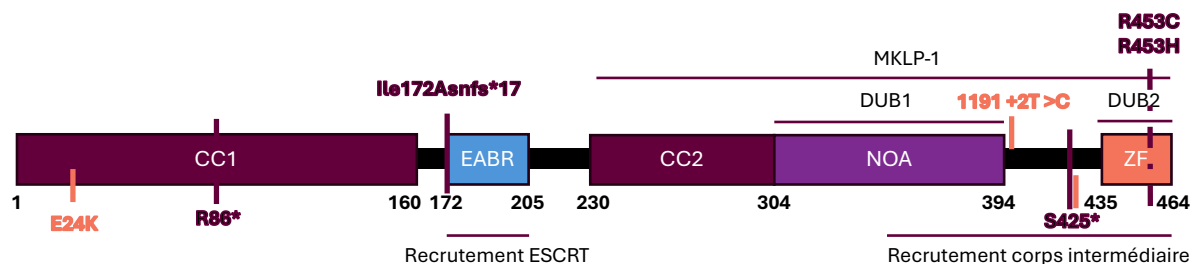


Figure 2 : Représentation schématique des domaines structuraux de la protéine CEP55 humaine

DUB1 : domaine d'ubiquitination 1, DUB2 : domaine d'ubiquitination 2, CC1 : coiled-coil 1, CC2 : coiled-coil 2, NOA : NEMO-Optineurine-ABIN. Figure adaptée de (Said Halidi et al., 2019).

La protéine CEP55 est exprimée dans plusieurs organes et tissus principalement ceux présentant une forte division cellulaire. Les principaux tissus concernés sont le sein, les ganglions lymphatiques, le foie, les poumons, le cœur, le cerveau et la peau. Au niveau cellulaire, la protéine CEP55 est localisée principalement au niveau de la membrane cellulaire, cytosquelette, centre d'organisation des microtubules plus précisément au niveau du centrosome^{8,9}.

⁸ Multinucleated Neurons, Anhydramnios, Renal Dysplasia, Cerebellar Hypoplasia, and Hydranencephaly (MARCH), https://www.malacards.org/card/multinucleated_neurons_anhydramnios_renal_dysplasia_cerebellar_hypoplasia_and_hydranencephaly?search=CEP55#GeneticTests

⁹ CEP55 gene - Centrosomal Protein 55, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CEP55>

Pendant l'interphase, le centrosome est constitué d'une paire de centrioles dont un des deux sert de base pour la formation du cil primaire. Le cil primaire est un organe essentiel qui permet à la cellule de sonder son environnement et de pouvoir répondre en conséquence (Marthiens & Basto, 2014). La protéine CEP55 serait impliquée dans l'assemblage et le désassemblage du cil primaire (Rashidieh et al., 2021; Y. C. Zhang et al., 2021). Elle est également impliquée dans l'abscission du fuseau mitotique lors de la mitose, et adopte plusieurs localisations en fonction de l'évolution du cycle cellulaire. La localisation de CEP55 durant l'interphase reste controversée mais il semble qu'elle soit localisée au niveau du centrosome, localisation similaire pendant les phases précoces de la mitose⁹. CEP55 se dissocie pendant l'anaphase avant de se relocaliser au niveau du fuseau mitotique jusqu'à la fin de l'abscission (Fabbro et al., 2005; W. M. Zhao et al., 2006).

La régulation de CEP55 est principalement assurée par trois sérines, S425, S428 et S436 phosphorylables en C-terminal de la protéine. Les sérines S425 et S428 sont phosphorylables par deux protéines clefs impliquées dans la régulation du cycle cellulaire que sont kinase cycline-dépendant 1 (CDK1) et la protéine kinase activée par le mitogène 1 (MAPK1), également connue sous le nom de ERK2. Ces deux sites de phosphorylation permettent d'initier la cytokinèse. La dernière sérine, S436, est phosphorylée par protéine kinase Serine/thréonine (PLK1). Cette phosphorylation empêche le recrutement précoce de CEP55 au fuseau mitotique et son accumulation au corps central, qui est une structure transitoire présente lors de la cytokinèse. Des dysfonctionnements de ces régulations provoquent des défauts sévères au niveau de l'abscission de cette structure pendant la division cellulaire ainsi qu'une inhibition de recrutement de la machinerie des protéines ESRCT au niveau du corps central.

1.1.3. Modèles pathologiques *in vivo*

Deux principaux modèles pathologiques ont été générés pour essayer de comprendre les mécanismes physiopathologiques du syndrome MARCH : un modèle poisson-zèbre et un modèle murin.

Plusieurs modèles de poissons-zèbres ont été générés à partir de différentes techniques comme l'utilisation de la régulation de l'expression de gènes par blocage de la traduction grâce à des morpholinos ou de l'édition génétique en utilisant l'outil CRISPR-Cas9 visant le gène *cep55l* (GeneID 553800¹⁰). Les anomalies morphologiques observées sur le poisson-zèbre sont une

¹⁰ *cep55l* centrosomal protein 55 like [*Danio rerio* (zebrafish)], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/553800>, consulté le 12/10/2024

malformation de la mâchoire, des œdèmes céphaliques, une hydrocéphalie ainsi que des rétines plus petites (Frosk et al., 2017; Jeffery et al., 2015). D'autres symptômes sont observés comme des problèmes de neurogenèse mais également des problèmes au niveau de la génération d'un réseau neurovasculaire. De l'apoptose est également observée au niveau du cerveau antérieur et du mésencéphale. Enfin, le nombre de cellules aneuploïdes, la plupart du temps tétraploïdes, est en augmentation dans ces modèles avec un grand nombre de cellules en phase G2/M. Les poissons-zèbres naissent viables même si leur espérance de vie est fortement réduite (Jeffery et al., 2015; Yanagi et al., 2019).

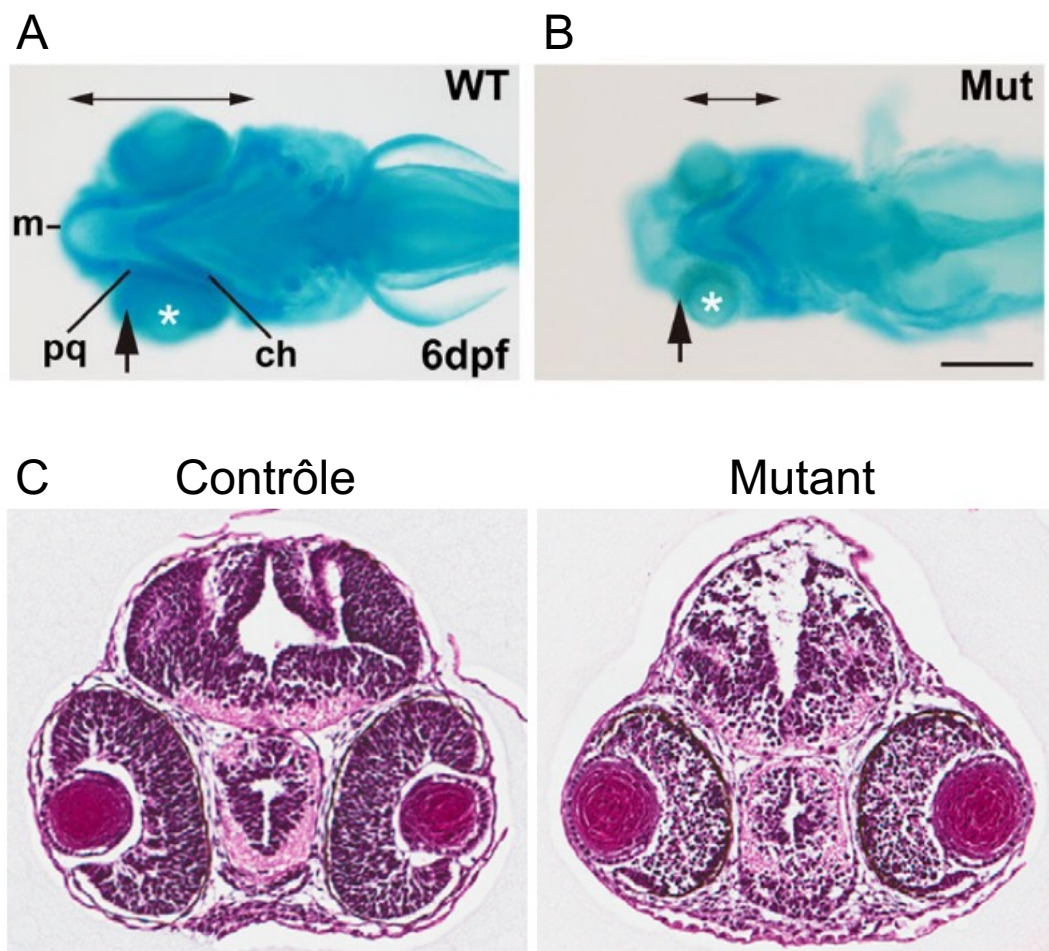


Figure 3 : Développement craniofacial du poisson-zèbre

(A,B) Coloration au bleu alcian d'un embryon contrôlé et d'un embryon mutant pour CEP55. La distance antéro-postérieure des arches pharyngées ventrales (m, p et ch) est fortement réduite sur les poissons zèbres mutants. La taille de la rétine est également diminuée chez le poisson zèbre mutant (**flèche**) mais pas la taille de l'œil (astérisque). m. : cartilage de Meckel, p : palatoquadrate, ch : cératohyal. Barre d'échelle, 200µm. (C) Coupes transversales des yeux et du cerveau d'embryons homozygotes mutant et contrôlé 24 heures post-fécondation (hpf) colorée hématoxyline et éosine (H&E). Source : extrait de (Jeffery et al., 2015; Yanagi et al., 2019).

Les modèles murins knock-out CEP55 générés sont des souris viables. A la naissance, les souris sont plus légères que les souris contrôles, différence de poids qui n'est pas seulement due au fait que les souris malades ont du mal à se nourrir auprès de leur mère. De plus, la plupart des souriceaux malades ont tendance à se faire cannibaliser par leurs parents. Les phénotypes entre les souriceaux sains et les malades restent cependant assez similaires malgré la mutation. Les souriceaux malades présentent cependant une microcéphalie avec environ 50% de surface en moins au niveau du cortex. Cette différence de taille commence dès le développement embryonnaire. Il faut toutefois noter que le cerveau des souriceaux $cep55^{-/-}$ bien que plus petit s'est quand même formé et développé. La quantité de cellules apoptotiques est également très importante chez les souris $cep55^{-/-}$ par rapport aux souris contrôles. D'autres problèmes de développement notamment rénaux sont également observés (Tedeschi et al., 2020a).

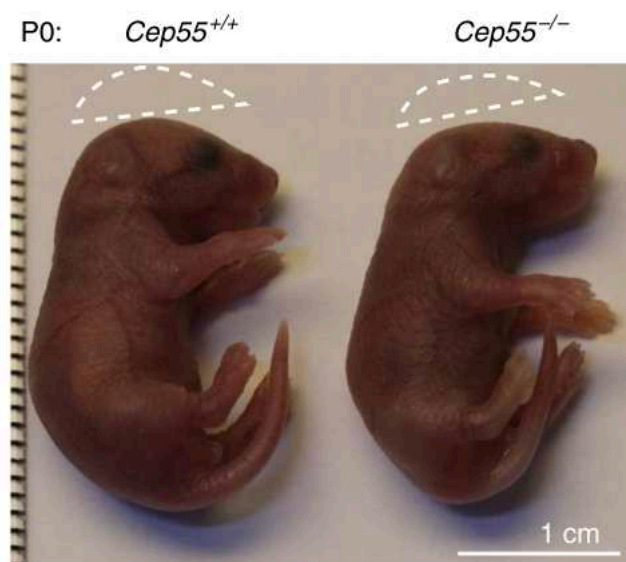


Figure 4 : Souris CEP55 knock-out viables

Image de nouveaux-nés souris à P0 dont le génotype est indiqué au-dessus de l'animal. Les lignes pointillées au-dessus du crâne de l'animal représente la forme de leur crâne. Source : extrait de (Tedeschi et al., 2020a).

Les deux types de modèles animaux générés ont permis de comprendre certains aspects du syndrome MARCH. Cependant, une des principales différences phénotypiques entre la pathologie humaine et celle générée dans les modèles animaux est le développement du cerveau qui se fait tout de même malgré le fait qu'il soit de taille réduite par rapport aux contrôles. Dans différents articles, les auteurs ont mis en évidence le phénomène d'abscission du fuseau mitotique par la voie CEP55-dépendante (Fabbro et al., 2005; Zhao et al., 2006; Jeffery et al., 2015; Said Halidi et al., 2019; Tedeschi et al., 2020b; Little & Dwyer, 2021). Des travaux sont encore à mener pour comprendre les mécanismes physiopathologiques

responsables du syndrome, mais cela nécessitera la génération d'un modèle plus pertinent et proche du phénotype observé chez l'homme.

1.2. Le cycle cellulaire

Comme évoqué précédemment, CEP55 est une protéine essentielle dans le cycle cellulaire et qui y assure plusieurs fonctions. Son rôle le plus important intervient lors de l'abscission du fuseau mitotique mais elle joue différents rôles au niveau du cycle cellulaire avant cette étape finale. Une mutation au niveau de ce gène a pour conséquence l'apparition quasi systématique d'un codon stop précoce. Cette protéine tronquée ne peut plus assurer son rôle dans l'abscission du corps central permettant la séparation des deux cellules filles. Cette mutation a de graves conséquences lorsque la voie de division cellulaire dépendante de CEP55 est empruntée. Après une étude de la littérature, c'est le processus de neurogenèse qui est le plus affecté par cette mutation (Frosk et al., 2017; Rawlins et al., 2019).

Avant de vouloir comprendre les mécanismes physiopathologiques du syndrome MARCH, il est important de comprendre les mécanismes du cycle cellulaire dans leur ensemble pour pouvoir replacer les différentes interactions de la protéine CEP55 au cours du cycle cellulaire.

1.2.1. Introduction

La première définition d'une cellule est donnée par Robert Hooke en 1665 et doit respecter les trois règles suivantes (Uzbekov & Prigent, 2022) :

- La cellule est le constituant principal de tous les êtres vivants
- La cellule est la plus petite unité biologique structurale et fonctionnelle qui constitue un individu
- Chaque cellule est dérivée d'une autre cellule

La fécondation est le processus selon lequel un ovule entre en contact avec un spermatozoïde, ce qui permet la reconstitution de la première cellule diploïde d'un individu. Une fois cette nouvelle cellule formée, elle va se multiplier et se diviser pour donner environ 3.7×10^{13} nouvelles cellules afin d'aboutir à la génération d'un organisme humain entier (Bianconi E. et al. 2013). Deux types de divisions cellulaires sont observables (**Figure 5**) :

- Symétrique : la division cellulaire aboutie à l'obtention de deux cellules filles identiques
- Asymétrique : la division cellulaire aboutie à l'obtention de deux cellules filles avec des caractéristiques différentes

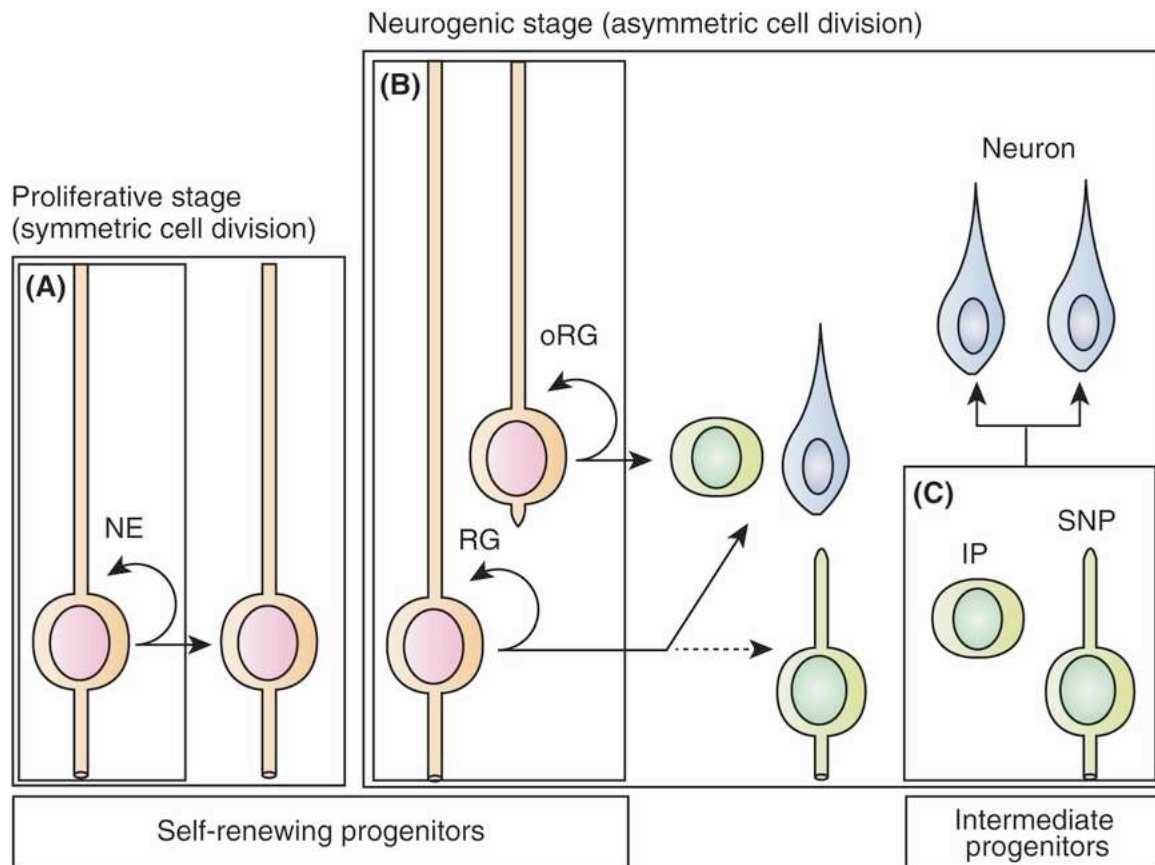


Figure 5 : Schéma représentation les divisions cellulaires symétriques et asymétriques au niveau cérébral

Les progéniteurs auto-renouvelables : (A) Les cellules neuroépithéliales (NE) se divisent de manière symétrique pour produire deux cellules NE, qui augmentent la surface du tissu cérébral au début du stade prolifératif. (B) Au stade neurogène, la plupart des progéniteurs auto-renouvelables se divisent de manière asymétrique. Les cellules gliales radiales (RG) et les cellules gliales radiales externes (oRG) se divisent de manière asymétrique pour produire des cellules RG (oRG) et des neurones ou des cellules progénitrices intermédiaires (IP). Les cellules RG sont situées dans la zone ventriculaire, tandis que les cellules oRG sont situées en dehors de la zone ventriculaire (ZV). Les cellules NE et RG ont des prolongements apicaux et basaux très allongés. Du côté ventriculaire, les prolongements apicaux sont reliés entre eux par des jonctions adhérentes. En revanche, les cellules oRG perdent cette connexion apicale. (C) Les cellules IP subissent une division terminale symétrique et produisent deux neurones. Les cellules IP typiques présentent une morphologie multipolaire et se divisent dans la zone sous-ventriculaire. Les cellules précurseurs neurales courtes (SNP) maintiennent la connexion apicale et ont des prolongements basaux courts ; ces cellules subissent également une division terminale et produisent deux neurones. Figure extraite de (Shitamukai & Matsuzaki, 2012).

La division cellulaire permet d'obtenir différents types cellulaires plus ou moins différenciés qui généreront les différents tissus du corps humain. Les premières divisions cellulaires donneront des cellules peu différenciées, qui par un circuit de différenciation qui leur est propre, aboutiront à des cellules différenciées capables de remplir une fonction bien précise et unique. Cependant, des groupes de cellules peu ou non différenciées, appelés cellules souches ou cellules progénitrices, restent disponibles tout au long de la vie. Ces cellules, localisées à des endroits spécifiques du corps humain, continuent ensuite à se diviser tout au long de la vie d'un individu, en moyenne 10¹⁶ divisions, pour remplacer les cellules endommagées et garder ainsi l'intégrité morphologique et physiologique de l'individu (Meijer, 2006). Une différence est à noter entre la division cellulaire aboutissant à l'obtention d'une cellule différenciée puisque la cellule perd sa capacité de renouvellement, ce qui n'est pas le cas des cellules souches.

La première description du processus de la division est faite chez la plante par Walther Flemming en 1882 (Flemming & Flemming, 1882). Il faudra attendre 1953 pour avoir la description du cycle cellulaire composé de 4 phases : G1, S, G2 et la mitose (Uzbekov & Prigent, 2022). Ces quatre phases du cycle cellulaire sont soumises à de fines et importantes régulations permettant d'aboutir à l'obtention de deux cellules filles ayant en leur sein la même composition génétique. En 2001, trois chercheurs, Leland H Hartwell, Sim Tim Hunt et Sir Paul Nurse, seront co-récipiendaires du prix Nobel de Physiologie et de Médecine pour leurs découvertes sur les régulateurs clefs du cycle cellulaire (Uzbekov & Prigent, 2022).

1.2.2. La Mitose

La mitose est un processus composé d'étapes successives dont l'aboutissement est l'obtention de deux cellules filles. Une cellule somatique en quiescence va d'abord devoir passer par une étape appelée l'interphase pour préparer sa mitose. L'interphase est la phase de la préparation de la cellule avec l'amplification du contenu cellulaire avant son entrée en mitose. La première étape est le passage de la cellule du stade G1 au stade S provoqué par l'augmentation de la taille de la cellule jusqu'à atteindre une taille induisant le passage de la cellule en phase S. Cette phase consiste ensuite à la duplication du matériel génétique de la cellule pour atteindre la phase G2, dernière étape de l'interphase qui permet le passage de la cellule en mitose. La mitose se décompose en cinq étapes : la prophase, la prométaphase, la métaphase, l'anaphase et la télophase (Rath & Kozielski, 2012). Une fois la séparation nucléaire et cytoplasmique des deux cellules filles, la cytokinèse permet la séparation complète entre les deux cellules filles (**Figure 6**).

1.2.3. Régulateurs du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est un processus finement régulé et des anomalies de régulation peuvent avoir de grandes conséquences sur un individu. La régulation se fait principalement grâce à des points de contrôle tout au long du cycle qui permettent de passer à l'étape suivante. Si un point de contrôle n'est pas vérifié, le cycle cellulaire peut être arrêté. Lors d'un arrêt du cycle cellulaire en fonction du dommage constaté, il peut être réparé si le dommage n'est pas trop important, sinon il entraîne la destruction de la cellule. Un défaut au niveau de ces points de contrôle peut aboutir à de sérieuses anomalies tels que des cancers.

Les principaux régulateurs impliqués sont des kinases dépendantes des cyclines (CDKs) qui sont des protéines kinases sérine/thréonine. Ces CDKs vont phosphoryler leur substrat pour promouvoir la synthèse d'ADN et la progression de la mitose. La liaison de CDKs à leur cycline spécifique produit un changement de conformation et permet ainsi leur activation. Ce processus est finement régulé au niveau de la synthèse des cyclines ainsi qu'au niveau de la protéolyse ubiquitine-dépendante. L'activité des CDKs peut également être régulée négativement par la liaison à de petites protéines inhibitrices, les CKIs, ou par la phosphorylation inhibitrice de résidus tyrosine qui empêche le transfert de phosphate sur le substrat (Currais et al., 2009; Zekanowski & Wojda, 2009).

Chez l'Homme, une vingtaine de CDKs et pratiquement le même nombre de cyclines ont été découvertes, ce qui en fait un vaste champ de recherche. Succinctement, la phase G1 est contrôlée par CDK4 et CDK6 en liaison avec la cycline D, et la transition de la phase G1 à la phase S est contrôlée par le complexe CDK2-Cycline E (**Figure 6**). Ce point de contrôle est particulièrement important car les cellules peuvent rester en quiescence ou s'engager dans le cycle cellulaire. Le passage de la phase S et G2 est régulé par le complexe CDK2-Cycline A qui va phosphoryler de nombreuses protéines qui permettent la réplication de l'ADN et le complexe CDK1-Cycline E régule la phosphorylation de protéines spécifiques impliquées en G2 et en M (**Figure 6**). La transition entre la phase G2 et la phase M se fait grâce à l'association CDK1-Cycline B qui atteste de l'achèvement et qualité de la réplication de l'ADN. Si des mécanismes de réparation de l'ADN ont dû être mis en place, c'est également ce complexe qui s'assure de la bonne réparation des erreurs. De manière surprenante, l'inactivation du complexe CDK1-Cycline B induit l'anaphase, ce qui permet de diriger la mitose vers la cytokinèse (**Figure 6**) (Murray, 2004; Satyanarayana & Kaldis, 2009; Zekanowski & Wojda, 2009; Uzbekov & Prigent, 2022;).

Entre l'anaphase et la métaphase, il y a un point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique (SAC) qui vérifie l'orientation des chromosomes ainsi que l'attachement du kinétochore au fuseau microtubulaire. L'adéquate orientation des chromosomes entraîne l'inhibition de la protéine Mitotic Arrest Deicient 2-like protein (MAD2) qui active le complexe promouvant l'anaphase/Cyclosome

(APC/C). Ce complexe APC/C produit la séparation des chromatides et dégrade la cycline B. La dégradation de la cycline B entraîne l'inactivation de CDK1 qui initie la cytokinèse et le réarrangement du cytosquelette (Murray, 2004; Satyanarayana & Kaldis, 2009).

D'autres protéines sont également impliquées dans la régulation du cycle cellulaire. La protéine du rétinoblastome (Rb) est complexée avec le facteur de transcription E2F. Ce complexe a une action de la phase G1 à la phase S. Lorsque la protéine Rb est phosphorylée, elle perd son affinité avec son facteur de transcription, se dissocie de la protéine Rb et permet de diriger la transcription de gènes spécifiques qui codent les protéines nécessaires pour progresser dans les prochaines étapes du cycle cellulaire. Le complexe CDK2-Cycline E permet d'obtenir une hyperphosphorylation de la protéine Rb pour acter le passage irréversible du cycle cellulaire à l'étape suivante (**Figure 6**) (Thakur et al., 2008; Kabadi & Faden, 2014; Narasimha et al., 2014).

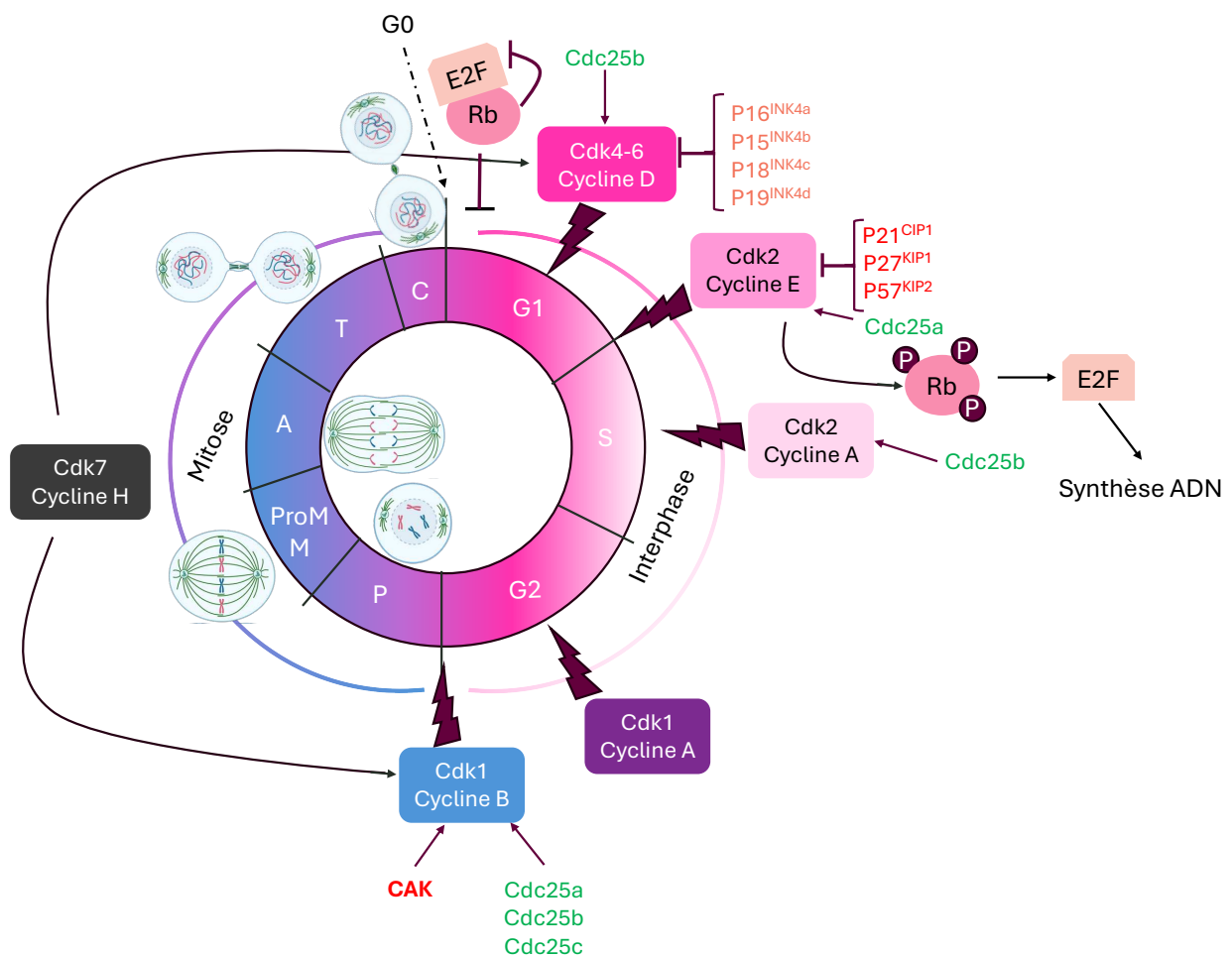


Figure 6 : Schéma du cycle cellulaire et de sa régulation

Schéma récapitulatif des différentes phases du cycle cellulaire. Les kinases dépendantes des cyclines (CDK) et leur cycline associée (rectangle de couleur) ont été placées au niveau des différents points de contrôle (éclair). Les activateurs des complexes CDK-cycline sont annotés en vert et les inhibiteurs des complexes CDK-cycline sont indiqués en rouge et orange. Le complexe CDK2-cycline E phosphoryle la protéine du rétinoblastome (Rb) afin d'activer la synthèse d'ADN. P : prophase, ProM/M : prométaphase/métaphase, A : anaphase, T : télophase, C : cytokinèse. Figure adaptée de (Currais et al., 2009; Murray, 2004; Narasimha et al., 2014; Satyanarayana & Kaldis, 2009)

1.2.4. Cytokinèse

Comme évoqué précédemment, la cytokinèse est la dernière phase du processus de division cellulaire. Elle va permettre le clivage du pont intercellulaire qui contient le corps central et maintient les deux cellules ensemble (Lafaurie-Janvore & Piel, 2013). La cytokinèse est un processus qui peut être symétrique, c'est-à-dire que les deux cellules héritent d'une partie du corps central ou asymétrique, c'est-à-dire qu'une seule des deux cellules hérite du corps central. Le clivage asymétrique du corps central semble être un mode de division assez fréquent notamment chez les cellules polarisées (Mullins & Biesele, 1977; Heng & Koh, 2010; Gibieža & Petrikaitė, 2021). Lorsque le corps central se retrouve uniquement chez une des deux cellules deux scénarii peuvent se présenter :

- Un nouveau clivage du corps central et ainsi sa libération dans le milieu extracellulaire. Le corps central aura tendance alors à adhérer à la membrane d'une des deux cellules filles. Dans de rares cas, le corps central peut adhérer à une autre cellule qui n'était pas impliquée dans le processus de division (Marzesco et al., 2005; Dubreuil et al., 2007; Ettinger et al., 2011; Crowell et al., 2014).
- Le corps central peut être présent dans le cytoplasme et recyclé de deux manières différentes, soit par autophagie soit par un mécanisme de phagocytose-like, mais les deux voies aboutissent à sa dégradation au niveau du lysosome (Pohl, 2009; Pohl & Jentsch, 2009; Ettinger et al., 2011; Kuo et al., 2011).

Le type de division asymétrique du corps central est important dans le maintien de l'intégrité ainsi que le devenir de la cellule. Cette division asymétrique implique ainsi la régulation et l'organisation du cytosquelette dans l'anneau contractile menant à l'abscission. Il est encore nécessaire de mener des recherches sur ce sujet car tout n'est pas encore compris (Heng & Koh, 2010),

Le processus de cytokinèse commence dès l'anaphase avec la formation du pont intercellulaire qui va se terminer à la cytokinèse. Un des complexes impliqués dans la formation de l'anneau contractile est le complexe ESCRT-III qui participe

au remodelage du cytosquelette présenté sur la **Figure 7** (Y. Zhou et al., 2019) et est également impliqué dans le recrutement du deuxième site de constriction (Elia et al., 2012). Le complexe ESCRT-III a besoin pour fonctionner de la dépolymérisation du cytosquelette d'actine pour avoir la localisation adaptée pour l'abscission. Un problème au niveau de ce complexe peut provoquer une inhibition de la cytokinèse (Schiel et al., 2012; Gibieža & Petrikaitė, 2021). La protéine CEP55 va permettre le recrutement du complexe ESCRT-III. L'interaction entre le complexe ESCRT-III et la protéine CEP55 se fait grâce à deux domaines d'interaction protéique, les domaines NOA et ZF (**Figure 2, Figure 7**). Une mutation dans le gène CEP55 qui provoque une protéine tronquée avec au moins la perte du domaine ZF va générer une réduction voire une perte totale des interactions avec le complexe ESCRT-III. Cela a pour conséquence les défauts de cytokinèse observés dans le syndrome MARCH.

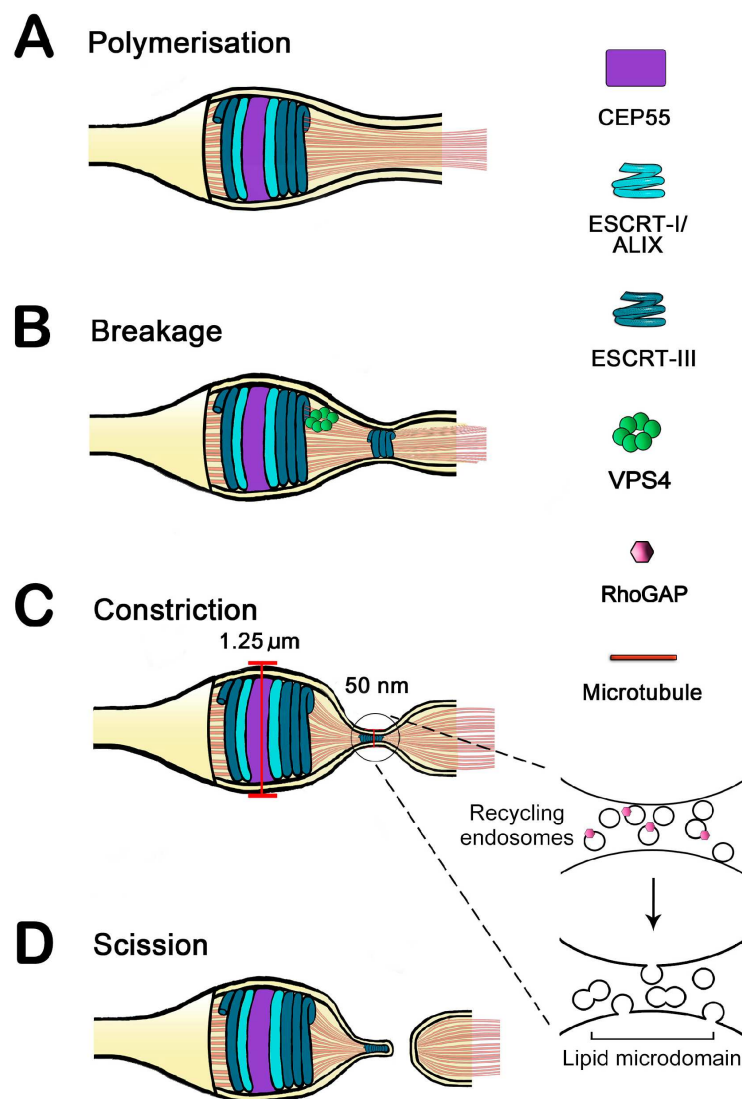


Figure 7 : Représentation schématique de l'abscission dans une cellule de mammifère

Dans le panneau (A), CEP55 (protéine centrosomale de 55 kDa) a d'abord recruté les composants ESCRT-I (gène de susceptibilité aux tumeurs 101 (TSG101), protéine interagissant avec le gène 2 lié à l'apoptose (ALIX)) au corps de Flemming, suivi par le recrutement de ESCRT-III ; (B) Le recrutement de l'ATPase VPS4 à cet assemblage est proposé pour médier la rupture ou le remodelage de l'ESCRT-III, facilitant l'apparition de l'ESCRT-III à la zone d'abscission (C) La constriction au site secondaire peut être pilotée soit par la fusion des vésicules endosomales avec la membrane plasmique, soit par les interactions de l'ESCRT-III avec la membrane plasmique Le rôle possible des domaines lipidiques et de la protéine activatrice de la Rho GTPase (RhoGAP) et (D) On pense que la scission est pilotée par le complexe ESCRT-III/VPS4. Figure extraite de (Bhutta et al., 2014).

Depuis les années 1970, il a été montré qu'un défaut dans le processus de cytokinèse est fortement tumorigène (Hirano & Kurimura, 1974). D'autres pathologies comme le syndrome MARCH, dont le problème intervient au niveau de la cytokinèse, ont été recensées comme de multiples pathologies sanguines, syndrome de Lowe ou encore la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) (Lacroix & Maddox, 2012).

1.3. Maladie d'Alzheimer

1.3.1. Introduction

Les maladies neurodégénératives ou démences sont des pathologies qui sont principalement liées à l'âge et affectent les capacités cognitives d'un individu, comme la capacité à raisonner ou à mémoriser. De par l'augmentation de l'espérance à vie dans la population, les démences affectent aujourd'hui environ 60 millions de personnes à travers le monde. Elles représentent un coût social et financier important dû principalement au fait qu'il n'existe pas de traitements curatifs. Parmi les maladies neurodégénératives, la Maladie d'Alzheimer est la plus fréquente.

La maladie d'Alzheimer est une pathologie neurodégénérative qui a été décrite pour la première fois en 1906 par Aloïs Alzheimer, un psychiatre allemand, lors du 37ème congrès des psychiatres allemands du sud-ouest (Stelzmann et al., 1995). Le psychiatre décrit le cas de sa patiente, A. Deter, qui a été admise pour une démence mais dont le diagnostic n'a pu être posé que *post-mortem* sur des coupes histologiques (Stelzmann et al., 1995). La mise en évidence de la maladie d'Alzheimer s'est faite par la méthode de coloration d'argent de Bielchowsky (Brion et al., 1985 ; Uchihara, 2007).

Les principaux symptômes décrits sont des troubles paranoïaques, de l'agressivité et de la confusion chez le patient accompagné de problèmes de

mémoire et de sommeil. Cependant, du fait de la rareté de la maladie décrite à l'époque, cela n'attire que très peu l'attention et ce n'est que quelques années plus tard, en 1910, qu'elle obtiendra le nom éponyme du psychiatre qui l'a décrite pour la première fois.

Le psychiatre Aloïs Alzheimer décrit au départ cette pathologie avec deux principales caractéristiques (Breijyeh & Karaman, 2020) :

- Des dommages importants de différentes zones du cerveau dus à la destruction de neurones
- L'accumulation de plaques bêta-amyloïde, protéine qui s'accumule et ensuite s'agrège au niveau du cerveau. Cette accumulation protéique est observée dans les mêmes zones qui sont endommagées.

En 1974, une troisième caractéristique s'ajoute aux deux premières décrites par A. Alzheimer, la présence d'autres agrégats protéiques qui forment des enchevêtrements neurofibrillaires. Cependant, la composition de ces enchevêtrements reste inconnue encore pendant une dizaine d'années avant l'identification de la protéine impliquée, la protéine Tau (Iqbal et al., 1974).

La prévalence de la pathologie est faible mais l'augmentation de l'espérance de vie conduit à l'augmentation du nombre de cas et, en 1976, Robert Katzman alerte sur l'augmentation de la prévalence de la pathologie depuis sa découverte (Katzman, 1976). Les recherches portant sur la maladie d'Alzheimer sont ainsi lancées et ne cesseront d'augmenter puisqu'à titre d'exemple, un peu plus de 17,000 publications scientifiques sont parues pour l'année 2023 (**Figure 8**) (PubMed).

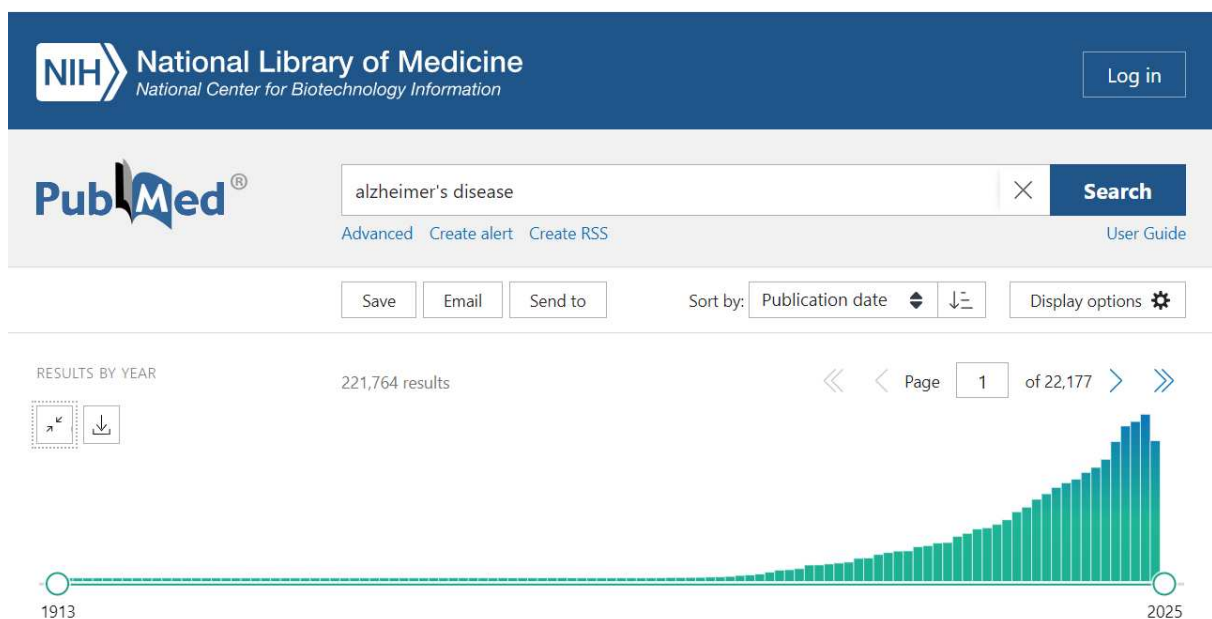


Figure 8 : Evolution du nombre de publications contenant *Alzheimer's disease* de 1913 à 2025

Outre la maladie d'Alzheimer, d'autres désordres du système nerveux central ont des caractéristiques similaires, avec un caractère commun : l'agrégation de protéines. Ces pathologies sont regroupées sous le terme de protéinopathies et sont quelquefois appelées « prion-like » (Hamaguchi et al., 2012; Wells et al., 2019).

1.3.2. Protéinopathies : agrégation protéique dans les désordres du système nerveux central

Les protéinopathies sont des pathologies qui proviennent d'un défaut de conformation d'une protéine ou d'une amylose. Bien qu'elles puissent toucher différents organes, le cerveau est l'organe le plus souvent atteint. Ces pathologies ont pour certaines la caractéristique d'être transmissibles par la fraction protéique impliquée. La première démonstration de ce type d'agent infection est faite par Stanley Prusiner en 1982 dans le cadre de maladies liées à la protéine du prion telles que la maladie du Kuru ou celle de Creutzfeldt-Jakob. Contrairement à ce qui est rencontré habituellement, il a pu démontrer que l'agent infectieux n'est pas un agent conventionnel, c'est-à-dire à base d'acides nucléiques, mais protéique (Prusiner, 1982). Le plus souvent les protéines impliquées ont des structures tertiaires ou quaternaires avec une majorité d'hélices alpha (α -hélices). Le changement de conformation génère un passage d'une majorité de α -hélices à une majorité de feuilletts bêta (β -feuilletts), structure qui a tendance à s'agrèger beaucoup plus facilement (Bourdenx et al., 2017).

Le développement de la maladie du prion se fait de la manière suivante : dû à son environnement ou à une mutation génétique, la protéine adopte une conformation qui a tendance à s'agrèger plus facilement. Au départ, la protéine qui n'a pas la bonne conformation va être détruite par des mécanismes de dégradation mais au cours du temps, ces mécanismes vont être moins efficaces et permettre à la protéine mal repliée de former de petits agrégats pathologiques aussi appelé « noyaux de nucléation » ou « seeds », visibles sur la **Figure 9**. Sur ces noyaux de nucléation, de nouvelles protéines mal conformées ou converties dans la conformation pathologique vont pouvoir s'agrèger et ainsi augmenter la taille de l'agrégat initial. Lorsque l'agrégat atteint une certaine taille, des fragmentations involontaires peuvent survenir et mener à l'obtention de plusieurs petits agrégats. Ces petits agrégats vont circuler de cellules en cellules pour favoriser le développement de la pathologie (**Figure 9**). Ce passage de proche en proche est notamment favorisé par un transport médié par les exosomes (Bourdenx et al., 2017). Le passage de la protéine mal conformée à d'autres cellules favorise la transition de conformation des protéines bien conformées à des protéines à la

conformation pathologique. A la fin du processus d'agrégation, des filaments protéiques insolubles sont obtenus.

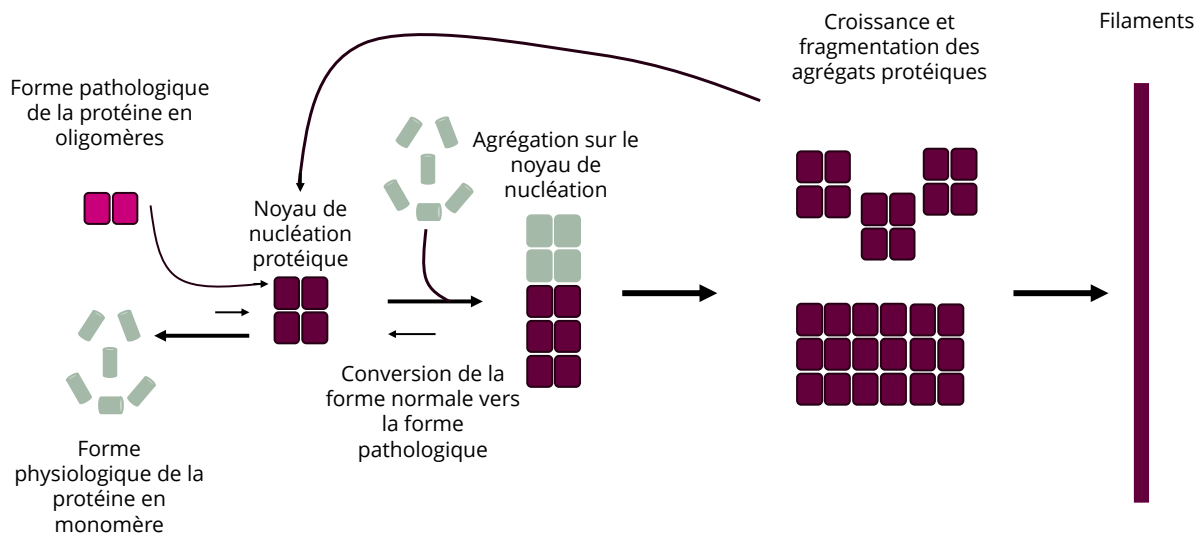


Figure 9 : Schéma du processus de l'agrégation protéique dans les protéinopathies

Schéma : adapté (Brundin et al., 2010)

Depuis 1982, une cinquantaine de protéinopathies avec un profil plus ou moins proche du mécanisme de type prion d'où l'appellation « prion-like » ont été identifiées. Cinq protéines principales sont représentées dans les protéinopathies : la protéine du prion (PrP), l' α -synucléine (α -Syn), la TDP-43, l'amyloïde- β ($A\beta$) et la protéine Tau (Allegri, 2020; Noor et al., 2021). Comme la **Figure 10** le montre, une sorte de continuum existe entre ces différentes pathologies.

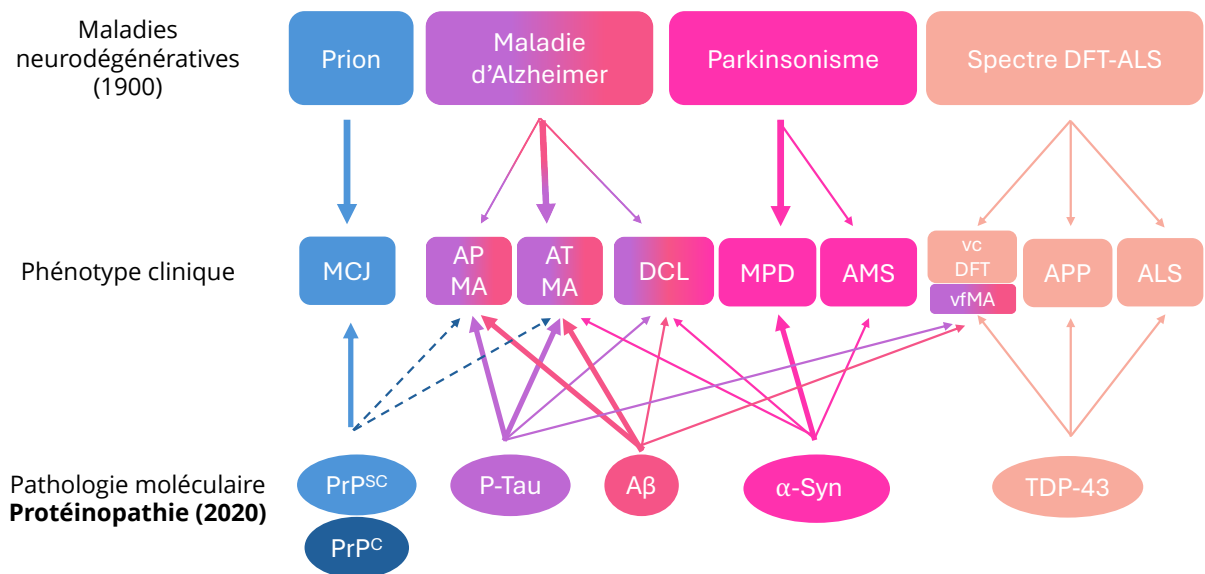


Figure 10 : Schéma de différentes protéines impliquées dans des protéinopathies

MCJ : maladie Creutzfeldt-Jacob, , AP MA : apparition précoce de la maladie d'Alzheimer, AT MA : apparition tardive de la maladie d'Alzheimer, DCL : Démence avec corps de Lewi, MPD : maladie de Parkinson avec démence, AMS : Atrophie multi-systémique, vcDFT : variant de comportement de démence frontotemporal, vf MA : variante frontale de la Maladie d'Alzheim, APP : Aphasie primaire progressive, ALS : Sclérose latérale amyotrophique ; PrP^C : prion physiologique, PrP^{Sc} : prion pathogène, P-Tau : phospho-Tau, Aβ : bêta- amyloïde, α-syn : α-synucléine, TDP-43 : TAR DNA protéine 43. Schéma adapté de (Allegri, 2020; Noor et al., 2021)

La première mise en évidence que la maladie d'Alzheimer relèverait d'un mécanisme prion-like a été faite grâce à l'injection intracérébrale de tissus de cerveaux humain de patients atteints de la maladie d'Alzheimer sur des primates non-humains (PNH) (Baker et al., 1994; Gary et al., 2019). Les animaux ont développé les signes physiopathologiques après 5 à 10 ans de temps d'incubation. Différentes voies d'inoculation ont été testées comme dans les pathologies à prions, mais contrairement à ces dernières, seules les voies intracérébrales et intrapéritonéales sont des voies qui ont permis le développement pathologique. Tous les animaux infectés par ces deux voies ont développé une pathologie. Il a également été montré que ce mécanisme de propagation était favorisé chez les individus qui avaient des prédispositions génétiques (Morales et al., 2021). Des expériences similaires ont été réalisées chez la souris avec des injections intracérébrales de cerveaux âgés malades, aussi bien murins que humains, ou encore avec des oligomères synthétiques amyloïde bêta (Aβ) (Kane et al., 2000; Eisele et al., 2009; H. Y. Kim et al., 2016).

Chez l'Homme, des transmissions iatrogènes sont également responsables du développement d'amyloïdoses cérébrales ou encore du développement précoce

de la pathologie d'Alzheimer. L'utilisation de l'hormone de croissance dérivée de l'hypophyse de cadavres est responsable du développement de formes sporadiques de la maladie de Creutzfeldt-Jakob (Jaunmuktane et al., 2015; Purro et al., 2018). L'apparition d'agrégats A β a également été observée suite à l'utilisation d'hormone de croissance dérivée de l'hypophyse de cadavres (Jaunmuktane et al., 2015; Purro et al., 2018). De plus, des opérations de neurochirurgie, tout comme la greffe de dure-mère, ont également été identifiées comme responsables de l'apparition de formes précoces de la maladie d'Alzheimer (Banerjee et al., 2024; Hamaguchi et al., 2016; Iwasaki et al., 2018; Kovacs et al., 2016).

Toutes ces différentes études montrent bien des mécanismes de physiopathologies similaires aux maladies à prions (Banerjee et al., 2024).

1.3.3. Evolution de la maladie

La maladie d'Alzheimer est une pathologie liée à l'âge qui affecte principalement les personnes âgées de plus de 65 ans. Dans 5 à 10% des cas, la pathologie peut être diagnostiquée chez des patients plus jeunes, allant de 30 à 60 ans (Breijyeh & Karaman, 2020). Concernant ces cas précoces, il a été montré que pour la plupart de ces cas, des mutations génétiques identifiées sont responsables de l'apparition de la pathologie. La maladie d'Alzheimer qui en découle est caractérisée comme familiale en opposition à la forme sporadique représentant 90-95% des cas, c'est-à-dire avec aucun historique familial. Cela ne veut pas dire qu'un fond génétique ne peut pas participer au développement de la pathologie dans les formes sporadiques. Nous nous intéresserons dans ce travail plus particulièrement aux cas familiaux de la maladie d'Alzheimer.

Que ce soit dans les cas sporadiques ou familiaux, des gènes ont été identifiés comme facteurs de risque augmentant la probabilité de développer la maladie d'Alzheimer. Le gène Apo ϵ 4 est l'un des principaux facteurs de risques génétiques associés à la maladie d'Alzheimer (Gosselet, 2012) (**Figure 11**). Il code pour une variante de la protéine apolipoprotéine E (ApoE), impliquée dans le transport des lipides et dans les mécanismes de réparation des neurones. Les individus portant une ou deux copies de l'allèle Apo ϵ 4 ont un risque accru de développer la forme tardive et sporadique de la maladie d'Alzheimer. Comparé aux autres variants Apo ϵ 2 et Apo ϵ 3, l'allèle Apo ϵ 4 est particulièrement associé à une accumulation plus rapide des plaques amyloïdes dans le cerveau, un marqueur clef de la pathologie. Ce gène n'est pas la cause directe de la maladie, mais sa présence peut influencer à la fois sur l'âge d'apparition et la progression des symptômes chez les individus porteurs. D'autres gènes, tels que APP, PSEN1, et PSEN2, sont également impliqués, en particulier dans les formes familiales et précoces de la maladie. Les analyses génomiques les plus récentes décrivent jusqu'à 75 loci associés au risque

de développer la pathologie (Bellenguez et al., 2022). De plus, un certain nombre de gènes ont été associés à la longévité humaine, et peuvent être impliqués dans la protection contre les pathologies neurodégénératives. Il y a un consensus sur cinq gènes principaux que sont ACE, APOE, FOXO3A, IL-6 et KLOTHO. Ce consensus a pu être établi grâce à une méta-analyse de 65 études. Ces cinq gènes comportent plusieurs polymorphismes dont certains ont démontré leur influence positive ou négative sur l'espérance de vie d'un individu (Revelas et al., 2018; Bin-Jumah et al., 2022; Caruso et al., 2022). Tous ces gènes sont impliqués dans de nombreux processus mais tous ont été identifiés pour jouer un rôle au niveau du système immunitaire. En plus du rôle dans le système immunitaire, le gène ACE régule également la pression artérielle et les échanges de liquide au niveau du rein (L. Li & Murakami, 2023; Revelas et al., 2018). Le gène KLOTHO joue différents rôles au niveau cérébral. KLOTHO est impliqué dans la régulation de la neurogenèse, la régulation du stress oxydatif mais également dans le maintien de la myélinisation des neurones (Laszczyk et al., 2017; Shaker et al., 2021; Vo et al., 2018). APOE est un gène dont les différentes isoformes vont avoir des actions bénéfiques ou délétères sur l'évolution cérébrale au cours de la vie comme expliqué dans la **Figure 11** (Gosselet, 2012; Huang & Mahley, 2014).

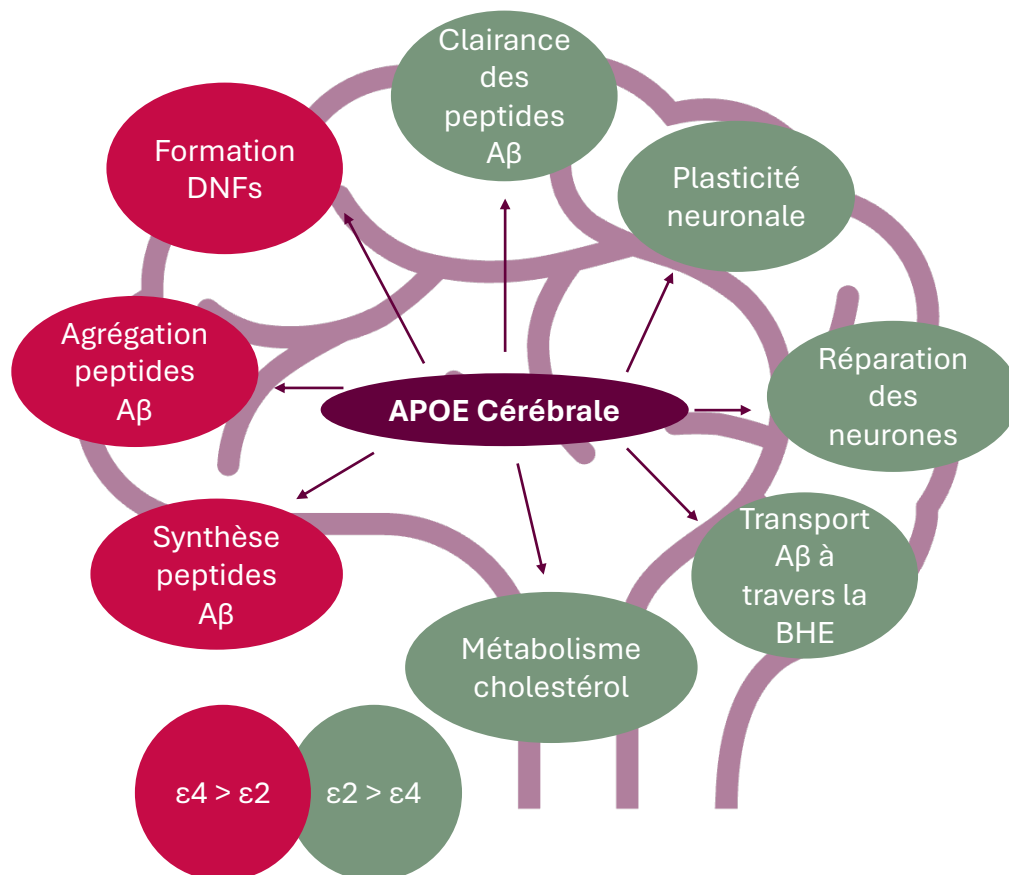


Figure 11 : Différentes fonctions cérébrales attribuées à la protéine APOE

L'isoforme APOε2 favorise certains mécanismes favorables au bon fonctionnement cérébral alors que l'isoforme APOε4 favorise plutôt des mécanismes délétères pour le cerveau. L'isoforme APOε3 n'a pas d'impact particulier dans un sens ou dans l'autre. BHE : barrière hémato-encéphalique, DNFs : dégénérescences neurofibrillaires, Aβ : amyloïde bêta. Source : extrait de (Gosselet, 2012)

Dans les cas familiaux, plusieurs gènes ont été identifiés comme étant directement impliqués dans le développement de la maladie : APP, PSEN1, PSEN2 et MAPT. Les trois gènes APP, PSEN1 et PSEN2 sont liés puisque PSEN1 et PSEN2 sont deux gènes qui participent au clivage de la protéine APP, donnant ainsi plusieurs tailles de fragments fonctionnels de la protéine Aβ dont certains sont responsables de l'agrégation et des plaques bêta-amyloïdes. La protéine Tau (MAPT ou protéine associée aux microtubules tau) quant à elle est associée aux dégénérescences neurofibrillaires.

1.3.4. Protéines impliquées dans la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer

1.3.4.1. Protéine précurseur de l'amyloïde (APP)

La protéine précurseur de l'amyloïde (APP) est codée par le gène du même nom (encore appelé AAA; AD1; PN2; ABPP; APPI; CVAP; ABETA; PN-II; preA4; CTFgamma; alpha-sAPP) (Gencards, GC21M025880). APP se trouve sur le chromosome 21 en position 21q21.3 sur le génome humain de référence GRCh38.p14¹¹ (NCBI, GeneID 351). Ce gène comporte 20 exons et 11 transcrits¹² (NCBI, NM_000484.4). La protéine APP comporte trois isoformes majoritaires : APP695, APP7751 et APP770. Dans le cerveau, l'isoforme principalement retrouvée est l'isoforme APP695 qui joue un rôle important dans la différenciation neuronale. Cependant, quand des problèmes neuropathologiques surviennent, l'expression des isoformes APP751/APP770 augmente dans les astrocytes et la microglie (Zheng & Koo, 2011; T. Zhang et al., 2020).

La protéine APP est un récepteur de surface cellulaire qui possède également un domaine trans-membranaire ainsi qu'une dernière partie cytoplasmique. Cette protéine subit deux clivages différents au cours de sa maturation par différentes sécrétases générant ainsi différents peptides. Deux voies de clivages sont possibles : une voie non-amyloïdogénique et une voie amyloïdogénique. Seule

¹¹APP amyloid beta precursor protein [*Homo sapiens* (human)], <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=DetailsSearch&Term=351>, Consulté le 30/09/2024

¹²https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NM_000484.4, Consulté le 30/09/2024

cette dernière est la voie qui produit les différents fragments bêta-amyloïdes dont ceux pathogènes (Bolduc et al., 2016; G.-F. Chen et al., 2017).

Dans la voie non-amyloïdogénique, deux sécrétases sont impliquées dans le clivage de la protéine APP : une α -sécrétase, qui est un complexe enzymatique composé de plusieurs protéines : la a désintégrine et métalloprotéinase 9 (ADAM9), ADAM10 et ADAM17. La protéine ADAM10 est la principale protéine impliquée dans le clivage de la protéine APP en deux fragment APP α et fragment alpha C-terminal (α -CTF ou C83). Le dernier fragment, α -CTF, est ensuite clivé par un second complexe enzymatique γ -sécrétase. Ce complexe est composé de 4 protéines : préséniline 1 (PSEN1), préséniline 2 (PSEN2), anterior pharynx-defective 1 (APH-1) et nicastrine (NCSTN). Les deux protéines PSEN1 et PSEN2 sont les unités catalytiques responsables du clivage de α -CTF en fragments p3 et domaine intracellulaire APP (AICD) (**Figure 12**) (Bolduc et al., 2016; G.-F. Chen et al., 2017; T. Zhang et al., 2020).

Dans la voie amyloïdogénique, la protéine APP est également clivée par deux sécrétases : β -sécrétase, composée d'une seule protéine qui est l'enzyme de clivage APP β -site 1 (BACE1), qui coupe APP en deux fragments APP β et fragment bêta C-terminal (β -CTF ou C99). Le deuxième fragment est ensuite recoupé par le complexe enzymatique γ -sécrétase, même complexe que dans la voie non-amyloïdogénique composé de quatre protéines PSEN1, PSEN2, NCSTN et APH1. Les deux fragments obtenus par le clivage de ce complexe sont amyloïde bêta (A β) et AICD (Bolduc et al., 2016; G.-F. Chen et al., 2017; T. Zhang et al., 2020). La **Figure 12** récapitule les deux voies de maturation de l'APP.

Dans la maladie d'Alzheimer, c'est la voie amyloïdogénique qui est impliquée. Les fragments A β générés par la γ -sécrétase, notamment les fragments A β 42, vont avoir tendance à s'agréger. L'accumulation de ces agrégats au cours de la vie d'un individu serait une des origines possibles de la neurodégénérescence observée dans la maladie d'Alzheimer.

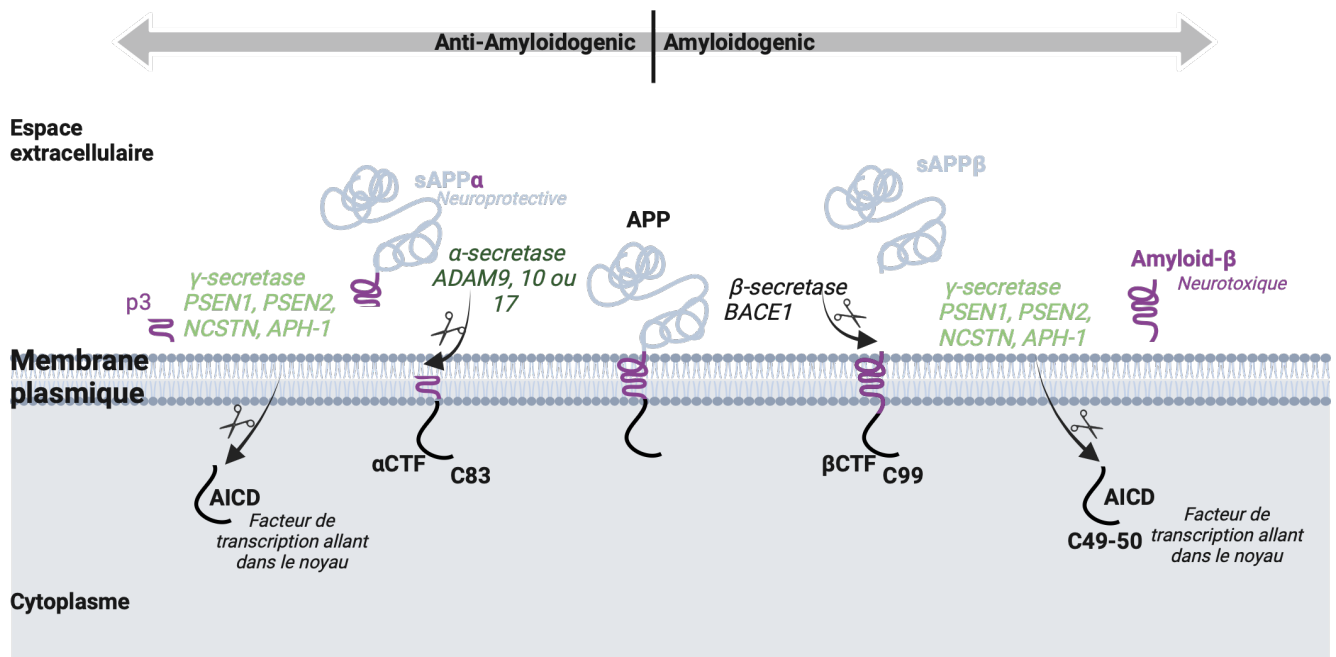


Figure 12 : Deux voies de maturation de l'amyloïde précurseur protéine (APP)

Les deux voies de clivage de la protéine APP sont présentées dans le schéma. Les protéines composant chaque domaine de complexe de clivage sont annotées en dessous du nom de leur complexe. ADAM : a désintégrine et métalloprotéinase, BACE1 : enzyme de clivage APP β -site 1, PSEN1 : présiline 1, PSEN2 : présiline 2, APh-1 : anterior pharynx-defective 1, NCSTN : nicastrine AICD : domaine intracellulaire APP, CTF : fragment C-terminal. Figure adaptée de (Haass et al., 2012).

Bien que la phosphorylation de la protéine APP soit beaucoup moins étudiée que l'hyperphosphorylation de la protéine Tau, son étude pourrait également être intéressante pour comprendre la genèse et l'évolution de la maladie d'Alzheimer. L'hyperphosphorylation de la protéine APP comme la protéine tau affecterait la cascade amyloïde et pourrait induire l'apoptose de la cellule (Zheng & Koo, 2011). Le domaine cytoplasmique de la protéine APP comporte 8 sites de phosphorylation possibles : 3 sites pour des résidus thréonine aux positions T654, T668 et T686, 2 sites pour des résidus sérine en position S665 et S675 et enfin 3 résidus tyrosine aux positions Y653, Y682 et Y687, indiqués en rouge sur la **Figure 13** (Zheng & Koo, 2011). Il a été montré que dans la maladie d'Alzheimer 7 des 8 sites sont phosphorylés, seul le site T654 ne l'est pas. Cela suggère que les phosphorylations de APP peuvent avoir un très fort impact sur les fonctions physiologiques ainsi que la maturation, c'est-à-dire le clivage, de la protéine APP au sein du système nerveux central (SNC) (M. S. Lee et al., 2003). La phosphorylation du résidu T668 favoriserait le clivage amyloïdogène de la

protéine APP (Colombo et al., 2009). De plus, l'élévation de la phosphorylation T668 de la protéine APP pendant la mitose au niveau des phases G2/M augmente la quantité d'APP immature ainsi que des fragments C-terminaux tout en réduisant le niveau des produits APP sécrétés (Suzuki et al., 1994).

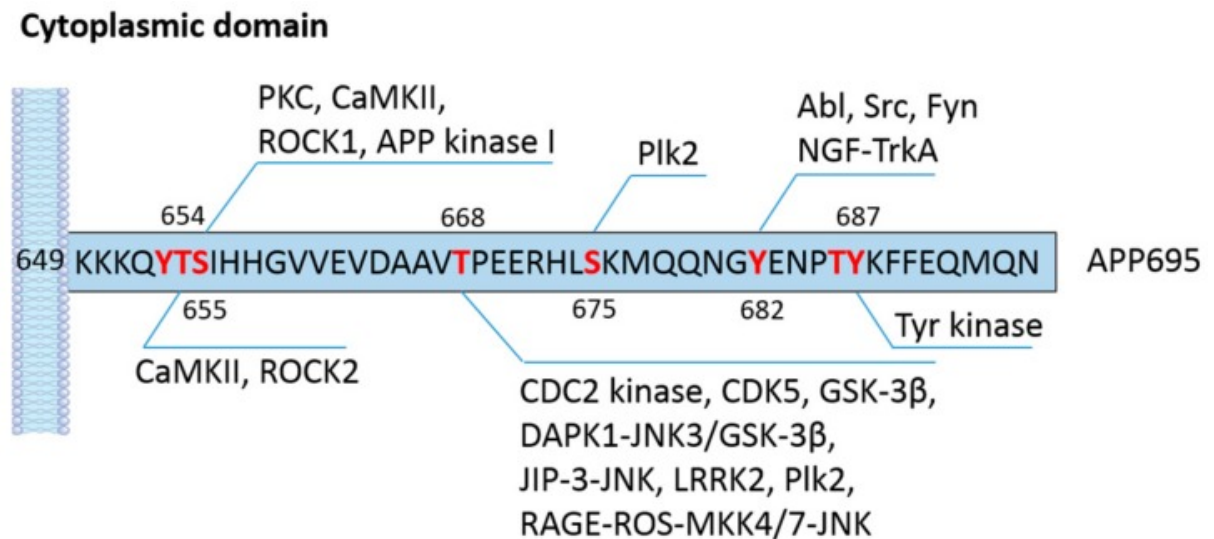
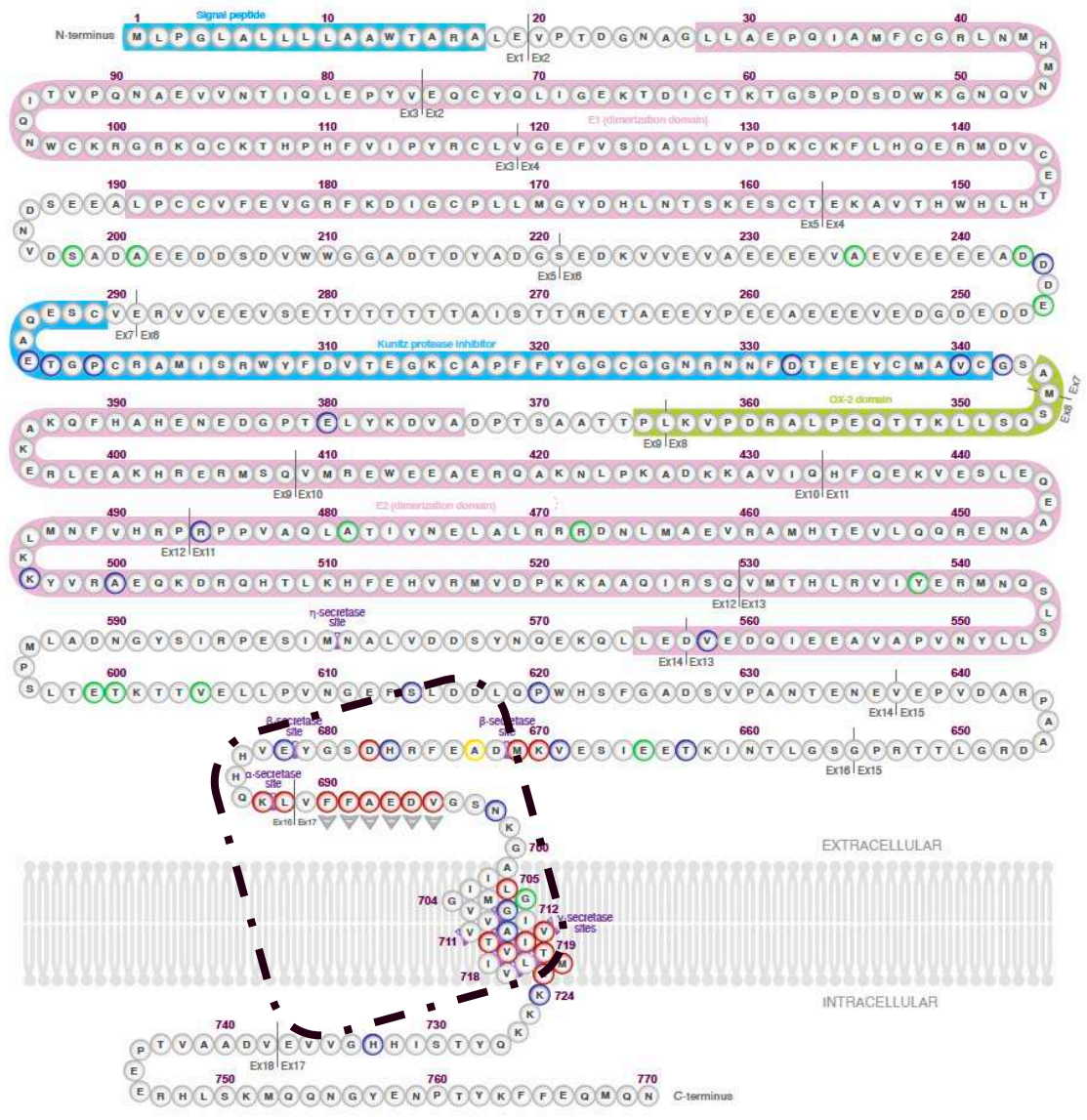


Figure 13 : Sites de phosphorylation dans le domaine cytoplasmique de APP695

Les 8 sites de phosphorylation du domaine cytoplasmique de la protéine APP ont été annotés en rouge. Les kinases et voies de signalisation capables de phosphoryler chaque site sont indiquées. Figure extraite de (T. Zhang et al., 2020)

De nombreuses mutations dans le gène APP ont été identifiées comme causant la maladie d'Alzheimer. Actuellement, une centaine de mutations différentes ont été répertoriées concernant la maladie d'Alzheimer mais certaines de ces mutations et quelques autres ont été recensées comme participant au déclenchement d'autres pathologies comme l'angiopathie amyloïde cérébrale, la maladie de Parkinson ou le syndrome de Down. Ces informations sont recensées dans la base de données du projet Alzforum¹³ (Alzforum Mutations APP, Août 2024). Les mutations provoquant la maladie d'Alzheimer sont principalement situées sur 4 exons : 7, 12, 17 et 21. Les mutations sont localisées à plus de 90% dans les régions codantes¹³. Enfin, il est important de noter que plus de deux tiers des mutations répertoriées sont des substitutions de nucléotides¹³, ce qui signifie que la protéine est entièrement exprimée (**Figure 14**).

¹³Mutations APP, <https://www.alzforum.org/mutations/app>, Consulté le 21 août 2024



Amyloid-β (Aβ)



Copyright © 1998-2023
ALZFORUM Foundation Inc.
All Rights Reserved.
Version 3.5

Schematic of APP Protein.
Variants are named according to amino acid positions in
isoform 1 (Uniprot: P05067), which has 770 amino acids.
Amino acids 280-384, not present in neuronal APP695 isoform.

- Pathogenic
- Likely Pathogenic
- Benign / Likely Benign
- Protective
- Uncertain Significance / Not Classified

Figure 14 : Représentation de la protéine APP

La protéine est représentée avec tous ses acides aminés et les différents domaines. Les acides aminés mutés sont entourés en rouge ou orange si la mutation favorise un développement pathologique, en vert si elle n'a aucun effet, en bleu si la significativité n'a pas pu être déterminée et en jaune si la mutation est prédictive. Les sites de clivage

sont indiqués à l'aide de triangles violets. Figure extraite de Alzforum Erreur ! Signet non défini..

1.3.4.2. Préséniline 1 et présélinine 2 (PSEN1/PSEN2)

La protéine présénile 1 (PSEN1) est codée par le gène du même nom ou encore appelé AD3; FAD; PS1; PS-1; S182; PSNL1; ACNINV3 (GeneCards, GC14P073136). Le gène PSEN1 se trouve sur le chromosome 14 en position 14q24.2 sur le génome humain de référence GRCh38.p14 (NCBI, GeneID 5663, Août 2024). Ce gène comporte 13 exons et plusieurs transcrits ont été identifiés pour ce gène (NCBI, NM_000021.4, Août 2024).

La protéine présénile 2 (PSEN2) est codée par gène du même nom ou encore appelé AD4; PS2; AD3L; STM2; CMD1V (GeneCards, GC01P226870). Le gène PSEN2 se trouve sur le chromosome 17 en position 17q21.31 sur le génome humain de référence GRCh38.p14 (NCBI, GeneID 4137). Ce gène comporte 16 exons et deux transcrits alternatifs ont été identifiés pour ce gène (NCBI, NM_001377265.1).

Les protéines PSEN1 et PSEN2 font partie du complexe γ -sécrétase, complexe impliqué dans les deux voies de maturation empruntées par la protéine APP. Les deux autres protéines appartenant au complexe γ -sécrétase sont les protéines NCSTN et APH-1. Comme mentionné précédemment, ces deux protéines sont l'unité enzymatique active responsable du second clivage de la protéine APP pour donner soit p3 et AICD soit $A\beta$ et AICD (T. Zhang et al., 2020; Zheng & Koo, 2011). Il a été montré que les deux protéines PSEN1 et PSEN2 ont une homologie de 65% (Bagaria et al., 2022).

Plus de 300 mutations différentes sur le gène PSEN1 ont été décrites dans la littérature comme mutations aboutissant au développement de la maladie d'Alzheimer (Alzforum Mutations PSEN1¹⁴). Concernant le gène PSEN2, un peu moins d'une centaine de mutations ont été répertoriées à ce jour (Alzforum Mutations PSEN2¹⁵).

Les mutations dans le gène PSEN1 sont les mutations les plus fréquemment observées dans les formes familiales de la maladie d'Alzheimer, suivies par les mutations dans les gènes PSEN2 et APP avant les doubles mutations dans les gènes APP et PSEN1 (Zekanowski & Wojda, 2009).

1.3.4.3. Protéine associée aux microtubules tau (MAPT)

¹⁴Mutations PSEN1, <https://www.alzforum.org/mutations/psen-1>, consulté le 21 août 2024

¹⁵Mutations PSEN2, <https://www.alzforum.org/mutations/psen-2>, consulté le 21 août 2024

La protéine associée aux microtubules tau (MAPT) est codée par le gène du même nom ou encore appelé TAU; MSTD; PPND; DDPAC; MAPTL; MTBT1; MTBT2; tau-40; FTDP-17; PPP1R103; Tau-PHF6 (GeneCards, GC17P045894). MAPT se trouve sur le chromosome 1 en position 1q42.13 sur le génome humain de référence GRCh38.p14 (NCBI, GeneID 5664). Ce gène comporte 17 exons et 6 transcrits ont été identifiés pour ce gène (NCBI, NM_000447.3).

Tau est une protéine qui comporte 6 isoformes, présentées sur la **Figure 15**, qui sont exprimées de manière différente au cours de la vie d'un individu. L'épissage alternatif de cette protéine joue sur la présence ou l'absence des exons 2, 3 et 10. La protéine tau possède deux domaines en N-terminal qui correspondent à l'exon 2 et l'exon 3 (1N ou 2N) qui sont des séquences de 29 et 58 acides aminés respectivement. La protéine tau possède également un domaine en C-terminal de trois à quatre répétitions (3R ou 4R) de 31 à 32 acides aminés dont la quatrième répétition correspond à l'exon 10. La protéine tau est capable de promouvoir la polymérisation/dépolymérisation des tubulines et également de favoriser la stabilité de la structure en se liant aux microtubules. Cette zone de trois ou de quatre répétitions est une zone de liaison aux microtubules. Le fait d'avoir cette quatrième répétition, c'est-à-dire la présence de l'exon 10, permet ainsi un assemblage plus rapide des microtubules (Goedert et al., 1989; Takuma et al., 2003).

La protéine Tau est une protéine principalement exprimée dans le système nerveux central (SNC) et plus particulièrement localisée dans les neurones au niveau des axones (**Tableau 2**). La protéine Tau physiologique joue un rôle essentiel dans le maintien, la survie et le bon fonctionnement neuronal. La protéine tau protège les neurones contre les dommages à l'ADN, joue un rôle dans l'assemblage et la stabilisation des microtubules, régule le transport des organelles le long des axones et promeut la croissance des neurones (Reddy, 2011; Sultan et al., 2011). Toutes les fonctions dans lesquelles la protéine Tau est impliquée sont régulées par des mécanismes de phosphorylation et déphosphorylation. La protéine tau possède 85 acides aminés phosphorylables dont 45 sites sont des sérines, 35 sites sont des thréonines et les 5 derniers sites sont des tyrosines (Hernández et al., 2009). Les phosphorylations de la protéine tau ont été étudiées dans des échantillons de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Dans ces échantillons seuls 40 des 85 sites identifiés ont montré des marques de phosphorylation dont 28 sites pour la sérine, 10 sites pour la thréonine et 2 sites pour la tyrosine. La majorité des sites identifiés sont des sites de phosphorylation dont l'état peut être modifié par une seule enzyme la glycogène synthase kinase 3 (GSK3). Cette enzyme est capable de phosphoryler 17 résidus sérines et 6 résidus thréonine (Hanger et al., 2009).

Plusieurs études ont mesuré l'expression des différents isoformes de la protéine tau au sein de différents tissus principalement cérébraux et à différents

âges de la vie. Les données de plusieurs études, (Gao et al., 2000; Wei & Andreadis, 1998), ont été rassemblées dans l'article de (Andreadis, 2005).

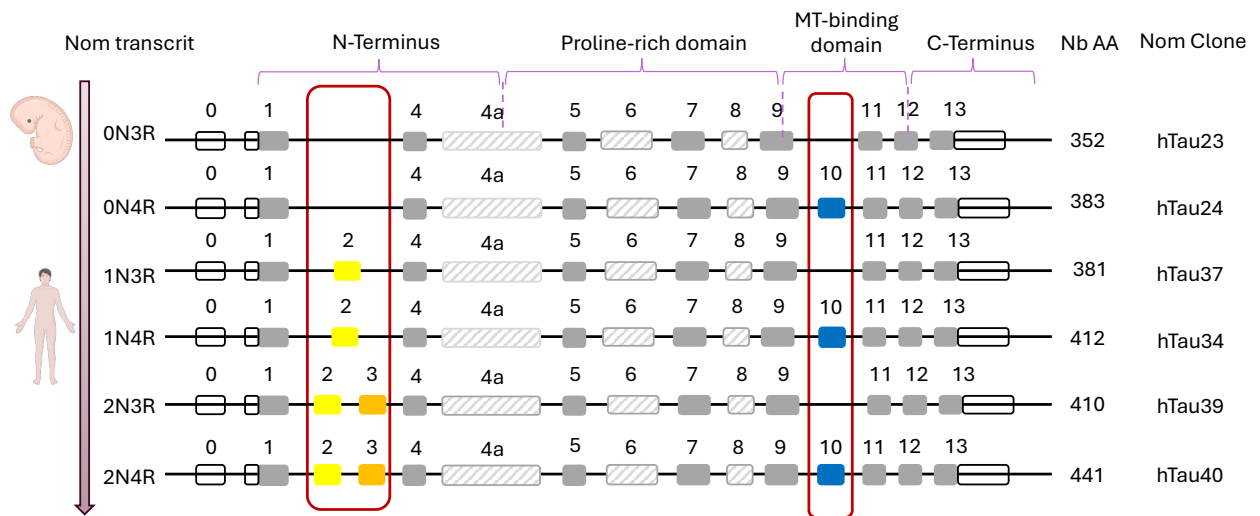


Figure 15 : Les six isoformes de la protéine Tau

Les différents isoformes sont obtenus grâce à l'épissage alternatif des exons 2, 3 et 10. Figure adaptée de (Bakota & Brandt, 2016; Goedert et al., 1989)

Tissu	Exon			Isoformes Majeures
	2	3	10	
Cerveau fœtal	-	-	-	0N3R
Cortex adulte	+++	+	+++	0N3R, 0N4R, 1N3R, 1N4R
Cervelet	+++	+	+++	0N3R, 0N4R, 1N3R, 1N4R
Hippocampe	+++	+	+++	0N3R, 0N4R, 1N3R, 1N4R
Moelle épinière	++	+	++	0N3R
Muscle squelettique	+++	++	+++	1N4R

Tableau 2 : Niveau d'expression des différents transcrits de MAPT par RT-qPCR dans différents tissus humains

Les +++ correspondent à un niveau d'expression + de 50% de cette isoforme, les ++ correspondent à un niveau d'expression de 20 à 40% de cet isoforme et le + correspond à un niveau d'expression maximal de 10% de cet isoforme. Le tableau est adapté (Wei & Andreadis, 1998; Gao et al., 2000; Andreadis, 2005).

1.3.5. Théories de genèse et propagation de la maladie d'Alzheimer

Plusieurs théories se sont succédées voire opposées au cours de ces dernières années pour essayer d'expliquer la genèse de la maladie d'Alzheimer. Les deux principales théories discutées sont la théorie de la cascade bêta-amyloïde et l'hypothèse de l'hyperphosphorylation de Tau. Enfin, une troisième théorie se développe en essayant de concilier les deux premières théories et d'expliquer la genèse de la pathologie : l'hypothèse d'une ré-entrée des neurones dans le cycle cellulaire.

1.3.5.1. La théorie cascade bêta-amyloïde

La théorie de la cascade amyloïde développée depuis les années 1990 permet d'expliquer l'apparition de la maladie d'Alzheimer ainsi que son aspect évolutif (Hardy & Higgins, 1992). La métabolisation de la protéine APP par la voie amyloïdogénique donne plusieurs fragments A β de tailles différentes, notamment A β 40 et A β 42, principaux constituants des plaques amyloïdes qui seraient à l'origine de la maladie. Comme mentionné précédemment, les protéines PSEN1 et PSEN2 participent au métabolisme de la protéine APP. Dans les cas familiaux de la maladie, une ou plusieurs des trois protéines se trouvent être mutées et ces mutations favoriseraient le métabolisme de fragments A β qui s'agrègent. L'agrégation des fragments A β fait partie intégrante de la classification de la progression de la pathologie par Braak & Braak (Braak & Braak, 1991).

Pour essayer de comprendre l'origine, la propagation et l'évolution de la pathologie, différentes études ont été menées. Il a été démontré que la propagation de la pathologie dans le cerveau se ferait de proche en proche rappelant un mécanisme de type prion. Cette théorie est également supportée par le fait que des mutations dans le gène APP ont été montrées comme impliquées dans l'apparition de cas précoces de la maladie (Cam et al., 2018).

Plusieurs études montrent que les agrégats A β auraient un rôle facilitateur pour l'agrégation de la protéine Tau. Les causes de l'état de santé du patient resteraient cependant les dégénérescences neurofibrillaires composées de la protéine Tau (Frisoni et al., 2022). En effet, des études sur des modèles animaux,

dont l'expression du gène Tau a été réduite par knock-down, a montré que l'agrégation A β n'a pas été réduite bien que les symptômes ainsi que le développement des signes physiopathologiques soient retardés (Hefter et al., 2020).

1.3.5.2. La théorie de la protéine Tau

La théorie de la protéine Tau stipule que l'hyperphosphorylation de la protéine entraînant son agrégation et ainsi l'apparition de dégénérescences neurofibrillaires soit l'élément initiateur de la maladie. Les différentes isoformes de la protéine Tau ainsi que leur niveau de phosphorylation minimal ont permis d'établir une signature caractéristique de la maladie d'Alzheimer.

Cependant, ces dégénérescences neurofibrillaires ont longtemps été considérées comme non spécifiques de la maladie d'Alzheimer car retrouvées dans différentes pathologies comme le syndrome de Down (SD ou T21) ou la démence fronto-temporale (DFT). Bien que ces dégénérescences neurofibrillaires soient présentées comme non-spécifiques, il semble que l'agrégation et la diffusion des plaques suivent également un mécanisme de diffusion de type prion-like.

Comme évoqué précédemment, une des principales enzymes responsables de l'hyperphosphorylation de tau est l'enzyme GSK3 (**Figure 16**). Dans le modèle murin, il a été montré que la sur-expression de GSK3 aboutissait à une hyperphosphorylation de tau. La toxicité de la protéine tau n'a pas été associée à ses agrégats, mais plutôt à sa forme phosphorylée. Ces observations suggèrent que c'est la phospho-tau, et non les agrégats de tau, qui serait responsable de la toxicité cellulaire observée (Lim et al., 2001; Lucas et al., 2001). Une autre étude confirmerait cette hypothèse suggérant que les plaques neurofibrillaires de tau sont protectrices et augmenteraient la longévité (Morsch et al., 1999).

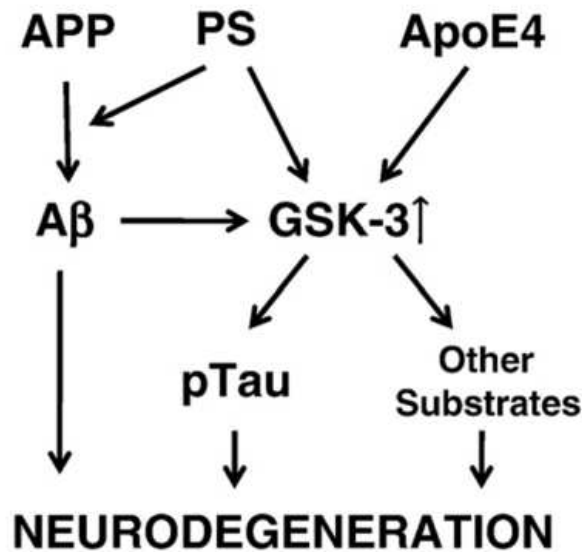


Figure 16 : Schéma des relations des principales voies impliquées dans la maladie d'Alzheimer

Les mutations dans la protéine précurseur de l'amyloïde (APP) et les protéines présénilines (PS) peuvent conduire à une augmentation de la quantité du peptide amyloïde (Aβ) ou à un manque d'interactions entre les PS et la cadhérine. La conséquence, dans chaque cas, provoque une augmentation de l'activité GSK3. A l'inverse, la présence de différentes isoformes ApoE peut réguler de différentes manières l'activité GSK3. L'activation de GSK3 modifie la protéine Tau (PTau) et d'autres substrats. Tous ces changements peuvent être toxiques pour un neurone et induire la mort cellulaire. Figure extraite de (Hernández et al., 2009).

Bien que ces deux théories soient souvent considérées comme contradictoires, certaines études suggèrent qu'elles pourraient en réalité être complémentaires. De plus, les différentes protéines impliquées dans les formes familiales de la maladie d'Alzheimer sont des protéines connues pour être impliquées dans le cycle cellulaire (Sokol & Lahiri, 2023).

1.3.5.3. Alzheimer et le cycle cellulaire

1.3.5.3.1. Dynamique du cytosquelette pendant le cycle cellulaire

Dans les cellules de mammifères, le cytosquelette d'une cellule est ce qui lui donne sa forme et son maintien. Le cytosquelette comporte trois principaux composants : les filaments intermédiaires, les microtubules et les microfilaments d'actine (Hohmann & Dehghani, 2019). Dans le cycle cellulaire, le remodelage de la cytoarchitecture de la cellule est un facteur primordial pour que la division cellulaire ait lieu. Deux principales protéines sont impliquées dans ce remodelage du cytosquelette : l'actine et la myosine II non musculaire. Les filaments d'actine

(F-actine) sont formés à partir de monomères d'actine globulaire (G-actine) (Gibieža & Petrikaitė, 2021). Le processus de polymérisation et dépolymérisation de l'actine est contrôlé par deux enzymes principales : la profiline qui favorise la polymérisation et la cofiline qui déstabilise les filaments d'actine (Kudryashov & Reisler, 2013; Svitkina, 2018). L'implication du remodelage du cytosquelette dans le cycle cellulaire a été démontrée par le fait qu'un des premiers points de contrôle du cycle cellulaire est la vérification de la forme et de la taille de la cellule. L'activation de ce point de contrôle produit une perturbation du cytosquelette d'actine qui peut générer des retards dans la ségrégation des chromosomes (McMillan et al., 1998). En plus du retard potentiel dans la mitose, la rupture des filaments d'actine peut arriver et entraîner un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Gibieža & Petrikaitė, 2021). Ce point de contrôle a d'abord été trouvé chez la levure (McMillan et al., 1998) avant d'être trouvé chez l'homme (Lew, 2003). De plus, la F-actine est le principal constituant du fuseau mitotique sur lequel les chromosomes vont s'accrocher et se séparer durant le cycle cellulaire (Woolner et al., 2008).

La cortactine, une protéine à liaison de l'actine, a été identifiée comme jouant un rôle important dans le cycle cellulaire. Cette protéine a un rôle d'ancrage entre le centrosome et les filaments d'actine. Son rôle est essentiel pour la séparation du centrosome engendrée par la F-actine au cours de la mitose. Sans l'action de cette protéine, la séparation des centrosomes est inhibée (Wang et al., 2008). La cortactine interagirait également avec la CDK1, enzyme régulatrice de la mitose.

Dans la mitose, l'actine a été étudiée principalement dans le cas de la cytokinèse. Deux études ont montré que l'actine ne pouvait pas être la seule protéine impliquée dans le remodelage de la cellule dans le cycle cellulaire. L'interaction actine-myosine II est nécessaire pour obtenir la séparation des centrosomes dans les cellules de mammifères (Rosenblatt et al., 2004; Uzbekov et al., 2002). Leur interaction est importante dans l'anneau contractile car c'est ce qui permet de générer les différentes forces nécessaires pour aboutir au clivage du corps intermédiaire (Heng & Koh, 2010).

1.3.5.3.2. La théorie de l'implication du cycle cellulaire dans la maladie d'Alzheimer

Dans le cerveau, il a été démontré qu'il existait des zones neurogéniques, zones composées de cellules souches, capables de produire des nouveaux neurones. Les principales zones identifiées sont situées dans les ventricules latéraux (VL), les zones ventriculaires (ZV) et les zones subventriculaires (ZSV) (Dehay & Kennedy, 2007). Lors de la génération de nouveaux neurones, les mécanismes de réparation et de régulation du cycle cellulaire sont présents. Il a été montré qu'environ 10 % des neurones sont aneuploïdes ou présentent une

hyperploïdie, c'est-à-dire ayant un nombre anormal de chromosomes (Iourov et al., 2006), et que ce pourcentage de cellules aneuploïdes reste constant au cours du temps, contrairement à ce qui peut être observé dans d'autres organes comme le foie ou le cœur (Nandakumar et al., 2021). Cette idée fait consensus : ces neurones aneuploïdes participeraient à un phénomène de mosaïsme dans l'établissement de circuits neuronaux stables. Cependant, une augmentation des neurones aneuploïdes est caractéristique de toutes les déficiences mentales (Arendt, 2012). Pour expliquer ce phénomène d'augmentation, plusieurs hypothèses ont été proposées.

Une division prématurée du centrosome (DPC) aurait comme conséquence une perte de contrôle sur la séparation et la ségrégation des chromosomes, événements qui arrivent juste après la duplication du centrosome qui a lieu pendant l'interphase. Les cellules souches neuronales générées, leurs descendances ainsi que les cellules différenciées qui en découlent seraient alors aneuploïdes (Moh et al., 2011; Spremo-Potparević et al., 2008). Une étude a montré que les principaux signaux cellulaires favorisant la DPC seraient des pertes de connexions synaptiques, de l'hypoxie cérébrale, une accumulation $A\beta$, certains facteurs hormonaux comme l'estrogène ou encore des mutations au sein du gène PSEN1 (Spremo-Potparević et al., 2008). La DPC est un phénomène qui a été observé chez les patients atteints d'Alzheimer notamment les formes sporadiques (Zekanowski & Wojda, 2009).

Une autre hypothèse impliquerait la responsabilité d'une enzyme impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, la kinase dépendante de la cycline 2 (CDK2). CDK2 est une enzyme cycline dépendante et peut être associée à deux cyclines en fonction de la progression du cycle cellulaire. Comme évoqué précédemment, CDK2 est associée à la cycline E en phase G1 et la cycline A en phase S (Currais et al., 2009). CDK2 pourrait induire de manière putative des instabilités au niveau du centromère. Elle joue également un rôle crucial pour la progression de la mitose, le maintien de la cohésion des chromatides sœurs, l'accomplissement total de la mitose et peut ainsi jouer un rôle dans l'entrée en apoptose d'une cellule. Le complexe CDK2/CDC2 est sur-exprimé dans la maladie d'Alzheimer, notamment au niveau des dégénérescences neurofibrillaires (DNF) et des cellules gliales. Cette sur-expression pourrait être due à une dérégulation du cycle cellulaire induisant ainsi la destruction de la cellule via la voie apoptotique (Currais et al., 2009).

Une troisième hypothèse a proposé un mécanisme de ré-entrée dans le cycle cellulaire de neurones déjà différenciés qui conduirait à terme à la neurodégénérescence. Cette idée de ré-entrée dans le cycle cellulaire existe depuis maintenant plusieurs dizaines d'années (Arendt, 1993; Heintz, 1993; Arendt et al., 1998; Raina et al., 1999). Cette hypothèse n'est pas construite en opposition par rapport aux deux autres. En effet, les deux hypothèses présentées précédemment pourraient agir de manière concomitante dans l'initiation et la

progression de la maladie d'Alzheimer en induisant une ré-entrée des neurones dans le cycle cellulaire (**Figure 17**).

Lorsqu'une cellule est passée par le cycle cellulaire et a fini de se différencier, elle entre en phase G0 (**Figure 6**). Pour rappel, la phase G0 est une phase de quiescence que la cellule différenciée de manière terminale ne quittera plus jusqu'à sa mort (Ishikawa & Hasebe, 2015; Staropoli & Abeliovich, 2005). Une cellule différenciée peut réentrer dans le cycle cellulaire dans de rares cas notamment lorsque la cellule est soumise à des facteurs de stress (Raina et al., 1999; Zekanowski & Wojda, 2009). Cette ré-entrée peut aboutir au déclenchement d'un mécanisme d'apoptose au niveau de la cellule. Des marqueurs du cycle cellulaire ont été retrouvés dans les neurones de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Zekanowski & Wojda, 2009). Des investigations ont été menées dans plusieurs études pour comprendre la provenance de ces marqueurs qui ne devraient pas être présents. Ces investigations ont permis d'établir une nouvelle théorie : la ré-entrée des neurones dans le cycle cellulaire pourrait être la cause de la maladie d'Alzheimer.

Mosch et ses collègues ont montré que 1 à 2% des neurones étaient capables de ré-entrer dans le cycle cellulaire et de faire une mitose complète (Mosch et al., 2007). Cependant, dans le cas de la maladie d'Alzheimer, la plupart des neurones qui ré-entrent dans le cycle cellulaire expriment les cyclines D, E ou B (McPhie et al., 2003; Yang & Herrup, 2007). Ces trois protéines régulatrices du cycle cellulaire permettent le passage de la phase G1 à la phase S puis de la phase S à la phase G2. De ce fait, les différentes études ont démontré que la plupart des neurones qui ré-entraient dans le cycle cellulaire dans la maladie d'Alzheimer stagnaient en phase G1 ou en phase G2 (McShea et al., 2007; Nagy, 2007). Cette stagnation déclenche à terme l'apoptose du neurone et ainsi sa dégénérescence. Une étude a souligné que la ré-entrée des neurones dans le cycle cellulaire induirait à terme de la neurodégénérescence. Cette dégénérescence de 1000 à 2000 neurones par jour serait suffisante pour aboutir à l'effet phénotypique observé dans la maladie d'Alzheimer au terme de plusieurs dizaines d'années d'évolution (Zekanowski & Wojda, 2009).

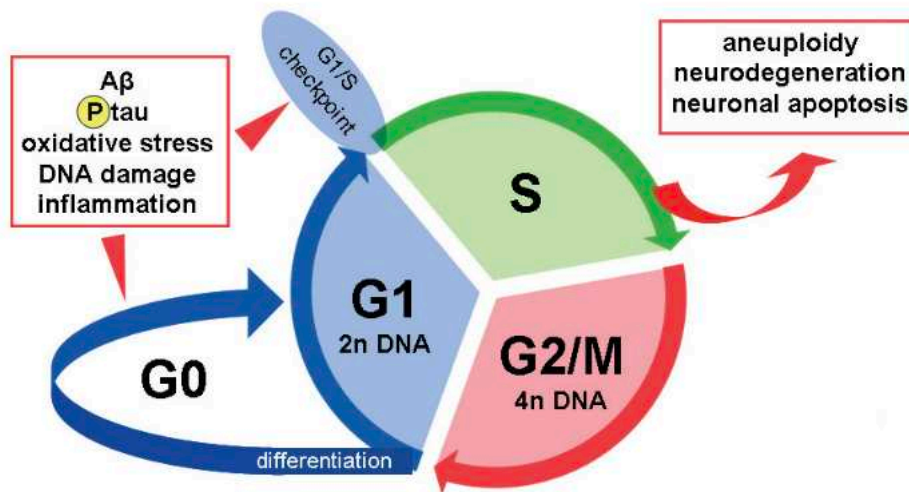


Figure 17 : Causes et conséquences de la réactivation du cycle cellulaire dans les neurones matures et différenciés en tant que composante pathogène importante de la maladie d'Alzheimer

Les neurones matures différenciés entrent dans le stade G0 du cycle cellulaire et deviennent résistants aux stimuli mitogéniques. Cependant, des impacts prolongés et répétitifs de signaux prolifératifs (Aβ, tau phosphorylé, stress oxydatif, dommages à l'ADN et inflammation) poussent les neurones différenciés à entrer dans le cycle cellulaire. L'échec du point de contrôle G1/S permet la synthèse de l'ADN, mais le cycle ne progresse pas au-delà de la phase S. Il en résulte une aneuploidie, une neurodégénérescence et la mort cellulaire. Figure extraite de (Zekanowski & Wojda, 2009).

La protéine tau permet la réorganisation du cytosquelette et ainsi des modifications structurales de la cellule en influant sur la polymérisation, dépolymérisation ainsi que la stabilisation des microtubules composées de fibres d'actine. Un autre rôle important de la protéine tau dans le cycle cellulaire est son implication dans le réseau de transport cellulaire. En condition physiologique, lors de la division cellulaire, la protéine tau est hyperphosphorylée (Schindowski et al., 2008; Conde & Cáceres, 2009; Bonda et al., 2010). Les formes hyperphosphorylées de la protéine tau retrouvées dans la maladie d'Alzheimer pourraient être dues à la ré-entrée des neurones dans le cycle cellulaire. La cellule bloquée en phase G2 exprimerait ainsi des formes hyperphosphorylées de la protéine et s'accumuleraient dans la cellule. Le neurone est une cellule hyperspécialisée qui a une structure très particulière notamment avec de longs prolongements axonaux et dont la structure est compliquée à remodeler entièrement (Conde & Cáceres, 2009; Bonda et al., 2010). Le cytosquelette ne pouvant adopter la bonne conformation pour entrer en mitose, le neurone reste bloqué en phase G2. Le blocage en phase G2 est toxique pour la cellule puisque tout le matériel génétique se trouve doublé, tout comme une importante augmentation du nombre de

mitochondries. A terme, la cellule, bloquée en cours de cycle cellulaire et soumise à des conditions de stress et de toxicité trop importantes, entre en apoptose.

La protéine APP est localisée au niveau de la membrane nucléaire ainsi qu'au niveau du centrosome pendant la division cellulaire (Y. Chen et al., 2000; Dranovsky et al., 1996; J. Li et al., 1997). La phosphorylation de la protéine APP durant la mitose entraîne une augmentation du métabolisme de l'APP et de la production de fragments A β 42 (H. Xu et al., 1996). L'augmentation de la production du fragment A β 42 favoriserait l'agrégation de la protéine amyloïde et à terme la perte neuronale. APP induit également la phosphorylation d'autres protéines dans le cycle cellulaire notamment celle de la protéine du rétinoblastome (Rb) (Thakur et al., 2008). L'hyperphosphorylation de Rb, en association avec d'autres protéines, arrête le cycle cellulaire ainsi que l'inhibition de l'expression de certaines protéines du cycle cellulaire. L'hyperphosphorylation de cette protéine et sa distribution anormale au sein du cytoplasme ont été montrées dans des cerveaux de patients Alzheimer et pourraient faire partie des causes de ré-entrée des neurones dans le cycle cellulaire (**Figure 18**) (Thakur et al., 2008).

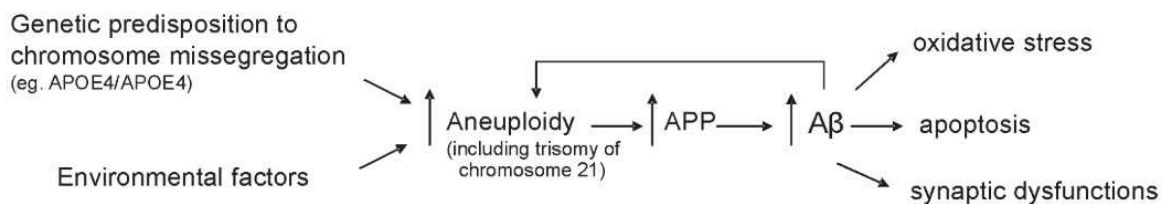


Figure 18 : Relation entre l'aneuploïdie des progéniteurs neuronaux (au cours du développement et dans le cerveau adulte) et les peptides A β toxiques dans la maladie d'Alzheimer et le syndrome de Down

L'aneuploïdie précède les changements dans l'expression de l'APP, comme dans le cas de la trisomie du chromosome 21 dans la DS. Il en résulte un niveau accru d'oligomères A β solubles qui, à leur tour, provoquent une altération et finalement la mort des neurones. Les oligomères A β peuvent augmenter le niveau d'aneuploïdie (boucle de rétroaction). Figure issue de (Zekanowski & Wojda, 2009).

Les protéines PSEN1 et PSEN2 jouent également un rôle important dans le cycle cellulaire présenté en **Figure 19**. Ces deux protéines pourraient servir d'ancres pour que les kinétochores, importants complexes protéiques présents à la jonction du fuseau mitotique et des chromosomes, puissent s'accrocher à la membrane nucléaire interne lors de l'interphase (Potter, 2005). PSEN1 et PSEN2 pourraient également aider la translocation des chromosomes durant cette phase (Zekanowski & Wojda, 2009). Il a été montré que des mutations dans le gène PSEN1 peuvent bloquer la translocation de la protéine PSEN1 au niveau de

l'enveloppe nucléaire (Honda et al., 2000). D'autres mutations dans le gène PSEN1 sont impliquées dans la déstabilisation et la dégradation accrue de la β -caténine, protéine impliquée dans la transcription génique. Ce phénomène peut aboutir à une déficience dans la signalisation de la voie β -caténine et ainsi altérer le cycle cellulaire (Weihl et al., 1999; Z. Zhang et al., 1998). De plus, les formes mutées de la protéine PSEN1 pourraient inhiber les liaisons des protéines qui interagissent avec le cytosquelette et des protéines associées aux microtubules comme tau (Janicki & Monteiro, 1999; Johnsingh et al., 2000). Enfin, comme évoqué précédemment, PSEN1 muté peut causer des altérations dans le clivage de la protéine APP, notamment le fragment AICD, mais également dans celui de la protéine Notch, avec le fragment NICD, protéine elle aussi impliquée dans le cycle cellulaire (Zekanowski & Wojda, 2009).

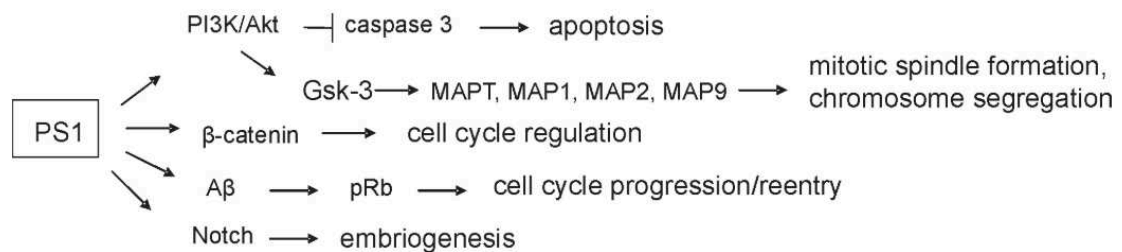


Figure 19 : Principales voies de signalisation de la préséniline 1 (PS1) affectant l'embryogenèse et le cycle cellulaire.

Les mutations de PS1 altèrent ces processus, ce qui entraîne un cycle cellulaire aberrant, l'aneuploïdie et l'apoptose. Figure extraite de (Zekanowski & Wojda, 2009).

En conclusion, les trois principales protéines impliquées dans les formes familiales de la maladie d'Alzheimer seraient impliquées dans la ré-entrée des neurones dans le cycle cellulaire. L'hyperphosphorylation des protéines APP et tau affecterait les mécanismes de la cascade amyloïde qui influencerait à son tour sur le cycle cellulaire et, à terme, aboutirait à l'apoptose des cellules.

1.3.6. Lien entre maladie d'Alzheimer et syndrome de Down (Trisomie 21)

Depuis les années 1990, un lien entre la maladie d'Alzheimer et le syndrome de Down (DS) ou trisomie 21 (T21) est étudié (Potter, 1991), le gène APP se trouvant sur le chromosome 21. La présence de la copie surnuméraire de ce chromosome a notamment des conséquences sur le neurodéveloppement du fœtus, une altération et une diminution de la prolifération cellulaire durant la neurogenèse (Contestabile et al., 2007). En plus de troubles lors du neurodéveloppement du patient T21, le développement d'autres troubles cognitifs au cours de la vie du patient T21 peuvent être associés à une forme pathologique de

neurodégénérescence pouvant s'apparenter à la maladie d'Alzheimer (Zekanowski & Wojda, 2009).

A partir de l'âge de 30 ans, il a été montré dans plusieurs études, par comparaison d'analyses des coupes histologiques de cerveaux de patients atteints de T21 comparées à celle de patients MA, que les patients ne pouvaient être distingués (Wisniewski et al., 1985; Petronis, 1999; Stanton & Coetzee, 2004). De plus, plus de 50% des personnes atteintes de T21 présentent des signes de démences à partir de l'âge de 50 ans. Dans les deux cas, des dysfonctionnements synaptiques observés peuvent être détectés avant 40 ans pour le DS, ce qui serait équivalent à une maladie d'Alzheimer d'un stade léger à modéré (Battaglia et al., 2008).

La présence de trois copies du gène APP va induire l'augmentation de l'expression de ce gène, ce qui influencerait sur sa maturation avec une augmentation de la présence du fragment A β 42. Cette l'augmentation pourrait être due, soit à une altération dans les processus de maturation de APP, soit à un effet direct de l'apoptose (Galli et al., 1998; Teller et al., 1996).

1.3.7. Les facteurs environnementaux impliqués dans la maladie d'Alzheimer

1.3.7.1. Introduction

Les origines des formes sporadiques de la maladie d'Alzheimer sont par définition inconnues. Ces origines peuvent être multiples, la pathogenèse de la maladie n'étant pas entièrement comprise. De ce fait, la plupart des modèles développés pour la maladie d'Alzheimer se concentre sur les formes familiales.

L'étude de la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer intègre désormais l'existence d'un exposome humain. Cette théorie explique que le phénotype d'un individu est le reflet de son expression génique ainsi que de son interaction avec son environnement, et évolue au cours de sa vie (Wild, 2005). Cet exposome humain serait divisé en 4 grandes catégories, auxquelles est confronté un individu tout au long de sa vie (Vermeulen et al., 2020):

- L'écosystème dans lequel il évolue, par exemple ville ou campagne, les mobilités, etc.
- Les interactions sociales qu'il sera amené à avoir (salaire, capital culturel, ...)
- Le style de vie (activité physique, consommation d'alcool, ...)
- Les expositions physiques et chimiques qu'il sera amené à avoir. Cette catégorie très vaste contient entre autres les conditions climatiques, l'exposition à la lumière, au soleil, les odeurs ou les bruits, la pollution de l'air ambiant, l'exposition à des pollens, moisissures ou champignons,

aux pesticides ou insecticides, à des matières plastiques ou encore toute autre forme de pollution.

Des exemples sont apportés dans la **Figure 20**.

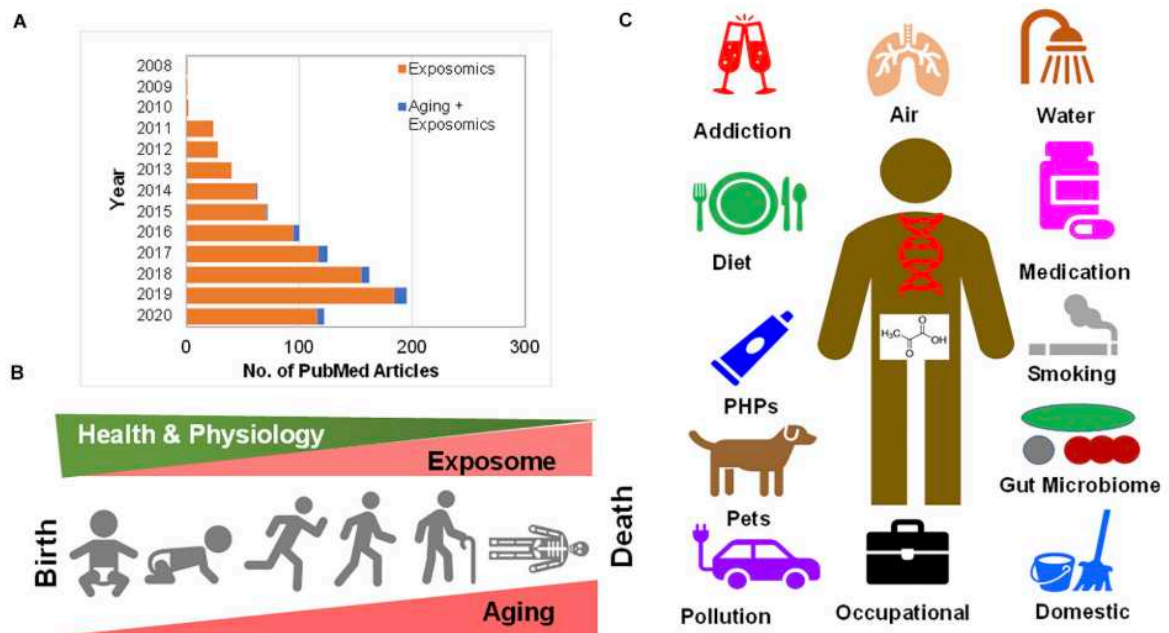


Figure 20 : Le vieillissement et l'exposome humain

(A) Augmentation des publications de recherche dans PubMed concernant la recherche sur l'« exposomique » et l'« exposomique et le vieillissement ». **(B)** Le vieillissement humain, de la naissance (néonatale) à l'adolescence et à l'ultime étape de la vie, la mort, est marqué par l'exposition aux produits chimiques qui nous entourent. Comme pour le vieillissement progressif, on assiste à un déclin physiologique, probablement dû à l'augmentation de l'exposition cumulative à l'intérieur du corps humain. **(C)** L'exposition chimique humaine comprend la dépendance (alcool, drogues, cocaïne et tabagisme), la pollution de l'air (particules, gaz, vapeurs industrielles), la qualité de l'eau (pollutions, pesticides et PFAS), la prise de médicaments (produits pharmaceutiques et médicaments), l'exposition au microbiome intestinal interne et externe, l'exposition aux déchets domestiques ainsi que la pollution intérieure (poussière, cuisson et gaz), les expositions professionnelles (désinfectants hospitaliers et asbestose), la pollution (combustion de combustibles fossiles et plastique), les animaux domestiques (qui transportent la pollution environnementale vers le microbiome), les produits d'hygiène personnelle (parfums et savons) et l'alimentation (et à la nutrition). Figure extraite de (Misra, 2020)

Cette dernière catégorie peut être divisée en deux. L'une des deux parties de cette catégorie a été définie comme un exposome chimique humain (ECH). Un individu va être exposé à environ 85,000 substances différentes en plus des substances naturelles au cours de sa vie (Cam et al., 2018). Dans cet ECH, des

substances ont été identifiées comme « Alzheimerogènes », créé en analogie à des substances carcinogènes. Cette théorie de l'ECH est encouragée par la découverte de molécules inductrices de l'amyloïde bêta quarante-deux (Aftin) (Hochard et al., 2013; Meunier et al., 2015). D'autres études cherchent à identifier des molécules susceptibles d'augmenter la sécrétion d'Aβ42, notamment des pesticides comme des herbicides triazine ou insecticides (Cam et al., 2018). Ce type de molécules pourraient aider à comprendre la survenue de la maladie d'Alzheimer chez certains patients, mais aussi permettre de modéliser les formes sporadiques de la maladie sans introduire de mutations spécifiques dans le génome.

1.3.7.2. Aftin-5

Comme évoqué précédemment, ce sont les formes sporadiques de la maladie d'Alzheimer qui sont les plus fréquentes. Il y a donc une volonté de trouver des stratégies alternatives pour modéliser ces formes de la maladie d'Alzheimer. Un des deux principaux symptômes de la MA étant l'augmentation de la production du fragment Aβ42 et du ratio Aβ42/Aβ40, un intérêt tout particulier a été mis sur la modulation des voies post-traductionnelles de l'APP. L'objectif est de pouvoir influencer sur l'activation et l'inhibition des sécrétases responsables du métabolisme post-traductionnel de l'APP.

Une précédente étude menée au sein du laboratoire a utilisé l'*Amyloid-β Forty-Two Inducers 5* ou Aftin-5 comme molécule permettant de moduler le métabolisme post-traductionnel de l'APP. Le nom chimique de l'Aftin-5 est (2R)-2-[[9-Isopropyl-6-(N-methylanilino)purin-2-yl]amino]butan-1-ol.

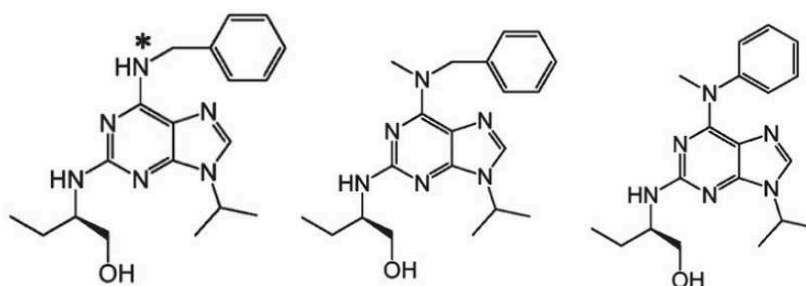


Figure 21 : Structure du composé Roscovitine, l'Amyloid-β Forty-Two Inducers 4 et l'Amyloid-β Forty-Two Inducers 5

Respectivement (2R)-2-[[6-(benzylamino)-9-propan-2-yl]purin-2-yl]amino]butan-1-ol ; $C_{19}H_{26}N_6O$, (2R)-2-[[6-[benzyl(methyl)amino]-9-propan-2-yl]purin-2-yl]amino]butan-1-ol ; $C_{19}H_{26}N_6O$ et (2R)-2-[[9-Isopropyl-6-(N-methylanilino)purin-2-yl]amino]butan-1-ol ; $C_{19}H_{26}N_6O$. Figure adaptée de (Hochard et al., 2013).

L'Aftin-4 et l'Aftin-5 sont des molécules dérivées de la roscovitine, également connue sous le nom de sélaciclib. La roscovitine est un composé qui inhibe la CDK5, une des kinases dépendantes des cyclines. La CDK5 est une des seules cyclines qui reste active dans les neurones post-mitotiques et joue des rôles importants dans la coordination de complexes neuronaux. De plus, il a été montré que la roscovitine est un composé qui est capable de passer la barrière hémato-encéphalique, tout comme ses dérivés dont l'Aftin-5 (SALLAM et al., 2008). Structurellement parlant, l'aftin-4 perd une liaison hydrogène au niveau de l'atome d'azote en position 7, qui est remplacé par un groupement methyl (CH₃). La différence structurelle entre l'Aftin-4 et l'Aftin-5 est la perte d'un groupement CH₃ au carbone 6 (C6) au niveau du cycle benzène, cycle benzène qui se lie directement à l'atome d'azote en position 7. Cette perte de l'hydrogène sur l'atome d'azote génère la perte de l'interaction avec les composées CDKs. De plus, il s'avère que les Aftins influent fortement sur le métabolisme de l'APP et donc sur le ratio A β 42/A β 40 qui joue un rôle majeur dans la maladie d'Alzheimer.

Des premiers tests de cette molécule ont été faits sur des lignées cellulaires de souris : la lignée N2a saine ou exprimant la forme humaine de APP695 mais aussi sur des lignées humaines, notamment la lignée SH-SY5Y (Hochard et al., 2013).

Cell line	Aftin-4	Aftin-5
SH-SY5Y	106	180
HT22	74	194
N2a	100	178
N2a-A β PP695	90	150

Tableau 3 : Comparaison de la cytotoxicité des aftines 4 et 5.

Plusieurs types cellulaires ont été exposés à des concentrations croissantes des deux molécules et la viabilité cellulaire a été testée par MTS assay. Les valeurs présentes dans le tableau sont en μ M et ont été générées à partir de courbes pour obtenir l'IC₅₀. (Hochard et al., 2013)

Dans une première étude menée au sein du laboratoire, le choix de l'Aftin-5 avait été fait parmi une librairie de 52 molécules d'aftins et d'analogues de purines, de par la possibilité d'utiliser l'Aftin-5 à forte dose de traitement (100 μ M) *in vitro* sur un temps d'exposition long (6 jours). De plus, son effet modulateur de la voie amyloïdogénique sur les fragments A β 38, A β 40 et A β 42 avait également un intérêt tout particulier. L'Aftin-5 joue sur le complexe de la γ -sécrétase impliqué dans le métabolisme de l'APP, ce qui provoque une forte augmentation de la production du fragment A β 42, une diminution de la production du fragment A β 38 mais

n'influe pas sur le niveau de production du fragment A β 40 qui reste stable. Les résultats de l'étude sont montrés sur la **Figure 22**. Les organoïdes cérébraux sont traités avec 150 μ M d'Aftin-5 à l'âge d'un ou deux mois. Les surnageants de culture sont récoltés 4 jours après traitement comme les organoïdes puis analysés. L'Aftin-5 n'induit pas l'augmentation de la quantité de fragments A β -42. Le ratio A β -42/ A β -40 est accru de manière significative (Pavoni et al., 2018).

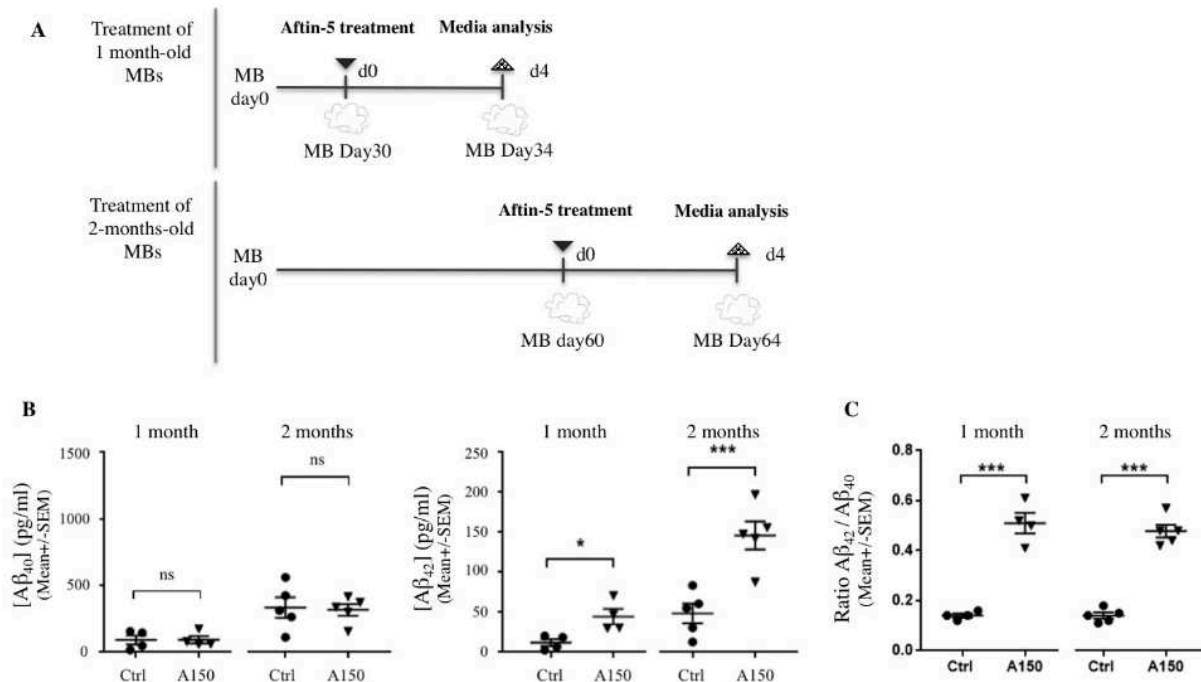


Figure 22 : L'induction chimique du clivage de APP *in vitro* augmente le ratio A β 42 et A β 42/A β 40 sans modifier les niveaux de A β 40.

(A) Représentation schématique des traitements à l'Aftin-5 ; des MBs âgés de 1 et 2 mois (représentations du haut et du bas respectivement) ont été traités une fois avec 150 μ M d'Aftin-5 pendant 4 jours avant de collecter les milieux conditionnés. (B) A β 40 (à gauche) et A β 42 (à droite) niveaux de concentration moyens dans le milieu conditionné mesurés par ELISA (MSD) ; les concentrations de peptides solubles A β 40 et A β 42 provenant du surnageant de véhicules traités avec du DMSO (Ctrl) ont été comparées aux concentrations obtenues à partir de MBs traitées avec de l'Aftin-5 (concentration de 150 μ M (A150)). (C) Rapports A β 42/A β 40 correspondant à des organoïdes âgés de 1 mois et de 2 mois mesurés par ELISA (MSD) dans les milieux conditionnés des MBs traités avec le véhicule témoin ou avec l'Aftin-5. Analyse statistique : test non paramétrique non apparié de Mann-Whitney. Sur les graphiques * : $p = 0,02$; *** : $p = 0,009$; ns : non significatif.

Ces premiers résultats étaient encourageants et ont incité l'équipe à continuer à explorer l'usage de l'Aftin-5 dans d'autres études.

2. Cellules souches pluripotentes

2.1. Introduction

La recherche sur le cerveau humain a longtemps été un défi car son accès y est très compliqué. Les études menées sur les maladies neurodégénératives l'ont été sur des cerveaux *post-mortem*, sur des stades avancés de la maladie, du fait de l'impossibilité d'avoir accès à des échantillons à des stades plus précoces. Les cultures organotypiques de tissus de cerveau humains étant possibles mais complexes à réaliser, plusieurs modèles ont été proposés pour étudier les pathologies cérébrales.

2.2. Cellules souches embryonnaires et cellules souches pluripotentes induites

2.2.1. Contexte historique

Dans le début des années 50, des chercheurs ont travaillé sur l'origine des tumeurs à partir de modèles murins. Il a été montré que certains de ces modèles ont des susceptibilités génétiques avec une propension plus grande de développer des types de tumeurs particuliers.

En 1954, l'équipe de Stevens a découvert une lignée de souris capable de développer une tumeur aux testicules, tératome, et qui ne se retrouve pas dans d'autres modèles murins. Pour rappel, les tératomes générés pour la caractérisation sont des tumeurs particulières issues d'iPSCs qui se développent dans des modèles murins immunodéprimés. Le contenu cellulaire de ces tumeurs est varié et fait penser à du tissu embryonnaire désorganisé (Mostofi & Price, 1973; Scully, 1979). Ces tumeurs se retrouvent également chez l'Homme : chez la femme, ces tumeurs sont presque toujours bénignes mais nécessitent une opération pour enlever la tumeur car elle peut atteindre une taille importante et engendrer le décès de la personne. Chez l'homme au contraire, la tumeur est presque toujours maligne et souvent désignée comme tératocarcinome. La différence entre un tératome et un tératocarcinome provient de la présence dans le tératocarcinome de cellules indifférenciées se comportant comme des cellules souches embryonnaires. Ces cellules indifférenciées ont été isolées pour la première fois en 1964 par Larry Kleinsmith and Barry Pierce. Ils ont montré qu'une cellule isolée à partir d'un tératocarcinome et transplantée dans une autre souris donnait naissance à une nouvelle tumeur chez cette souris (Kleinsmith & Pierce, 1964). D'autres études ont permis de montrer que ce type de cellules étaient également retrouvées dans les tératocarcinomes humains (Andrews, 2024). Ces cellules indifférenciées ont été caractérisées comme des carcinomes embryonnaires (CEs) en 2007 (Damjanov & Andrews, 2007). Dans les années qui ont suivi, plusieurs lignées issues de CEs provenant de tératocarcinomes humains ont été établies.

Une différence majeure observée entre les CE humaines et murines est que la plupart des CE murines sont diploïdes avec très peu de réarrangements chromosomiques, alors que les CE humains sont aneuploïdes, la plupart du temps triploïdes. Cette différence majeure pourrait expliquer la différence de pouvoir de différenciation observée entre les CE humaines très faible et les CE de souris se rapprochant fortement de celui de cellules souches embryonnaires (Andrews, 2024).

L'idée qu'un lien puisse exister entre ces CE et l'embryogenèse a émergé. En parallèle de ces recherches en oncologie et la découverte de ces cellules CE, deux études publiées en 1981 décrivent l'isolement de cellules à partir de la masse cellulaire interne (MCI) d'embryons de souris au stade blastocyste et leur mise en culture avec succès (Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981).

Les deux principales caractéristiques de ces cellules souches embryonnaires sont :

- Leur capacité d'auto-renouvellement
- Leur potentiel de différenciation dans les trois feuillets embryonnaires que sont l'ectoderme, le mésoderme et l'endoderme. Elles n'ont pas la capacité de pouvoir se différencier dans des types cellulaires extra-embryonnaires comme le placenta.

En 1995 puis en 1996, Jamie Thomson et ses collègues publient deux études importantes démontrant la possibilité de dériver des cellules souches embryonnaires à partir de la masse cellulaire interne de blastocystes de primates non humains : macaque rhésus et marmouset (Thomson et al., 1995, 1996). Cette étape est une avancée majeure vers l'établissement d'un modèle de cellules pluripotentes humaines, et deux ans plus tard, l'équipe de Thomson publie le premier article sur des cellules souches embryonnaires humaines (Thomson et al., 1998). Comme précédemment, les cellules sont issues de la masse cellulaire interne d'un embryon cinq jours après fécondation n'ayant pas été implanté chez la patiente lors d'une fécondation *in vitro*. A ce stade, la masse cellulaire interne (MCI) du blastocyste correspond à un nombre de cellules compris entre 50 et 150 cellules.

Cependant, l'obtention de ces cellules reposant sur la destruction d'un embryon humain, des problèmes d'ordre éthique ont été soulevés et ont mené à l'élaboration de lois strictes sur leur utilisation en France et dans le monde. Les lois, qui viennent réguler les pratiques au niveau de l'utilisation des embryons à des fins scientifiques, sont les lois de bioéthiques de 1984 et de 2004. Avant la loi de bioéthique, l'utilisation des ES humaines a été interdite sauf dérogation en France. La loi française a été révisée à plusieurs reprises et la loi qui régit actuellement la bioéthique sur la recherche sur l'embryon et les cellules souches embryonnaires est la loi relative à la bioéthique de 2021.

En 2006, une alternative à l'utilisation de cellules souches embryonnaires est apportée avec les cellules souches pluripotentes induites (iPSCs). Deux chercheurs japonais, Shinya Yamanaka et Kazutoshi Takahashi, ont identifié chez la souris, parmi 24 gènes exprimés par les cellules souches pluripotentes, 4 gènes dont l'expression peut induire la reprogrammation de fibroblastes murins en cellules souches pluripotentes ayant des caractéristiques similaires aux cellules souches embryonnaires murines (Takahashi & Yamanaka, 2006). Un an plus tard, les deux chercheurs réitérèrent les mêmes travaux mais sur des fibroblastes humains en utilisant la forme humaine de ces quatre facteurs de reprogrammation : Oct3/4, Sox2, Klf4 et c-Myc (Takahashi et al., 2007). Le nom attribué à ce type de cellules est cellule souche pluripotente induite (iPSCs). Le gros avantage de cette technique est la possibilité d'utiliser des cellules de patients. Pour cette découverte, le chercheur, Shinya Yamanaka, est corécepteur en 2012 du prix Nobel de physiologie et de médecine avec John Gurdon. Il faut noter qu'en 2007, J. Thomson publie une autre liste de facteurs de reprogrammation pour obtenir des iPSCs humaines Oct3/4, Sox2, Nanog, Lin28 (Yu et al., 2007).

2.2.2. Reprogrammation de cellules différenciées en cellules souches pluripotentes induites (iPSCs)

La génération de cellules souches pluripotentes induites est possible à partir de presque n'importe quelle cellule somatique. Depuis la publication de 2007, les sources de cellules somatiques, qui ont fait l'objet de reprogrammation, se sont diversifiées : cellules de peau, cellules sanguines, moelle osseuse, cellules cardiaques ou hépatiques, cellules urinaires (T. Zhou et al., 2012). Les prochaines parties s'intéressent aux rôles des différents facteurs de reprogrammation puis aux différentes techniques de reprogrammation qui se sont développées depuis la première publication de 2007.

2.2.2.1. Rôles des différents facteurs de reprogrammation

OCT3/4

La protéine *POU-domain transcription factor* (Pou5f1), aussi appelé Oct3, Oct4 ou Oct3/4, joue un rôle important dans les premières étapes de développement embryonnaire ainsi que dans le maintien du stade de pluripotence. La sur-expression du gène Oct3/4 autorise une différenciation cellulaire des iPSCs. Oct3/4 possède un domaine HMG (*High Mobility Group*) qui lui permet d'interagir avec plusieurs autres facteurs de transcription dont Sox2, un autre facteur de transcription dont l'importance est capitale lors de la reprogrammation.

SOX2

Sox2 (*Sex determining region Y- box transcription factor 2*) participe à la détermination cellulaire ainsi qu'au maintien de la capacité de différenciation dans un certain type de lignée spécifique. Tout comme pour Oct3/4, il a été montré qu'une sur-expression de la protéine Sox2 pousse la différenciation des iPSCs. De plus, une délétion d'un de ces deux gènes entraîne une perte de pluripotence et une différenciation des cellules en tissus trophoblastique.

NANOG

Homeobox protein NANOG ou Nanog est un facteur de transcription exprimé chez l'embryon dès le stade morula mais également au niveau masse cellulaire interne du blastocyste. Son rôle serait important dans le maintien à l'état de pluripotence en réprimant l'expression de facteurs de différenciation. Il a également été établi que Nanog est partiellement régulé par les facteurs de transcriptions Oct3/4 et Sox2. L'inhibition de l'expression de Nanog a été mesurée par analyse transcriptomique et comparée à l'inhibition de Oct3/4. Il s'avère que les conséquences, bien que similaires, ont des signatures transcriptomiques totalement différentes, ce qui signifie qu'elles n'ont pas du tout les mêmes modes d'action (Loh et al., 2006; Nishiyama et al., 2013).

OCT4, SOX2 et NANOG semblent se réguler mutuellement et il a été établi que ces trois gènes font partie d'une triade centrale dans la pluripotence ainsi que dans le processus de reprogrammation (Young, 2011). Il faut tout de même noter que le gène Nanog n'est pas souvent utilisé lors de ce processus.

KLF4

Krüppel-like factor 4 (Klf4) joue un rôle dans l'auto-renouvellement des cellules et a un rôle répresseur au début de la reprogrammation avant d'avoir un rôle d'activateur de certains facteurs de transcription. Il joue sur la prolifération, la différenciation et l'apoptose. Enfin, une très forte interaction entre les gènes Klf4, Oct3/4 et Sox2 a été montrée (Nakatake et al., 2006; Plath & Lowry, 2011).

C-MYC

Cellular-Myelocytomatosis (c-Myc) n'est pas un facteur indispensable pour la reprogrammation. Cependant, il a été constaté que son absence réduit fortement le taux d'efficacité de reprogrammation tout en rallongeant sa cinétique. Le gène c-Myc est impliqué dans de nombreux processus dont la prolifération, la différenciation et l'apoptose (Stadtfield & Hochedlinger, 2010). Il participe à la régulation des gènes en se liant à des séquences consensus présentes sur le génome appelées *Enhancer-Box* qui va permettre le recrutement d'enzymes capables de modifier la méthylation de la chromatine et ainsi rendre les gènes accessibles à la transcription. Son mécanisme d'action pourrait ainsi expliquer l'intérêt de l'utiliser lors de reprogrammation (Soufi et al., 2012; Takahashi & Yamanaka, 2016).

Il est possible d'obtenir des rendements supérieurs d'efficacité de reprogrammation en ajoutant aux facteurs de reprogrammation OCT4, SOX2, KLF4 et C-MYC l'antigène T du virus simien 40 (SV40) ou la télomérase humaine (hTERT) (I. H. Park et al., 2007). Enfin, une combinaison de 6 facteurs de reprogrammation est également possible, notamment lorsque les cellules se divisent peu ou sont difficiles à reprogrammer : Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog et Lin28 (Liao et al., 2008).

2.2.2.2. Techniques de reprogrammation

En 2007, la technique originale utilisée est une technique de reprogrammation utilisant des rétrovirus intégratifs (Takahashi et al., 2007). Cette technique a l'avantage d'avoir une grande efficacité de reprogrammation mais les facteurs de reprogrammation s'intègrent dans le génome de la cellule. Les gènes peuvent donc continuer à s'exprimer au cours du temps ce qui peut poser des problèmes de différenciation par la suite et aboutir à la formation de tumeurs chez l'animal (Stadtfield & Hochedlinger, 2010; Winkler et al., 2010).

De ce fait, des modifications au niveau des transgènes, l'utilisation des promoteurs inductibles, des séquences de clivage 2A ou encore des cassettes Cre/LoxP permettent de contrôler l'expression des transgènes, voire même leur enlèvement des sites d'insertion, une fois la reprogrammation cellulaire terminée (Al Abbar et al., 2020). Cependant, ces différentes techniques ont progressivement remplacé les techniques virales non-intégratives.

Des techniques de reprogrammation utilisant des vecteurs viraux non-intégratifs se sont développées ces dernières années afin d'obtenir des iPSCs plus sûres dans des visées médicales ou des modèles plus pertinents. Parmi celles-ci, la reprogrammation par le virus de Sendai (SeV) s'est répandue. Aussi connu sous le nom virus hémagglutinant du Japon (HSV), ce virus apporte les facteurs de reprogrammation sous forme d'ARN répliatif qui reste dans la cellule pendant plusieurs divisions cellulaires avant d'être dégradé. Le tropisme du SeV est étendu mais son efficacité en reprogrammation, tout comme celle des adénovirus, reste inférieure à celle des lentivirus (Fusaki et al., 2009; MacArthur et al., 2012)). Le fait qu'il n'y ait pas d'intégration apporte cependant un avantage de taille car il n'y a plus à prendre en compte le potentiel impact de la reprogrammation sur les futures différenciations cellulaires des iPSCs. De plus l'expression transitoire des transgènes permet de garder un profil épigénétique partiel de la cellule de départ (**Figure 23**) (Stadtfield & Hochedlinger, 2010).

Des techniques de reprogrammation n'utilisant pas de virus comme outil de délivrance du support génétique ont aussi été développées. Une première technique est l'utilisation de plasmides, un codant pour le gène c-Myc et un autre

polycistronique codant pour les quatre facteurs de reprogrammation (Okita et al., 2008). L'expression de ces plasmides est transitoire mais il a été montré qu'il y avait un risque d'intégration des plasmides en plus d'une très faible efficacité (Yamanaka, 2009). Deux autres systèmes ont été développés : la reprogrammation en utilisant le transposon PiggyBac (PB), qui permet une intégration réversible des facteurs de reprogrammation et qui a une efficacité élevée. Cependant, le génome humain possède des parties qui ressemblent au PB, l'excision du transposon PB peut donc aboutir à des modifications involontaires du génome humain. Pour contrer cet effet indésirable, le système *Sleeping Beauty* (SB) a été mis en place mais avec un taux de reprogrammation très faible comparé au transposon PB. De plus, lors de l'excision du système post reprogrammation un risque de réintégration existe (**Figure 23**) (Yamanaka, 2009; Stadtfeld & Hochedlinger, 2010; Davis et al., 2013; Grabundzija et al., 2013;).

Enfin, des techniques s'affranchissant de l'utilisation de vecteurs viraux et d'intégration dans le génome se développent. Les principales sont l'utilisation de plasmides épisomaux répliatifs, ou l'utilisation de ces facteurs sous forme d'ARN messenger (Al Abbar et al., 2020). L'utilisation de vecteurs épisomaux a pour principal désavantage un rendement de 5 à 10 fois moins bon que la reprogrammation avec des lentivirus (C. S. Lee et al., 2017). L'utilisation d'ARN présente de nombreux avantages bien que la plupart des systèmes développés nécessite plusieurs transfections successives pour aboutir à la reprogrammation complète des cellules (**Figure 23**) (Warren et al., 2010; Mandal & Rossi, 2013).

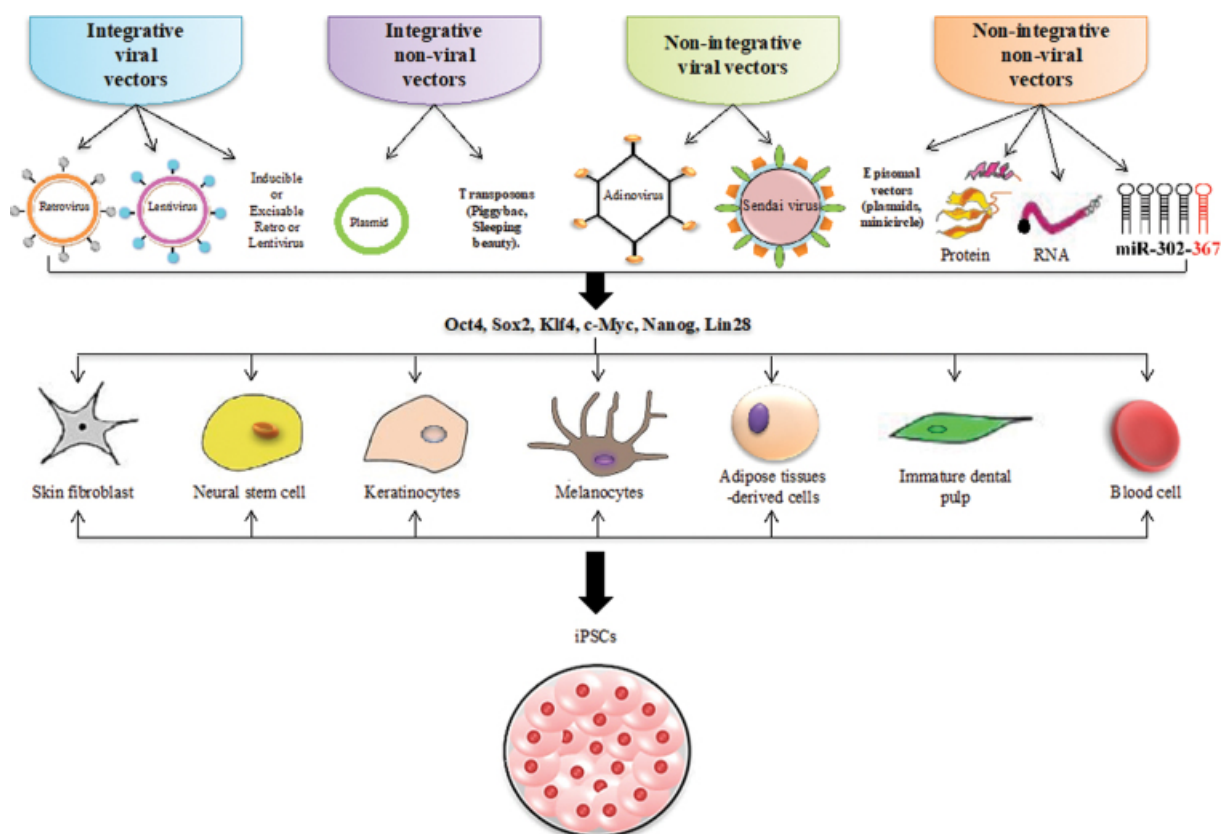


Figure 23 : Diverses sources cellulaires et stratégies de transfert pour la génération d'iPSCs

Les iPSCs ont été initialement dérivées de fibroblastes embryonnaires et cutanés de souris. Peu après, les scientifiques ont utilisé avec succès d'autres cellules somatiques dont l'efficacité de reprogrammation a été améliorée. Des progrès ont été réalisés dans le choix des facteurs de reprogrammation, notamment les facteurs de Yamanaka, Nanog et Lin28. Des vecteurs viraux intégrateurs comme les rétrovirus et les lentivirus ont été utilisés pour générer les premières lignées iPSCs. Par la suite, des vecteurs viraux non intégrateurs et des systèmes plasmidiques ont été utilisés. Récemment, des stratégies de transfert de reprogrammation utilisant des protéines recombinantes et isolées des ES ont été démontrées avec succès. Des approches plus récentes, telles que l'ARN modifié synthétique ou l'ARNm et les miARN, ont également été utilisées pour améliorer l'efficacité de la reprogrammation. miARN, microARN ; ARNm, ARN messenger.

2.2.2.3. Conditions de culture des iPSCs

Une fois obtenues, les cellules sont cultivées sur une couche de cellules nourricières composées de fibroblastes embryonnaires murins qui ont été mitotiquement inactivés (MEFs). Ces cellules MEFs sécrètent différentes substances capables de créer un micro-environnement favorable au développement des iPSCs. Cependant ces cellules MEFs ont besoin de sérum, qui peut être une source de xéno-contamination pour les iPSCs. Ces xéno-

contaminations peuvent poser problème notamment dans un contexte thérapeutique. Des efforts ont donc été déployés pour s'affranchir des cellules MEFs comme support de culture des iPSCs pour permettre d'avoir un environnement de culture un peu plus standardisé. Actuellement, il est possible de réaliser une reprogrammation sans utiliser de cellules nourricières.

Les cellules ainsi obtenues peuvent être maintenues en culture pendant de nombreux passages mais également subir des protocoles de différenciation en 2 ou 3 dimensions pour obtenir les cellules et tissus d'intérêt. Cependant, il a été montré que les iPSCs sont susceptibles d'acquérir des modifications génétiques après un long temps de culture. Les modifications les plus courantes sont l'acquisition du long brin supplémentaire du chromosome 1, 11, 17 ou 20 ou du petit brin du chromosome 12 (J. Halliwell et al., 2020). Elles sont cependant plus sensibles que les cellules somatiques au stress de réplication de l'ADN ainsi qu'à leurs cassures doubles brins (J. A. Halliwell et al., 2020). Ces deux principaux facteurs de susceptibilité vont permettre de déclencher l'apoptose des cellules anormales. Ajouté à cela leur fort taux de renouvellement, il a été montré que très peu d'anomalies génétiques s'accumulent au sein des cellules souches pluripotentes induites (J. A. Halliwell et al., 2020).

2.2.2.4. *Caractérisation des iPSCs*

La caractérisation des iPSCs obtenues est une étape clef pour ensuite pouvoir les utiliser. De par leur définition, il est important de vérifier leur capacité d'auto-renouvellement ainsi que leur capacité de différenciation dans les trois feuillets embryonnaires. Pour vérifier leur capacité d'auto-renouvellement les iPSCs sont gardées plusieurs semaines en culture, les cellules sont fixées à différents temps avant d'être marquées avec des marqueurs de pluripotence tels que Oct3/4, Sox2 ou Nanog. Des marqueurs de surface comme SSEA4, TRA1-60, TRA1-81 sont également regardés.

Pour tester leur capacité de différenciation dans les différents feuillets embryonnaires, il est courant d'injecter des iPSCs dans une souris immunodéprimée pour récupérer 3 à 4 semaines plus tard un tératome formé afin de l'analyser. Cependant, il est de plus en plus courant de vouloir s'affranchir de l'utilisation de l'animal en faisant de la différenciation spontanée *in vitro* avant d'être analysée comme les tératomes par immunomarquage ou séquençage.

En plus de s'assurer que les deux caractéristiques des cellules souches pluripotentes soient respectées, il faut aussi s'assurer de l'intégrité génomique des cellules. Comme mentionné précédemment, des anomalies chromosomiques peuvent avoir lieu ou encore des phénomènes d'aneuploidie. Un caryotype ainsi qu'un SNP sont donc nécessaires pour vérifier l'état génomique des cellules.

3. Modélisation de pathologies neurologiques

La découverte des cellules souches embryonnaires humaines avec la maîtrise de leur utilisation puis la génération de cellules souches pluripotentes induites ont ouvert de grandes perspectives en termes de modélisation de maladie mais également de thérapeutique. La technologie de reprogrammation en iPSCs offre la possibilité de reprogrammer des cellules de patients en cellules souches puis de les différencier en type cellulaire d'intérêt afin de les étudier par la suite. Un contrôle sain est nécessaire, cependant le contexte génétique est différent. En fonction des études réalisées, il peut être souhaitable, dans certains cas, de générer des mutations ponctuelles, qui sont connues pour causer des pathologies d'intérêt, de manière précise et ciblée afin d'étudier une pathologie avec un contrôle ayant le même fond génétique. Cela permet de s'assurer que les phénotypes observés entre les lignées ne sont bien provoqués que par la mutation.

3.1. Technologie CRISPR-Cas9

Les *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR) sont des séquences palindromiques répétées dans le génome des bactéries. Ces séquences vont constituer un système immunitaire adaptatif à base d'ARN, qui aide les procaryotes à lutter contre les bactériophages ou d'autres plasmides exogènes (Brookhouser et al., 2017). Il fonctionne en détruisant l'ADN étranger grâce à une endonucléase, appelée protéine associée à CRISPR (Cas), qui induit des coupures doubles brins (DSB). Le système immunitaire adaptatif fonctionne comme suit : premièrement, des séquences virales ou plasmidiques vont être intégrées dans le génome au niveau des PAM, deuxièmement par la biogenèse de l'ARN et enfin par la destruction ou la réduction au silence du génome étranger. Après l'acquisition de la séquence virale, trois types de mécanismes peuvent se produire (Brookhouser et al., 2017; Hsu et al., 2014). Seul le système de type II, qui utilise la protéine Cas9, nous intéresse. Les deux autres ne seront pas développés.

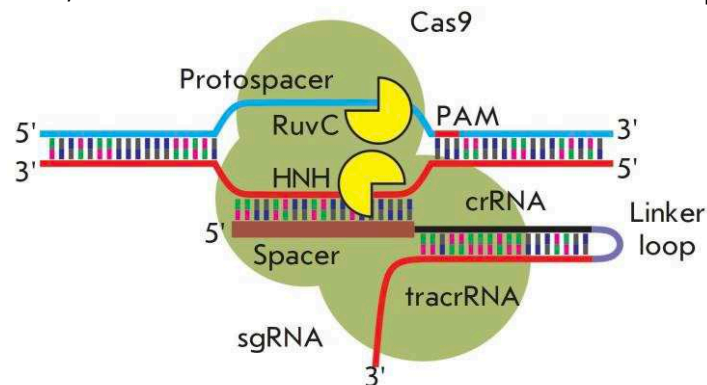


Figure 24 : CRISPR Cas 9 system

Le « spacer » est le modèle de reconnaissance avec le PAM. Il est lié à l'ARNc lui-même lié au tracrRNA grâce à la boucle de liaison en violet. Les deux domaines endonucléasiques, RuvC et HNH, sont en jaune. Figure extraite de (Nemudryi et al., 2014)

Ce système immunitaire procaryote a été adapté pour devenir un outil d'édition du génome. Cet outil se veut plus précis et plus spécifique que les nucléases à doigt de zinc (ZFN) et TALEN (*transcription activator-like effector nuclease*) (Jinek et al., 2012). L'objectif principal de CRISPR est d'induire un DSB, ce qui va déclencher un mécanisme de réparation cellulaire. L'outil CRISPR-Cas a été conçu pour imiter ce qui se passe naturellement lorsque ce système est activé. Un ARN guide simple brin (ARNg) a été conçu pour reconnaître une séquence complémentaire spécifique de l'ADN et est lié à l'ARN CRISPR (ARNc). L'ARNc transactivateur (tracrRNA) est un ARN complémentaire de l'ARNc et fait partie du complexe effecteur, qui guide la protéine Cas9 pour qu'elle crée la cassure. Ce tracrRNA est normalement libre dans le système initial, mais il a été fusionné à l'ARNc grâce à un linker dans l'outil d'édition de gènes (**Figure 24**). Comme la protéine Cas est guidée, lorsque la nucléase reconnaît la séquence du motif adjacent au protospacer (PAM), une DSB se produit 3 nucléotides avant ce motif (Jinek et al., 2012; Ran et al., 2013).

La première endonucléase Cas9 a été découverte chez *Streptococcus pyogenes* (SpCas9). La séquence PAM reconnue de cette espèce est 5'-NGG-3', qui est présent dans le génome humain environ tous les 8 pb (Karvelis et al., 2015). Cette abondance permet de cibler presque tous les gènes, même si parfois, le PAM n'est pas positionné exactement à l'endroit où le scientifique souhaite que la modification se produise. Lorsque la reconnaissance a lieu, un DSB est réalisé. Cas9 possède deux domaines endonucléasiques, le domaine RuvC et le domaine HNH, également appelés D10 et H840 respectivement (**Figure 24**). Le domaine RuvC clive le brin non complémentaire de l'ARNc, tandis que le domaine HNH clive le brin complémentaire de l'ARNc (Jinek et al., 2012; Ran et al., 2013). Ces deux activités endonucléasiques peuvent conduire dans certains cas à une moindre précision de l'édition du génome et à une augmentation du nombre de cibles non visées. Ces dernières années, le développement d'une nickase Cas9 (nCas9) a été réalisé pour tenter de résoudre certains problèmes rencontrés avec la Cas9 de type sauvage (wtCas9). L'un des domaines de l'endonucléase a subi une mutation ce qui peut permettre d'augmenter la spécificité car pour avoir une coupure des 2 brins, il faut 2 guides. Cette nCas9 ne provoquera qu'une rupture de simple brin (SSB), ce qui induira toujours une réparation dirigée homologue (HDR), étant donné que le *Non homologous end-joining* (NHEJ) n'est actif qu'en présence d'une DSB. De plus, pour étudier l'influence de certains facteurs sur les mécanismes cellulaires sans modifier le génome, les deux domaines de l'endonucléase ont été

mutés. Ainsi, le génome est précisément ciblé, pour activer la transcription d'un gène par exemple, mais aucune modification n'est effectuée (Brookhouser et al., 2017).

La SpCas9 est l'enzyme la plus utilisée, étudiée et connue. Des problèmes ont été rencontrés avec le SpCas9 en ce qui concerne ses vecteurs de conditionnement et de livraison. Selon les vecteurs utilisés, le SpCas9 peut être trop gros si d'autres composants doivent être emballés, des problèmes de ciblage ont également été enregistrés, ainsi que des problèmes d'immunogénicité et de mutagenèse insertionnelle. C'est pourquoi, depuis quelques années, d'autres endonucléases ont été développées telles que *Staphylococcus aureus* Cas9 (SaCas9), *Neisseria meningitidis* Cas9 (NmCas9), *Campylobacter jejuni* Cas9 (CjCas9), *Streptococcus canis* Cas9 (ScCas9) ou encore Cas12a, également appelée Cfp1 (**Tableau 4**) (Brookhouser et al., 2017; Baliou et al., 2018; Xu et al., 2019). Chaque endonucléase possède un PAM différent avec une longueur différente et une fréquence d'apparition différente dans le génome humain.

Cas9 Strain	PAM	Size	Type of Cut
SpCas9	5'-NGG	4.2 kb	Blunt
SaCas9	5'-NNGRRT	3.15 kb	Blunt
CjCas9	5'-NNNNRYAC	2.95 kb	Blunt
Cas12a	5'-TTTV	3.9 kb	Staggered

R = purine, Y = pyrimidine. V = Not U/T (A or C or G).

Tableau 4 : Différentes souches de Cas9 avec leurs principales caractéristiques

Tableau extrait de (Nemudryi et al., 2014).

3.2. Lignées tumorales humaines

Depuis 1951 et la première isolation de cellules d'une patiente atteinte d'un cancer des ovaires, de nombreuses lignées cellulaires, primaires ou tumorales, ont été décrites¹⁶. En 1978, l'isolation d'un clone issu d'une biopsie de moelle épinière de 1973, dans le laboratoire de June Biedler, a permis de générer une première lignée, SH-SY5Y, capable de pouvoir générer des neurones ayant plus ou moins un phénotype oncogénique de neuroblastome (Spengler et al., 2002). La lignée T98G, cellules isolées d'un neuroblastome, est également très utilisée dans la recherche sur des maladies cérébrales et a été isolée à la même période. Les lignées tumorales humaines, bien qu'initialement dérivées de cancers, sont utilisées pour

¹⁶ Jordan B., Chroniques génomiques - Henrietta Lacks et les cellules HeLa, https://www.medicinesciences.org/en/articles/medsci/full_html/2013/11/medsci20132911p1051/medsci20132911p1051.html, Consulté le 15 août 2024.

modéliser certains aspects de la maladie d'Alzheimer. Par exemple, la lignée comme SH-SY5Y, ayant les caractéristiques d'un neuroblastome humain, est couramment exploitée dans les études de neurobiologie pour sa capacité à se différencier en neurones sous certaines conditions. Ces lignées offrent un modèle accessible pour étudier les mécanismes de la neurodégénérescence, y compris les agrégations de tau ou de peptides bêta-amyloïdes, caractéristiques de la pathologie d'Alzheimer. Bien que ces lignées ne reflètent pas toutes les caractéristiques d'un neurone humain adulte, elles permettent d'explorer des voies de signalisation, des mécanismes de stress cellulaire, et des processus d'apoptose qui peuvent être pertinents pour la maladie. En outre, elles sont largement utilisées pour le criblage de molécules thérapeutiques et pour tester l'effet de traitements potentiels sur les processus neuronaux associés à la maladie d'Alzheimer, tout en offrant des avantages en termes de simplicité et de coût par rapport aux modèles dérivés de cellules souches.

Cependant, il faut noter que les lignées cancéreuses sont des lignées qui ont muté et acquis des caractéristiques qui leur ont permis de survivre dans leur environnement. A titre d'exemple, la lignée HeLa comporte aujourd'hui en moyenne 82 chromosomes mais ce chiffre peut varier de 70 à 164 (Cytion¹⁷). Il en va de même pour la lignée HEK293 qui est également une des lignées les plus utilisées mais a en moyenne 64 chromosomes (Cytion¹⁸)

Ces lignées cellulaires, cultivées en deux ou trois dimensions, ont permis de faire de nombreux progrès en recherche mais sont éloignés de la physiologie normale d'un individu.

3.3. Modèles de neurones en 2D

Les modèles conventionnels de culture de neurones en 2D ont été décrits pour la première fois par Rose G. Harrison et ses collègues en 1907 (Harrison et al., 1907). Les cellules sont cultivées sur des matrices comme la laminine, poly-ornithine, poly-lysine ou encore fibronectine pour favoriser l'adhésion des neurones ainsi que leur développement (Hazel & Müller, 1997; Hopkins et al., 2013).

Cependant, les modèles de différenciation de neurones en 2D manquent d'une complexité structurelle et organisationnelle par rapport à ce qui peut être observé dans un cerveau humain ou aux modèles animaux. De plus, les interactions cellules-cellules sont limitées puisqu'un seul type cellulaire est présent. L'utilisation d'un modèle en 2D va favoriser la diffusion de l'oxygène et des

¹⁷Cellules HeLa (cytion.com), Consulté Août 2024

¹⁸HEK293 Cells (cytion.com), Consulté Août 2024

nutriments (Anton et al., 2015; Hopkins et al., 2015). Il y a 2 sources possible de culture neurale en 2D : les cultures primaires, principalement issus d'animaux ou les cellules ES et les iPSCs depuis leur développement et utilisation. Les différentes limitations de ce modèle de différenciation neuronale en 2D peuvent impacter la morphologie cellulaire, la survie, la prolifération et la différenciation et donc potentiellement impacter la modélisation et la compréhension des mécanismes impliqués dans les pathologies neuronales (Centeno et al., 2018).

Différents protocoles ont été établis en utilisant différentes molécules permettant d'influer sur la fonction des types cellulaires voulus, de la spécialisation cellulaire souhaitée avec l'obtention de différents types de neurones particuliers ou encore de différents stades de maturation (**Figure 25**) (Y. Zhang et al., 2013). De plus, la plupart du temps les cellules en cours de différenciation ont besoin de cellules support comme des astrocytes ou des matrices comme de la poly-ornithine laminine par exemple.

Neural Stem Cell Differentiation Pathways & Lineage-specific Markers

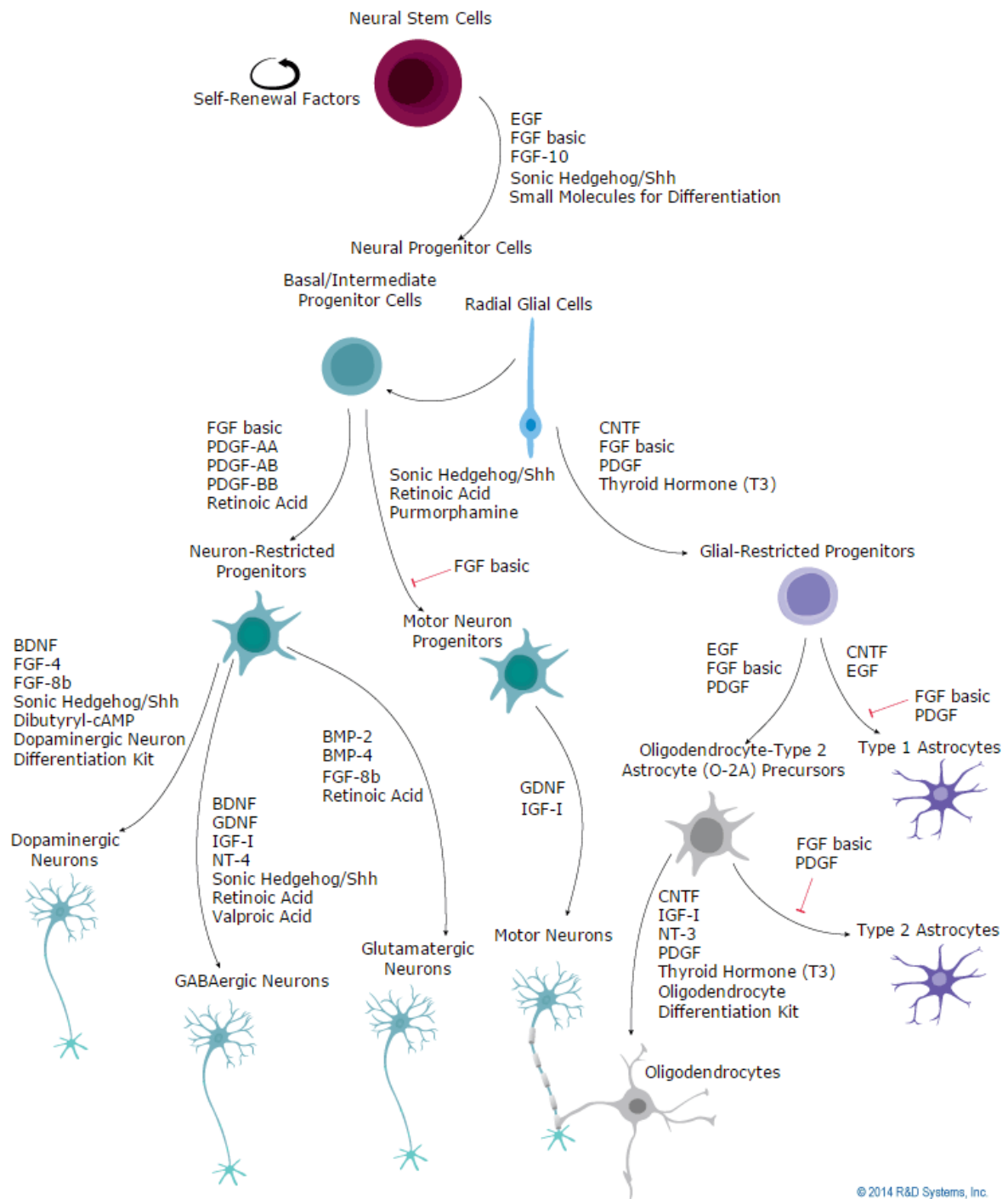


Figure 25 : Diagramme récapitulatif des différentes voies de différenciation et d'obtention des cellules cérébrales à partir d'iPSCs

Source : R&D System Inc. , Août 2024

Un nouveau protocole a été décrit par pour contourner les voies usuelles de différenciation utilisant l'expression d'un facteur de transcription impliqué dans la neurogenèse, la Neurogénine 2 (Ngn2) pour induire la différenciation (Y. Zhang et al., 2013). Ce protocole ne permet plus d'obtenir tout type de cellules comme les astrocytes ou oligodendrocytes.

Depuis la première publication de Zhang et de ses collègues, d'autres protocoles pour essayer d'obtenir les autres lignées cérébrales ont commencé à voir le jour. Un protocole de différenciation pour obtenir des astrocytes a été établi en partant de fibroblastes murins et en exprimant 3 facteurs de transcription Sox9, Nfia et Nfib (Caiazzo et al., 2015). Ce protocole de différenciation a été réalisé dans des fibroblastes humains avant d'être testé dans les iPSCs (X. Li et al., 2018; Quist et al., 2022). Concernant le dernier type cellulaire, les oligodendrocytes, la différenciation rapide à partir d'iPSCs en exprimant un ou plusieurs des facteurs de transcription SOX10, OLIG2 et NKX6.2 a été développée (Ehrlich et al., 2017). Bien que les modèles 2D présentent de nombreux avantages, en fonction de la question ou de la modélisation souhaitée, ils ont des limites. Le développement de modèles avec des structures plus complexes est à envisager.

3.4. Modèles en 3D

3.4.1. Sphéroïdes et organoïdes cérébraux

Les modèles de cultures cellulaires en 3D sont particulièrement pertinents pour modéliser les agrégations extracellulaires, comme celles des plaques bêta-amyloïdes dans la maladie d'Alzheimer, car ils reproduisent plus fidèlement l'architecture tissulaire et les interactions cellulaires complexes observées dans le cerveau humain. Contrairement aux cultures 2D, où les cellules sont réparties sur une surface plane, les modèles 3D (comme les organoïdes cérébraux ou les sphéroïdes neuronaux) permettent aux cellules de s'auto-organiser dans un environnement tridimensionnel, ce qui simule mieux les conditions *in vivo*. Les agrégats extracellulaires, comme les plaques amyloïdes, peuvent ainsi se former dans un espace interstitiel complexe, où les interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire jouent un rôle crucial. Dans les modèles 3D, les cellules interagissent plus physiologiquement avec leur environnement, permettant une diffusion et une accumulation plus réalistes des protéines agrégées. De plus, les modèles 3D imitent mieux la diffusion des nutriments et de l'oxygène, créant des gradients de concentration physiologiques qui influencent le comportement cellulaire et le développement pathologique, ce qui peut être un composant important pour étudier la dynamique de l'agrégation protéique.

L'une des premières publications concernant un assemblage en 3 dimensions de structures cérébrales à partir de cellules souches pluripotentes est publié par Eiraku et ses collègues en 2008 (Eiraku et al., 2008). L'équipe décrit un protocole

qui utilise une technique d'agrégation des cellules qui va former ce qui est appelé un corps embryoïde (EB). Cet EB est généré sans utiliser de sérum dans le milieu. Des changements de milieux successifs sont réalisés en utilisant des inhibiteurs spécifiques puis des molécules favorisant la différenciation en cellules d'intérêt. Les structures en 3 dimensions obtenues contiennent bien des structures neuronales fortement régionalisées (Eiraku et al., 2008).

En 2013, le premier protocole de différenciation d'iPSCs en organoïdes cérébraux « entiers » (OC) est publié par Lancaster et ses collègues et présenté sur la **Figure 26**. Lancaster s'inspire du protocole généré par Eiraku en 2008, mais une des grandes différences est basée sur l'absence de molécules d'inhibition de voies de signalisation. La première étape commence par la génération de corps embryoïdes dans un milieu bFGF restreint et ROCK inhibiteur élevé ce qui va favoriser la différenciation en neuroectoderme (Kamishibahara et al., 2016). Les corps embryoïdes qui se développent vont au onzième jour être enrobés dans du Matrigel (Corning), provenant d'un sarcome murin d'Engelbroth-Holm-Swarm. Cependant, le Matrigel étant obtenu à partir de préparations cellulaires, sa composition peut ainsi varier d'un lot à l'autre ce qui peut impacter ses propriétés. Le Matrigel a deux principaux rôles : une matrice support pour les cellules et l'apport d'un cocktail de facteurs de croissance qui va accélérer le développement structural et fonctionnel de l'OC. Une fois l'OC enrobé, il va être mis dans des milieux riches en suppléments N2 et B27 (Lancaster & Knoblich, 2014).

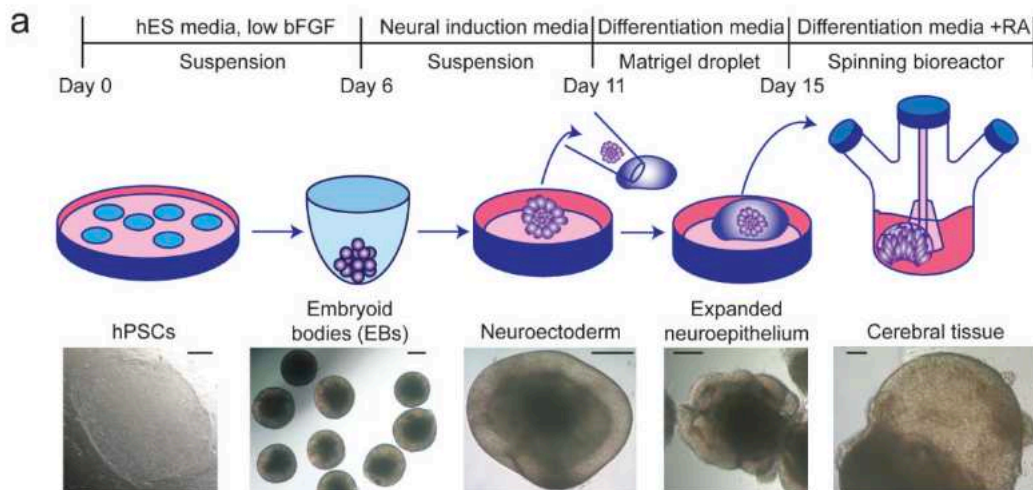


Figure 26 : Diagramme descriptif des différentes étapes de différenciation des iPSCs en organoïdes cérébraux entiers du protocole de Lancaster *et al.*

Source : (Lancaster & Knoblich, 2014)

Le protocole de génération d'organoïdes cérébraux développé par Lancaster est un protocole qualifié de non-guidé car aucune molécule n'est ajoutée dans le milieu pour favoriser la différenciation vers une zone précise du cerveau. Cependant, la mise en place de la fine régulation durant l'embryogénèse qui permet le développement cérébral ne peut être mis en place facilement *in vitro*. De ce fait, le développement des différents organoïdes comporte une très grande hétérogénéité ce qui peut poser des problèmes de reproductibilité.

Pour essayer de réduire cette hétérogénéité et obtenir une meilleure reproductibilité, d'autres équipes ont développé des protocoles de différenciation dits « guidés », en utilisant différents morphogènes. Pour obtenir du neuroectoderme, l'inhibition de la voie SMAD est obtenue par l'ajout de molécules inhibitrice comme BMP et TGF β . Pour obtenir une régionalisation dorsoventrale, il faut inhiber la voie BMP/WNT et activer la voie SHH et pour obtenir une régionalisation rostrocaudale, l'inhibition et l'activation de voies grâce à l'utilisation d'acide rétinoïque, de WNT et de bFGF (**Figure 27**).

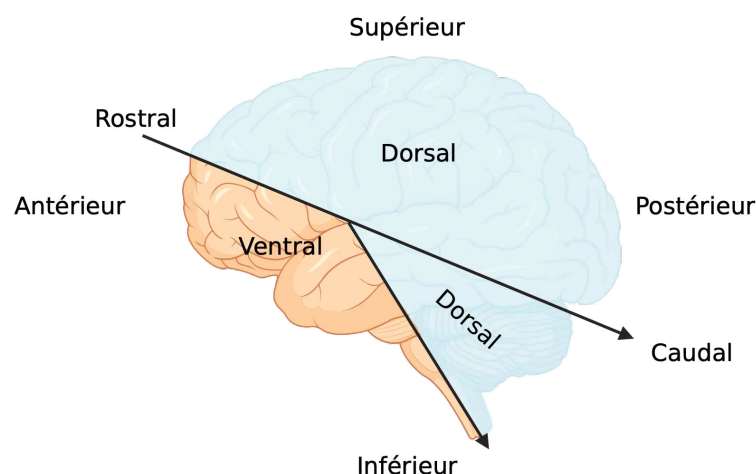


Figure 27 : Régionalisation cérébrale

Cependant, la génération d'une petite zone spécifique du cerveau peut être intéressante pour des pathologies dans lesquelles une partie spécifique du cerveau est touchée. Cependant, l'organe entier ou plusieurs parties de l'organe qui interagissent entre elles sont parfois nécessaires pour comprendre une pathogénèse. L'idée d'assembler des organoïdes ayant subi différents parcours de différenciation pour comprendre les différentes interactions (assembloïdes) a été énoncée par Sergiu Pașca, en 2018 (Sloan et al., 2018).

3.4.2. Assembloïdes

L'assembloïde est défini comme l'assemblage de plusieurs organoïdes entre eux pour obtenir un système biologique plus complexe. L'objectif est de complexifier le système d'étude pour être au plus proche de la réalité physiologique. Les assembloïdes suivants ont été réalisés (**Tableau 5**):

Organoïde 1	Organoïde 2	Objectif	Référence
Cerveau antérieur dorsal	Cerveau antérieur ventral	Migration interneuronale	(Bagley et al., 2017; Birey et al., 2017)
Cortical	Thalamus	Dysfonctionnement relatif à des désordres psychiatriques	(Xiang et al., 2019, 2020)
Thalamus	Rétine	Projection du système visuel	(Fligor et al., 2021)
Cortical	Striatum	Dysfonctionnement des circuits neuronaux (autisme, schizophrénie, ...)	(Miura et al., 2020, 2022)
Hypothalamus	Hypophyse / Glande pituitaire	Axe hypothalamus / hypophyse	(Kasai et al., 2020)

Tableau 5 : Résumé des différents assembloïdes générés afin de modéliser des troubles cérébraux

La maladie d'Alzheimer impliquant des perturbations dans plusieurs régions cérébrales, telles que l'hippocampe et le cortex, ainsi que des interactions entre les neurones et les cellules gliales (astrocytes et microglies), les assembloïdes pourraient représenter un modèle plus pertinent. De plus, les assembloïdes favorisent une meilleure maturation neuronale par rapport aux organoïdes. La maturation neuronale dans ces modèles permettrait de mieux étudier des processus comme la plasticité synaptique, la vulnérabilité spécifique des neurones matures dans la pathologie d'Alzheimer, et la dégénérescence neuronale. La **Figure 28** présente le panorama des différents modèles en cours de développement ainsi que les potentielles applications de ces différents modèles. Dans les assembloïdes, la formation de plaques amyloïdes peut être étudiée dans un contexte multicellulaire complexe, où les neurones et les cellules gliales interagissent de manière plus physiologique. La réponse gliale aux agrégats amyloïdes et le rôle des microglies dans la clairance de ces agrégats sont des processus cruciaux dans la progression de la maladie, et ils seraient possiblement mieux modélisés dans un système multicellulaire comme celui des assembloïdes. Ces structures permettraient également d'observer comment les agrégats protéiques se propageraient à travers des réseaux neuronaux connectés, une caractéristique clef de la pathologie d'Alzheimer.

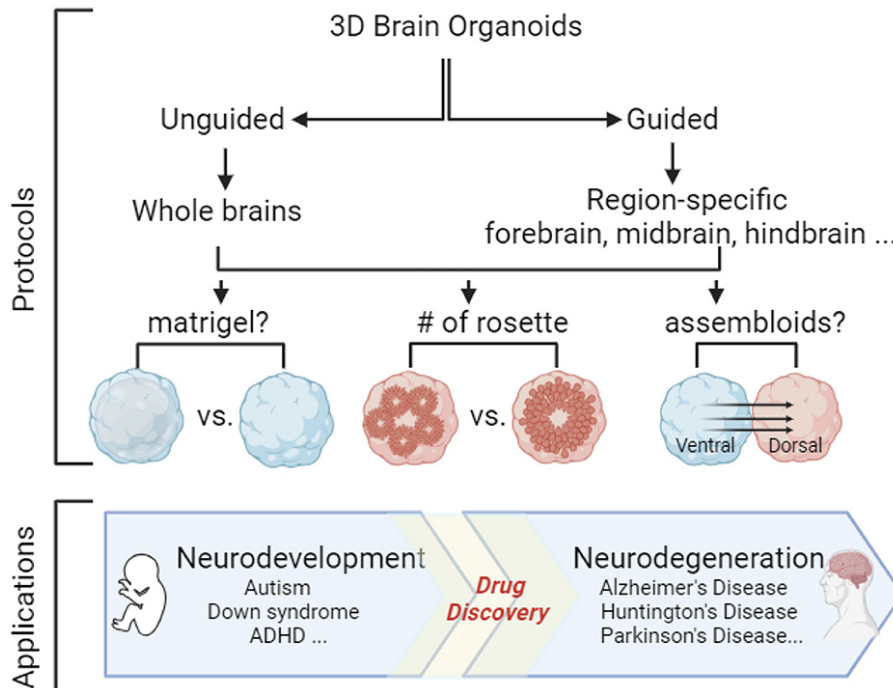


Figure 28 : Panorama des modèles en cours de développement d'organoïdes et leurs potentielles applications

Les organoïdes cérébraux 3D peuvent être générés par des protocoles guidés et non guidés pour imiter le cerveau entier ou des régions cérébrales spécifiques. Plusieurs facteurs tels que l'utilisation d'une matrice extracellulaire (par exemple, le Matrigel), le nombre de rosettes dans chaque organoïde et le choix des assemblages doivent être pris en compte avant de décider du protocole. Les organoïdes 3D peuvent être utilisés comme système modèle pour étudier les maladies neurodéveloppementales et neurodégénératives, ainsi que pour la découverte de médicaments. Figure extraite de (H. H. Zhao & Haddad, 2024).

Problématique et objectifs

Un des objectifs principaux du laboratoire consiste à générer des modèles *in vivo* et *in vitro* pertinents pour aider à la compréhension des mécanismes physiopathologiques de maladies affectant le cerveau. Les pathologies étudiées sont principalement liées à une accumulation protéique telles que les maladies à prions ou la maladie d'Alzheimer. La génération de cellules souches pluripotentes induites par Yamanaka et ses collègues en 2007 a permis d'ouvrir de nombreuses possibilités pour obtenir des nouveaux modèles à partir de cellules humaines. Les modèles les plus simples dérivés des iPSCs sont des cultures de cellules en 2 dimensions, mais l'avènement récent de modèles plus complexes, comportant plusieurs types cellulaires en 3 dimensions ouvrent la voie à une modélisation pathologique plus précise. Cependant, les dérivés des iPSCs conservent un profil phénotypique embryonnaire ou fœtal, souvent éloigné des caractéristiques de vieillissement observées dans les pathologies neurodégénératives.

L'objectif principal de cette thèse est de démontrer, à travers deux exemples de pathologies, le potentiel ainsi que les limites des organoïdes cérébraux, générés à partir de plusieurs protocoles, pour modéliser à la fois des pathologies neurodéveloppementales et neurodégénératives.

Ce manuscrit est divisé en deux parties : une première partie concerne le développement d'un modèle de pathologie neurodéveloppementale, le syndrome MARCH. La seconde partie décrit le développement d'un nouveau modèle d'organoïde cérébral pour étudier la Maladie d'Alzheimer, et discute de la pertinence de celui-ci pour en étudier les caractéristiques physiopathologiques.

En collaboration avec une équipe de l'Institut Pasteur, un projet de modélisation du syndrome neurodéveloppemental MARCH a été développé. Le projet commence avec l'obtention de cellules d'un patient sain et d'un autre malade qu'il a fallu reprogrammer pour obtenir plusieurs clones d'iPSCs par lignée. Ces clones d'iPSCs sont ensuite caractérisés avant de pouvoir les utiliser pour faire de la modélisation.

Une fois les iPSCs obtenues, l'objectif est de vérifier que des organoïdes cérébraux peuvent être générés suivant le protocole de Madeline Lancaster pour essayer de modéliser la pathologie. Pour rappel, une des principales caractéristiques est l'hydranencéphalie. Plusieurs productions d'organoïdes cérébraux ont été générées et caractérisées. Pour s'assurer que ce qui est observé

est bien dû la mutation identifiée, des lignées isogéniques contrôles issues des iPSCs de patients malades ont été générées, caractérisées puis différenciées en organoïdes cérébraux.

Enfin, les problèmes de développement les plus sévères sont observés dans le cerveau mais d'autres organes comme le cœur ou le foie ne semblent pas ou peu atteints. Ces deux organes proviennent du mésoderme, un autre feuillet embryonnaire que celui dont est issu le cerveau, ce qui pourrait peut-être expliquer les différences observées entre ces organes. Un protocole de différenciation en cardiomyocytes a été développé et mis au point afin de s'assurer du bon développement d'un autre organe.

Une seconde partie, axée sur les pathologies neurodégénératives, s'adresse à la modélisation de la forme familiale de la maladie d'Alzheimer. Pour remplir cet objectif, le laboratoire a fait l'acquisition de 5 lignées d'iPSCs pour modéliser la maladie d'Alzheimer mais seulement 4 de ces lignées ont été utilisées pour réaliser les travaux de cette thèse. Une lignée contrôle et trois lignées isogéniques dans lesquelles des mutations connues pour provoquer des cas familiaux de maladie d'Alzheimer ont été introduites. Les mutations se trouvent dans les gènes APP et PSEN1. Avant de pouvoir utiliser ces lignées pour faire de la modélisation, il est important de s'assurer que les lignées portent bien les mutations attendues.

Dans le but de mettre au point un protocole de test de fonctionnalité des organoïdes cérébraux à l'aide d'un réseau multi-électrodes (*multielectrode array* ou MEA), deux protocoles de différenciation de culture de neurones en 2D ont été développés :

- Un premier protocole impliquant la génération de corps embryoïdes afin d'obtenir des cellules progénitrices neurales qui pourront ensuite être différenciées en neurones.
- Un deuxième protocole utilisant la sur-expression de la protéine Neurogénine 2 qui permet la conversion directe d'une cellule iPS en cellule neuronale sans passer par le stade progéniteur neural. Ce protocole a également l'avantage d'obtenir des neurones matures plus rapidement.

Au sein du laboratoire, un nouveau protocole de différenciation des iPSCs en organoïdes a été développé et optimisé. L'objectif de ce développement de protocole est d'obtenir des organoïdes corticaux selon un protocole dit « guidé » en opposition avec le protocole de différenciation d'organoïdes dit « non guidé » proposé par M. A. Lancaster. Les protocoles guidés ont plusieurs avantages sur les protocoles non guidés dont un est de réduire l'hétérogénéité observée entre les différents organoïdes. Le protocole de différenciation mis au point est issu de deux

protocoles de Xiang (Xiang et al., 2017, 2019) et a comme avantage de ne pas utiliser de matrice support, comme le Matrigel.

Une fois les premières productions d'organoïdes obtenues, ils ont été caractérisés pour s'assurer de leur différenciation ainsi que de leur développement. Ces premières étapes réalisées, des productions d'organoïdes ont été effectuées avec ces lignées sur des temps de culture long (jusqu'à 6 mois), pour observer s'il y a au cours du temps un développement des signes physiopathologiques de la maladie d'Alzheimer.

Enfin, des précédents travaux réalisés au sein du laboratoire par S. Pavoni ont montré qu'une molécule, l'Aftin-5, joue sur la voie post-traductionnelle de la protéine APP en augmentant la proportion de fragments A β 42 sans modifier la quantité de fragments A β 40. L'utilisation de l'Aftin-5 en traitement chronique ou en traitement aigu sur des organoïdes sains a montré le développement de signes physiopathologiques de la maladie (Pavoni et al., 2018). Dans la poursuite de cette étude, il est proposé de tester l'influence de cette molécule sur des organoïdes corticaux contrôles et des organoïdes corticaux mutés Alzheimer pour voir si cela permet de potentialiser les effets des mutations génétiques et d'obtenir un phénotype physiopathologique plus rapidement.

Après le développement et la caractérisation des deux modèles, une comparaison et une analyse sur la pertinence des deux modèles développés seront apportées.

Résultats

1. Modélisation d'une pathologie neurodéveloppementale : le Syndrome MARCH

1.1. Génération des lignées cellulaires saines, MARCH et corrigées

1.1.1. Génération de lignées contrôles

1.1.1.1. Objectif

Comme expliqué précédemment, des modèles animaux ont été générés pour tenter de reproduire la pathogénèse du syndrome MARCH. Cependant, tous les signes physiopathologiques de la maladie ne sont pas reproduits dans ces modèles. Une des principales caractéristiques manquantes est l'hydranencéphalie, puisque le cerveau des poissons zèbre ou des souris se développe bien qu'une microcéphalie soit observée. Il y a donc un vif intérêt pour développer un modèle qui reproduit le plus fidèlement les principaux signes physiopathologiques du syndrome MARCH notamment, l'hydranencéphalie.

Note : Ce travail a fait l'objet de deux publications scientifiques présentées ci-après :

Boulle et al., Generation of IPS001-A/B/C human induced pluripotent cell lines from healthy amniotic fluid cells, **Stem Cell Research** (2024)

Boulle et al., Generation of IPS002-A/B/C human induced pluripotent cell lines from MARCH amniotic fluid cells, **Stem Cell Research** (2024)

1.1.1.2. Génération d'un modèle iPSC

Des cellules primaires du liquide amniotique (AFC) ont pu être récupérées lors d'amniocentèse pour réaliser des diagnostics prénataux. Une fois ces cellules obtenues, l'objectif a été de reprogrammer ces amniocytes, bien que cela ne soit pas le type cellulaire le plus utilisé pour la reprogrammation. Dans un

second temps, trois clones par lignée reprogrammée ont été caractérisés en vérifiant :

- Le caryotype,
- L'expression des gènes de pluripotence,
- La disparition de l'expression des transgènes,
- Les potentiels réarrangements chromosomiques
- Le potentiel de différenciation des iPSCs dans les trois feuillets embryonnaires
- L'absence de mycoplasmes dans les lignées

Dans le cas des cellules pathologiques qui présentent la mutation CEP55 sérine 425 codon stop (S425*), la présence de la mutation dans les clones d'iPSCs est également vérifiée par séquençage.

Lors d'une reprogrammation cellulaire, tous les clones obtenus dans une reprogrammation ne sont pas équivalents. En effet, le comportement de certains clones peut être différent. Pour essayer d'obtenir des résultats qui soient fiables, il a été décidé de réaliser toutes les expériences avec trois clones par lignée pour s'assurer de la fiabilité des résultats tout en essayant de réduire au maximum la possible hétérogénéité entre les clones.

Les trois clones générés sont mentionnés comme IPi001-A/B/C pour les clones sains et IPi002-A/B/C pour les clones pathologiques dans les articles. Dans la suite des résultats, ces lignées peuvent être également être mentionnées sous les noms CTRL MB #1, #8 ou #11 pour les clones IPi001-A/B/C respectivement, noms qui ont été attribués a posteriori par la banque qui distribue les cellules. De même, les clones pathologiques IPi002-A/B/C sont appelés MARCH #7, #18 ou #20. L'obtention de ces lignées va permettre de modéliser le processus de développement de ces deux lignées mais également d'essayer de comprendre les mécanismes impliqués dans la genèse du syndrome MARCH.

Les résultats concernant la reprogrammation et la caractérisation de ces 6 clones sont présentés dans les deux articles qui suivent. Les matériels et méthodes des deux articles ont été fusionnés dans la partie 1.1.1.3. Il a également été fait le choix pour la partie 1.1.1.3.2 de fournir plus de détails notamment sur la partie reprogrammation à l'aide du virus de Sendai.

1.1.1.3. Matériel et méthode

1.1.1.3.1. Origine des AFC sain et pathologiques et déclaration éthique

Pour le donneur sain, les cellules du liquide amniotique ont été prélevées lors d'un diagnostic prénatal en raison d'une gestation pathologique antérieure. La grossesse contemporaine de l'amniocentèse était normale d'un point de vue

cytogénétique et de l'échographie, qui a donné naissance à un petit garçon en bonne santé. Les tests sérologiques se sont révélés négatifs pour le VIH, le VHC et le VHB. La mère a signé un formulaire de consentement à l'hôpital Cochin, en accord avec le protocole éthique adopté par l'APHP. La production, l'utilisation et le stockage des hiPSCs par l'Institut Imagine a reçu l'approbation du CPP DC 2015-2595 et 2016-A00773-48). Le travail collaboratif a été supervisé par l'Institut Pasteur.

Deux cas du syndrome MARCH ont été diagnostiqués dans une famille. Les amniocytes ont été prélevés par amniocentèse lors de la troisième grossesse pathologique, correspondant à l'enfant 306 de (Frosk et al., 2017). La mutation a été identifiée par séquençage d'exomes et cartographie d'homozygotie. Le séquençage Sanger a permis de confirmer la présence de cette mutation dans les échantillons concernés et a montré une répartition chromosomique autosomique récessive appropriée dans la famille (Frosk et al., 2017). Des tests sérologiques se sont révélés négatifs pour le VIH, le VHC et le VHB. La mère a signé un formulaire de consentement conformément au protocole mis en place et approuvé par le comité d'éthique de la recherche en santé à l'université de Manitoba.

1.1.1.3.2. Génération de cellules souches pluripotentes induites humaines

Les amniocytes cultivés sur de la gélatine 0.1% ont été transduits en utilisant le kit CytoTune™-iPS 2.0 *Sendai* Reprogramming Kit (Invitrogen™_A16517) suivant les recommandations du fournisseur. Brièvement, les amniocytes sont cultivés dans le milieu AmnioMAX™ (Gibco™_17001-074 et 12556-023). Deux jours avant la transduction, quatre puits de plaque P12 par lignée sont préparés à une densité cellulaire de 200,000 cellules par puits. Le jour de la transduction, un des quatre puits est détaché pour pouvoir compter le nombre de cellules et ainsi adapter la multiplicité de l'infection (MOI). Un deuxième puits sert de contrôle négatif, le troisième puits sert de contrôle positif de l'infection à l'aide d'un virus de Sendai permettant l'expression d'une protéine fluorescente, *gfp*, et le dernier puits est celui de reprogrammation infecté avec les trois virus à une MOI de SKO : 5, *c-MYC* : 5 et *Klf4* : 3. Le lendemain de la transduction le milieu est changé.

Six jours après l'infection, les cellules transduites sont passées et mises sur des fibroblastes embryonnaires murins irradiés (MEFs; Gibco™_A34181) ensemencés sur des boîtes recouverte de gélatine 0.1 %. Le lendemain, le milieu AmnioMAX™ (Gibco™_17001-074 and 12556-023) est remplacé par un milieu hES, changé tous les trois jours jusqu'à ce que les colonies d'hiPSCs apparaissent : DMEM/F12, 20 % KOSR, 2 mM L-glutamine, 1 % NEAA, 1 % penicillin/streptomycin, 50 µM 2-Mercaptoethanol (Gibco™, 11330057; 10828028; 25030081; 11140050, 15140122, 21985023) and 8 µl/ml StemBeads®_FGF2 (Tebubio, SB501). Trois semaines après

la transduction, les colonies ont été récoltées et amplifiées dans le milieu mTeSR Plus pendant au moins 10 à 20 passages avant de pouvoir caractériser les clones. Les hiPSCs sont cultivées à 37°C dans une atmosphère humide avec 5% de CO₂, sur un support Matrigel hESC-qualifié (Corning®, 354277) dans du milieu mTeSR™ Plus (StemCell™ Technologies, 100-0276). Une méthode de passage conventionnelle est le passage au ReLeSR™ (StemCell™ Technologies, 100-0483) sans ROCK inhibiteur (Tocris, 1254).

1.1.1.3.3. Différenciation dans les trois feuillets embryonnaires

Les corps embryoides (EBs) sont formés à partir d'une suspension unicellulaire d'hiPSCs préparée dans un milieu hES supplémenté avec 4 ng/ml bFGF (Gibco™, PHG0368) et 50 µM ROCK inhibiteur (Tocris, 1254) à passage P10 ou P20. Les corps embryoides sont formés par la technique de gouttes suspendues avant d'être cultivées dans des plaques à très faible adhérence. Les EBs sont mis en adhésion dans des puits de plaques coatés avec de la gélatine 0,1% dans du milieu DMEM/F12 avec 10 % SVF. Pour augmenter, la différenciation en 2D vers l'endoderme, 100 ng/ml Activin A (Preprotech®, AF-120-14E) ont été ajoutés.

1.1.1.3.4. Marquage par immunofluorescence

Les hiPSCs différenciées et indifférenciées (passage P10 et P20) ont été fixées dans du paraformaldéhyde 4% et marquées comme décrit précédemment (Lefort et al., 2008). Brièvement, la perméabilisation est faite avec une solution de PBS 1X, 0.2% X-100 Triton suivi d'une extinction avec 50mM NH₄Cl. L'étape de blocage est réalisée avec une solution de PBS 1X – 1% BSA qui précède les incubations séquentielles avec les anticorps primaires puis secondaires dans le même tampon pendant 1h à 37°C, avec des étapes de lavage entre les différents marquages. Les noyaux sont contre-marqués avec du DAPI. Les images sont acquises avec un microscope Apotome (Zeiss) équipé d'un objectif longue portée et analysées avec le logiciel Icy.

1.1.1.3.5. Activité Alcaline Phosphatase

Les colonies sont fixées avec 95% d'éthanol et l'activité enzymatique est révélée après l'addition d'un substrat colorimétrique BCIP/NBT (Sigma- Aldrich®, B5655).

1.1.1.3.6. Isolation d'ADN et analyse du SNP

L'ADN a été isolé en utilisant le kit NucleoSpin Tissue Mini (Macherey- Nagel, 740952.50) à passage P10. Le caryotype moléculaire est réalisé à l'aide d'une puce

Infinium®_HumanCore-24 v1.2 (Illumina®, 20024566) contenant 300000 SNPs. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel GenomeStudio.

1.1.1.3.7. Extraction d'ARN et analyses RT-PCR

L'ARN total a été extrait en utilisant le kit RNeasy®_Mini Kit (Qiagen, 74134) et la qualité de l'ARN a été mesurée en utilisant un NanoDrop™. Les ADN complémentaires (ADNc) sont synthétisés avec le kit high-capacity cDNA RT kit (ThermoFisher, 4368814). A passage P16, l'expression des marqueurs de pluripotence et des feuillets embryonnaires a été évaluée sur la lignée IPI001-A en utilisant TaqMan™_hPSC Scorecard™_assay (ThermoFisher, A15876). Les analyses ont été réalisées en utilisant le logiciel hPSC Scorecard analysis. A passage P20, la perte de l'expression des transgènes du virus Sendai a été vérifiée dans toutes les lignées de même que le gain de l'expression endogène de plusieurs marqueurs de pluripotence.

1.1.1.3.8. Détection de mycoplasmes

Les contaminations des lignées par mycoplasmes ont été vérifiées à passage P20 par PCR.

1.1.1.3.9. Test de l'identité des lignées cellulaires

Au lieu de l'analyse STR, la puce Infinium®_HumanCore-24 v1.2 BeadChip (Illumina®, 20024566) contenant 300,000 SNPs est utilisée pour comparer les génomes des amniocytes parentaux et de leur hiPSCs dérivées. Un résumé de l'analyse est présenté dans les figures Fig. 1F et G pour les trois lignées. Les résultats complets ont été téléchargés sous le nom de fichier "STR analysis" pour valider les lignées cellulaires, mais n'ont pas été publiés dans l'article pour préserver l'anonymat du donneur.



Contents lists available at ScienceDirect

Stem Cell Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scr

Lab Resource: Multiple Cell Lines



Generation of IPi001-A/B/C human induced pluripotent stem cell lines from healthy amniotic fluid cells

Mikaël Boullé^{a,*}, Alix Boucharlat^a, Ambre Leleu^b, Céline Banal^c, Aurélie Coussement^d, Marcel Hollenstein^e, Frank Yates^b, Nathalie Lefort^c, Fabrice Agou^{a,*}

^a Chemogenomic and Biological Screening Core Facility, Center for Technological Resources and Research, Department of Structural Biology and Chemistry, Institut Pasteur, Université Paris-Cité, CNRS UMR 3523, F-75015 Paris, France

^b Sup-Biotech-CEA/DRF/IBFJ/SEPIA, 92260 Fontenay-aux-Roses, France

^c Université Paris-Cité, iPSC Core Facility, Institut Imagine, INSERM UMR U1163, 75015 Paris, France

^d Service de Cytogénétique, Hôpital Cochin, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Université Paris-Cité, 75014 Paris, France

^e Laboratory for Bioorganic Chemistry of Nucleic Acids, Department of Structural Biology and Chemistry, Institut Pasteur, Université Paris-Cité, CNRS UMR 3523, F-75015 Paris, France

A B S T R A C T

Human induced Pluripotent Stem Cells (hiPSCs) represent an invaluable source of primary cells to investigate development, establish cell and disease models, provide material for regenerative medicine and allow more physiological high-content screenings. Here, we generated three healthy hiPSC control lines - IPi001-A/B/C - from primary amniotic fluid cells (AFCs), an infrequently used source of cells, which can be readily obtained from amniocentesis for the prenatal diagnosis of numerous genetic disorders. These AFCs were reprogrammed by non-integrative viral transduction. The resulting hiPSCs displayed normal karyotype and expressed classic pluripotency hallmarks.

1. Resource Table

Unique stem cell lines identifier	IPi001-A IPi001-B IPi001-C
Alternative name(s) of stem cell lines	iPSC-healthy-AFC-001 iPSC-healthy-AFC-002 iPSC-healthy-AFC-003
Institution	Chemogenomic and Biological Screening Core Facility, Institut Pasteur, Université Paris-Cité, CNRS UMR 3523
Contact information of distributor	Mikaël Boullé (mikael.boullé@pasteur.fr) Fabrice Agou (fabrice.agou@pasteur.fr)
Type of cell lines	iPSC
Origin	Human
Additional origin info	Week 14 of pregnancy Male Caucasian
Cell Source	Healthy amniotic fluid cells
Clonality	Clonal approach
Method of reprogramming	Non-integrating SeV-mediated delivery of <i>OCT3/4</i> , <i>SOX2</i> , <i>c-MYC</i> and <i>KLF4</i>
Genetic Modification	No
Type of Genetic Modification	N/A

(continued on next column)

(continued)

Evidence of the reprogramming transgene loss (including genomic copy if applicable)	RT-PCR
Associated disease	N/A
Gene/locus	N/A
Date archived/stock date	July 2023
Cell line repository/bank	https://hpscrg.eu/
Ethical approval	Informed written consent obtained using forms and protocols ethically approved by the Assistance Publique des Hôpitaux de Paris (APHP) and by the Institut Imagine, both part of the Université Paris-Cité; Generation, use and storage of human iPSCs received approval from the Comité de Protection des Personnes (CPP) Île-de-France – DC 2015-2595 and 2016-A00773-480

2. Resource utility

So far, human induced Pluripotent Stem Cells (hiPSCs) were rarely generated from amniotic fluid cells (AFCs) (Easley et al., 2012). The

* Corresponding authors.

E-mail addresses: mikael.boullé@pasteur.fr (M. Boullé), fabrice.agou@pasteur.fr (F. Agou).

<https://doi.org/10.1016/j.scr.2024.103350>

Received 4 August 2023; Received in revised form 22 December 2023; Accepted 14 February 2024

Available online 17 February 2024

1873-5061/© 2024 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

IPi001-A/B/C hiPSCs were generated from healthy AFCs to establish reference lines, which can be used as non-isogenic controls in developmental and disease modeling studies as well as primary cell source for phenotypic screens.

3. Resource details

Cryopreserved AFCs sampled during a normal pregnancy were reprogrammed into hiPSCs by culture on irradiated MEFs and transduction with non-integrating *Sendai* vectors (Li et al., 2009; Fusaki et al., 2009). Morphologically typical colonies of pluripotent stem cells appeared as early as two weeks after infection and were individually picked to amplify feeder-free hiPSC lines. The stem cells underwent genotypic and functional characterisation before incorporation into a master cell bank for subsequent experimental purposes (Table 1). Phase contrast imaging revealed a conventional well delimited morphology of the colonies (Fig. 1A). The classic cobblestone-like appearance was observed, as each individual hiPSC was well demarcated from its neighbouring cells and displayed a large nucleus with a high nuclear-to-cytoplasmic ratio. Moreover, expression of the pluripotency markers SOX2 and OCT4 was repeatedly assessed by immunofluorescence staining of IPi001-A/B/C cells and quantified by image analysis (Fig. 1B, Supplementary Fig. 1A). As an additional control during amplification of the hiPSCs, we assessed the RNA expression in the IPi001-A line using the TaqMan™ hPSC Scorecard™ panel of markers (Tsankov et al., 2015), which revealed a transcriptional pattern consistent with an undifferentiated state similarly observed in our in-house established healthy hiPSC reference IMAGINi005-A (Supplementary Fig. 1E). The loss of the reprogramming *Sendai* viruses was confirmed by RT-PCR in all lines along with the gain of endogenous pluripotency markers (Supplementary Fig. 1D). Furthermore, the lines also expressed an enzymatically active alkaline phosphatase (Fig. 1C) and were able to form embryoid bodies (EBs) (Fig. 1D), which could be differentiated into cerebral organoids for research purpose (data not shown). Likewise, the ability of IPi001-A/B/C cells to differentiate into the three germ layers was evaluated by immunofluorescence (Fig. 1E; Supplementary Fig. 1C), which proved the trilineage differentiation potential. The ectodermal β -III-Tubulin and PAX6 markers as well as the mesodermal α -Smooth Muscle Actin and CD73 protein expression were observed in spontaneously differentiated cells, expanded in 2D after adhesion of embryoid bodies to the culture surface and propagated in a medium containing fetal calf serum (FCS). The expression of SOX17 and AFP was observed after directed differentiation of hiPSCs towards endoderm using Activin A. Importantly, genomic integrity in parental AFCs and derived hiPSCs was determined by comparative examination using an SNP array (Fig. 1F), which showed the absence of aneuploidy, copy-neutral loss of heterozygosity, deletion or insertion at a resolution allowing the detection of sub-chromosomal defects, especially those undetectable with conventional cytogenetic technologies but recurrently found in hiPSCs (Lefort et al., 2008). So, the karyotype was normal. However, this technique cannot detect balanced rearrangements or a mosaicism below 15%. The origin of the three hiPSC lines was corroborated by matching genotypes with parental cells (Fig. 1G). Finally, we certified the absence of *Mycoplasma* contamination (Supplementary Fig. 1B).

4. Materials and methods

4.1. Ethical statement and origin of the AFCs

AFCs were sampled for prenatal diagnosis because of a previous pathological gestation. The pregnancy contemporary with the amniocentesis was normal with reference to cytogenetics and ultrasound scan, leading to the birth of a healthy male. Serological testing was negative for HIV, HCV or HBV. The mother signed a consent form at the Cochin hospital, according to a protocol ethically approved by the APHP. The generation, use and storage of human iPSCs by the Institut Imagine

Table 1
Characterisation and validation.

Classification	Test	Result	Data
Morphology	Phase contrast microscopy	Normal morphology	Fig. 1 panel A
Phenotype	Qualitative analysis (Immunocytochemistry)	Expression of the pluripotency markers OCT4 and SOX2	Fig. 1 panel B Supplementary Fig. 1 panel D and 1 panel E
	Quantitative analysis (Immunocytochemistry counting)	IPi001-A: 97 % OCT4+, 95 % SOX2+; IPi001-B: 93 % OCT4+, 96 % SOX2+; IPi001-C: 91 % OCT4+, 95 % SOX2+;	Fig. 1 panel B Supplementary Fig. 1 panel A
	Alkaline phosphatase activity	Positive staining	Fig. 1 panel C
Genotype	Karyotype (SNP array of 300,000 markers)	Normal karyotype for IPi001-A/B/C Arr(1-22)x2, XYx1	Fig. 1 panel F
Identity	SNP array of 300,000 markers	SNP profiling comparing IPi001-A/B/C with parental AFCs – 9 matching SNPs shown	Fig. 1 panel G
Mutation analysis (IF APPLICABLE)	Sequencing	N/A	Whole data uploaded instead of STR results
	Southern Blot OR WGS	N/A	N/A
Microbiology and virology	<i>Mycoplasma</i> (PCR) <i>Sendai</i> viruses (RT-PCR)	Negative testing	Supplementary Fig. 1 panel C Supplementary Fig. 1 panel D Fig. 1 panel E Supplementary Fig. 1 panel B
Differentiation potential	Embryoid body formation and directed differentiation	Protein expression in IPi001-A/B/C: Ectoderm, β -III-Tubulin and PAX6 Endoderm, SOX17 and AFP Mesoderm, α -SMA and CD73	Fig. 1 panel B
Donor screening (OPTIONAL)	HIV 1 + 2, Hepatitis B, Hepatitis C	Negative	Not shown but available with author
Genotype additional info (OPTIONAL)	Blood group genotyping	N/A	N/A
Genotype additional info (OPTIONAL)	HLA tissue typing	N/A	N/A

received approval from CPP (DC 2015-2595 and 2016-A00773-48). The collaborative framework was managed at the Institut Pasteur.

4.2. Generation of iPSCs

AFCs cultured on a 0.1 % gelatin were transduced using the CytoTune™-iPS 2.0 *Sendai* Reprogramming Kit (Invitrogen™ A16517) according to the manufacturer's instructions. Transduced cells were plated on irradiated mouse embryonic fibroblasts (MEFs; Gibco™ A34181) seeded on 0.1 % gelatin-coated dishes. The following day, AmnioMAX™

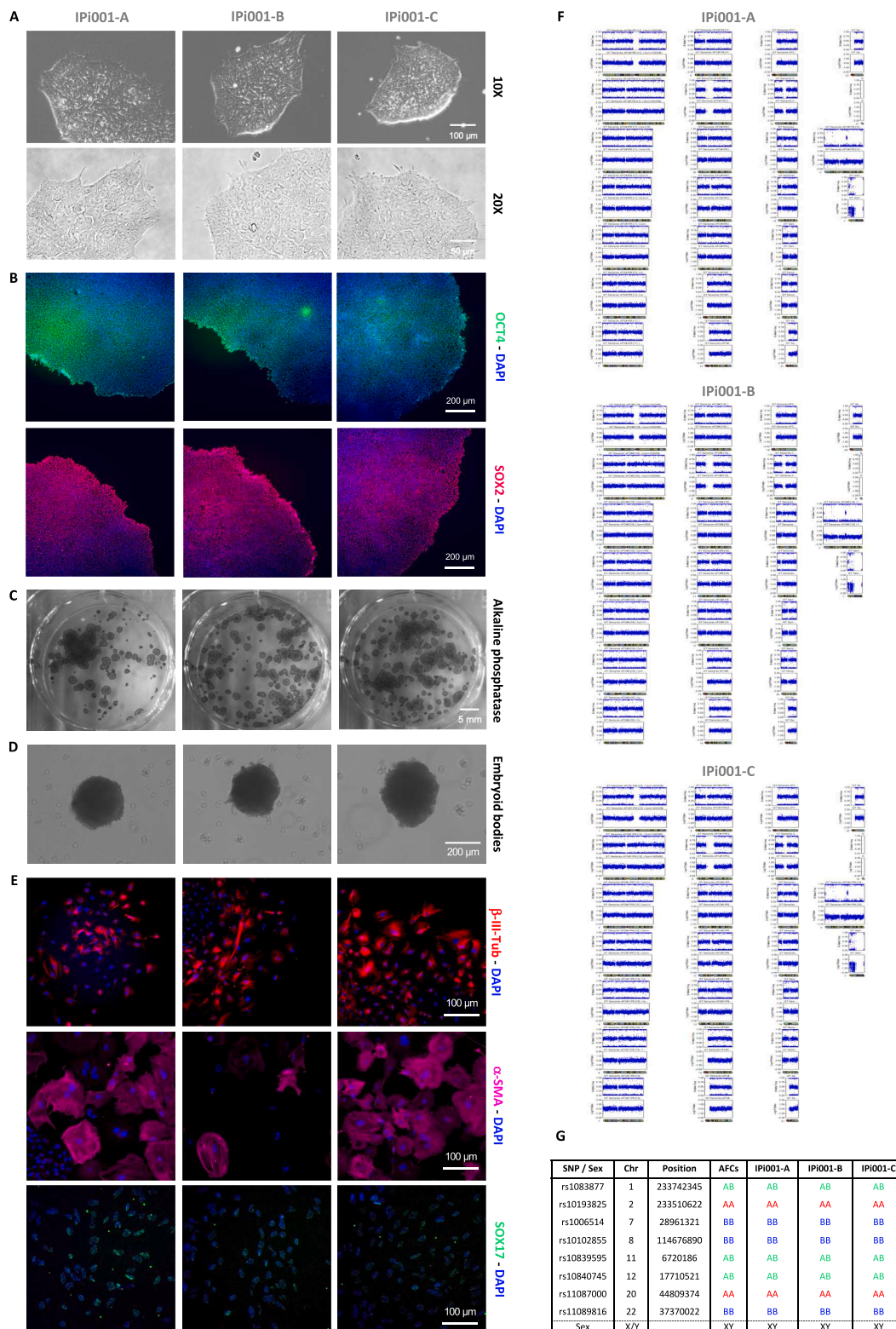


Fig. 1. Features of the hiPSC IPI001-A/B/C lines. A) Morphology of hiPSCs observed by phase contrast microscopy at 10x and 20x magnifications. B) Immunofluorescent staining of the pluripotency markers OCT4 and SOX2 expressed in colonies. C) Photographs of hiPSC colonies tested positive for the enzymatic alkaline phosphatase activity. D) Bright-field images of embryoid bodies. E) Immunofluorescence acquisitions of hiPSCs differentiated into the three germ layers identified by specific markers, i.e. ectoderm (β -III-Tubulin), mesoderm (α -SMA) and endoderm (SOX17). F) Graphical representation of SNP array analyses showing normal male karyotypes in IPI001-A/B/C lines. G) Summary of the SNP concordance between parental amniotic fluid cells and related hiPSC lines.

(Gibco™ 17001-074 and 12556-023) was switched to KSR medium, changed every third day until hiPSC colonies appeared: DMEM/F12, 20 % KOSR, 2 mM L-glutamine, 1 % NEAA, 1 % penicillin/streptomycin, 50 µM 2-Mercaptoethanol (Gibco™, 11330057; 10828028; 25030081; 11140050, 15140122, 21985023) and 8 µl/ml StemBeads® FGF2 (Tebubio, SB501). Three weeks after transduction, colonies were picked and expanded at least 10–20 passages before characterisation. hiPSCs were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5 % CO₂, on hESC-qualified Matrigel® (Corning®, 354277) in mTSeR™ Plus medium (StemCell™ Technologies, 100-0276). A conventional passaging method employed ReLeSR™ (StemCell™ Technologies, 100-0483) without ROCK inhibitor.

4.3. Trilineage differentiation

A single-cell suspension of hiPSCs was prepared in KSR supplemented with 4 ng/ml bFGF (Gibco™, PHG0368) and 50 µM ROCK inhibitor (Tocris, 1254) at passage P10 or P20. Embryoid bodies were formed by the hanging drop method before culture in ultra-low adherent plates. EBs were replated on gelatin-coated tissue culture-treated wells in DMEM/F12 with 10 % FCS. To enhance the endodermal

differentiation in 2D, we added 100 ng/ml Activin A (Preprotech®, AF-120-14E).

4.4. Immunofluorescence staining

Differentiated or undifferentiated hiPSCs (passage P10 or P20) were fixed with 4 % paraformaldehyde and stained as previously described (Lefort et al., 2008). Briefly, permeabilisation with 0.2 % X-100 Triton followed quenching with 50 mM NH₄Cl. Blocking with PBS – 1 % BSA, preceded sequential incubations with primary and secondary antibodies in the same buffer for 1 h at 37 °C, between washing steps (Table 2). Nuclei were counterstained with DAPI. Images were acquired with an Apotome microscope (Zeiss) equipped with a 10x long-range objective and analysed with the Icy software.

4.5. Alkaline phosphatase activity

Colonies were fixed with 95 % ethanol and the enzymatic activity was revealed after addition of BCIP/NBT colorimetric substrates (Sigma-Aldrich®, B5655).

Table 2
Reagents details.

Antibodies used for immunocytochemistry/flow-cytometry				
	Antibody	Dilution	Company Cat #	RRID
Pluripotency markers	Rabbit polyclonal anti-OCT4	1:200	Stemgent – 09-0023	RRID: AB_2167689
	Rabbit polyclonal anti-SOX2	1:200	Stemgent – 09-0024	RRID: AB_2195775
Differentiation markers	Mouse monoclonal anti-β-III-Tubulin	1:200	BioLegend - 801202	RRID: AB_10063408
	Mouse monoclonal anti-α-SMA	1:100	Sigma-Aldrich - A5228	RRID: AB_262054
	Mouse monoclonal anti-SOX17	1:50	R and D Systems - AF1924	RRID: AB_2195646
	Rabbit polyclonal anti-PAX6	1:350	BioLegend - 901301	RRID: AB_2565003
	Mouse monoclonal anti-CD73	1:500	Miltenyi Biotec – 130-112-060	AB_2659164
	Mouse monoclonal anti-AFP	1:60	R and D Systems - MAB1369	AB_2258005
Secondary antibodies	Goat anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor 647	1:1000	Thermo Fisher Scientific - A-21244	RRID: AB_2535812
	Goat anti-Mouse IgG2a, Alexa Fluor 555	1:1000	Thermo Fisher Scientific - A-21137	RRID: AB_2535776
	Goat anti-Mouse IgG, Alexa Fluor 488	1:1000	Thermo Fisher Scientific - A-11029	RRID: AB_2534088
Primers				
	Target	Size of band (bp)	Forward/Reverse primer (5'-3')	
Rerogramming <i>Sendai</i> viruses (RT-PCR)	SeV	141	GGATCACTAGGTGATATCGAGC ACCAGACAAGAGTTTAAAGAGATATATGTATC	
	KOS	528	ATGCACCGATACGACGTGAGCGC ACCTTGACAATCCTGATGTGG	
	c-MYC	532	TAACTGACTAGCAGGCTTGTCG TCCACATACAGTCTGGATGATGATG	
	KLF4	410	TTCCTGCATGCCAGAGGAGCCC AATGTATCGAAGGTGCTCAA	
Endogenous pluripotency markers (RT-PCR)	OCT3/4	63	GGGTTTTGGGATTAAGTTCITCA GCCCCACCCTTTGTGTT	
	SOX2	64	CAAAAATGGCCATGCGAGTT AGTTGGGATCGAACAAAAGCTATT	
	c-MYC	55	CGGGCGGCACCTTTG GGAGAGTCGGTCTTGTCT	
	KLF4	68	TTCCTGCATGCCAGAGGAGCCC AATGTATCGAAGGTGCTCAA	
Housekeeping gene (RT-PCR)	RPLP0	162	CATTGCCCATGTGAAGTC GCTCCACTTTGTCTCCAGT	
Mycoplasma (PCR)		464	ACTCTACGGGAGGAGCAGTA TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC	
TaqMan™ hPSC Scorecard™ assay	Pluripotency and germ lineage markers	N/A	Thermo Fisher Scientific - A15876	

4.6. DNA isolation and karyotype analysis

DNA was isolated using the NucleoSpin Tissue Mini kit (Macherey-Nagel, 740952.50) at passage P10. Molecular karyotyping was performed employing an Infinium® HumanCore-24 v1.2 BeadChip (Illumina®, 20024566) containing 300000 SNPs. Data was analysed with the dedicated GenomeStudio software.

4.7. RNA extraction and RT-PCR analyses

Total RNA was extracted using RNeasy® Mini Kit (Qiagen, 74134) and RNA quality was assessed using a NanoDrop™. cDNA was synthesised with the high-capacity cDNA RT kit (ThermoFisher, 4368814). At passage P16, the expression of pluripotency and germ layer markers for IPi001-A were evaluated by TaqMan™ hPSC Scorecard™ assay (ThermoFisher, A15876). Data analysis was performed using the hPSC Scorecard analysis software. At passage P20, the loss of the reprogramming viruses was verified in all lines as well as the gain of some endogenous pluripotency markers.

4.8. Mycoplasma detection

Mycoplasma contamination was excluded at passage P20 by PCR.

4.9. Cell line identity testing

Instead of an STR analysis, we used an Infinium® HumanCore-24 v1.2 BeadChip (Illumina®, 20024566) containing 300000 SNPs to compare the genome of the parental AFCs and the derived hiPSCs. A summary of the analysis is presented in Fig. 1F and G for all three lines. The complete results have been uploaded under the file type “STR analysis” to validate the cell lines, but they will not be published alongside the article to protect the identity of the donor.

CRediT authorship contribution statement

Mikaël Boullé: Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Funding acquisition, Investigation, Methodology, Project administration, Resources, Software, Supervision, Validation, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Alix Boucharlat:** Resources. **Ambre Leleu:** Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Resources, Validation, Visualization, Writing – review & editing. **Céline Banal:** Investigation, Validation, Visualization. **Coussement Aurélie:** Resources. **Marcel Hollenstein:** Funding acquisition, Writing – review & editing. **Frank Yates:** Conceptualization,

Methodology, Resources, Supervision, Validation. **Nathalie Lefort:** Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Methodology, Supervision, Validation, Visualization, Resources, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Fabrice Agou:** Conceptualization, Funding acquisition, Project administration, Resources, Supervision, Validation.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

During the COVID-19 pandemic, the Direction des Applications de la Recherche et des Relations Industrielles (DARRI) and the Institut Pasteur provided funding for this project. F.A. also acknowledges funding from the Agence Nationale de Recherche (ANR, grant number 21-CE17-0014-04 KREM-AIF). F.A. and M.B. thank the Finnish Academy of Science for funding. M.B. acknowledges the Université Paris-Cité, as he was a recipient of a Ph.D. fellowship at the beginning of this work. None of the funders were involved in the research process. We thank Prof. Jean-Michel Dupont for providing us with the appropriate AFCs.

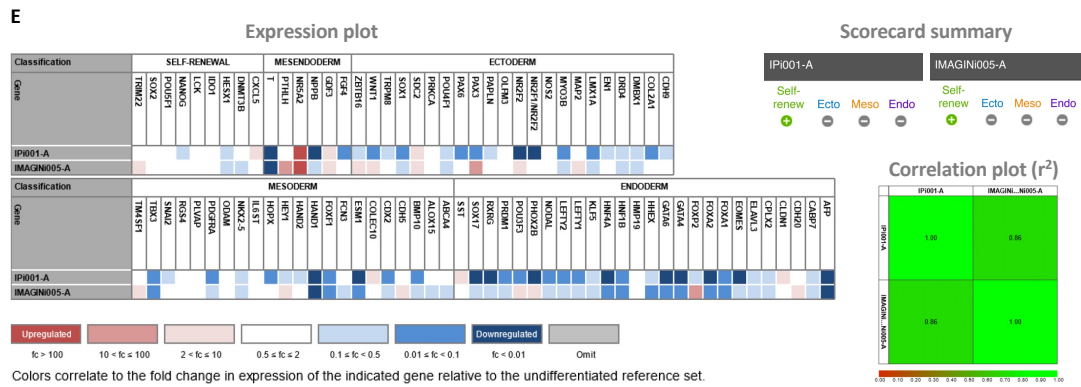
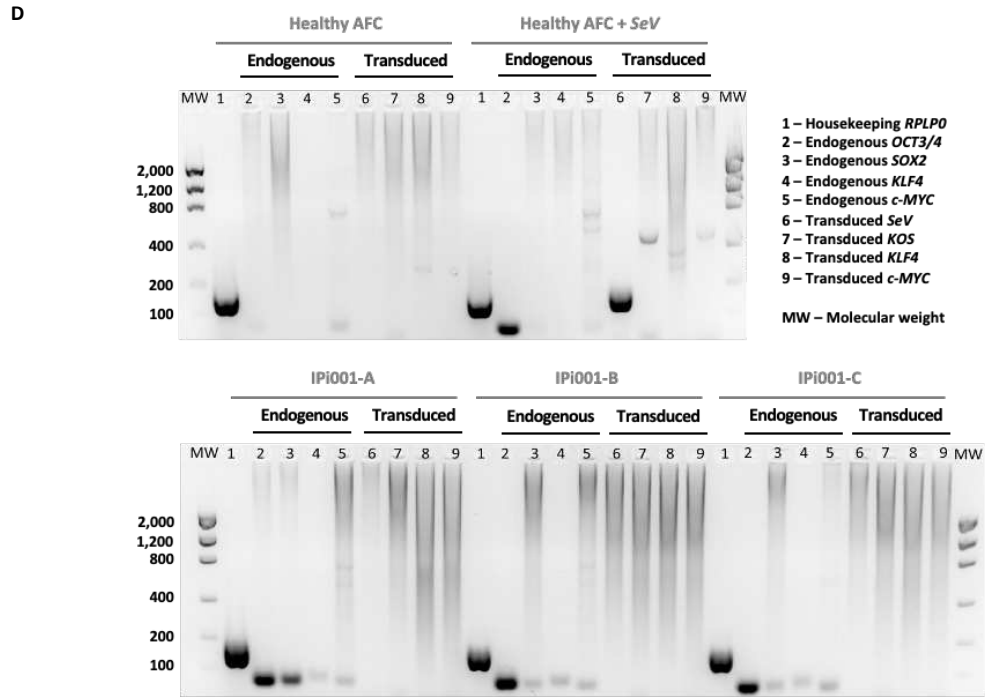
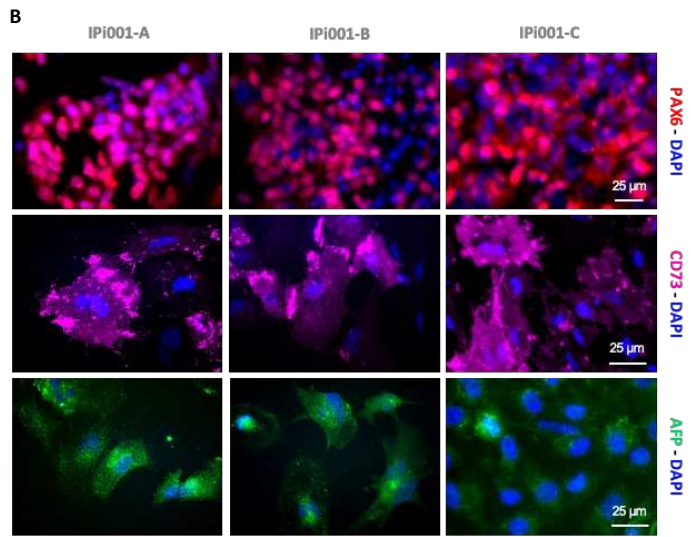
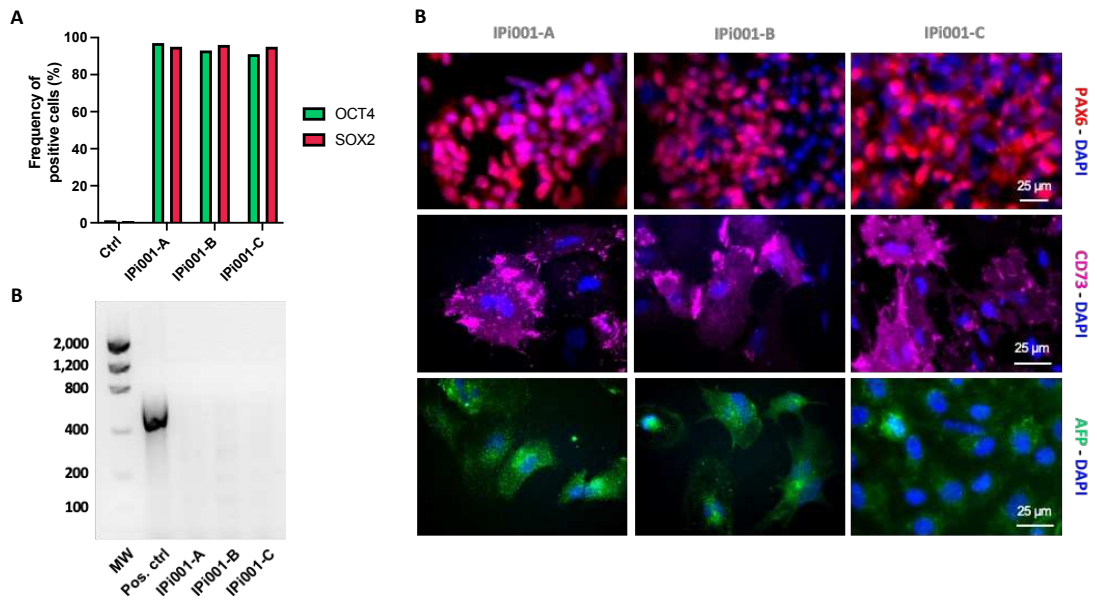
Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.scr.2024.103350>.

References

- Easley, C.A.t., Miki, T., Castro, C.A., Ozolek, J.A., Minervini, C.F., Ben-Yehudah, A., Schatten, G.P., 2012. Human amniotic epithelial cells are reprogrammed more efficiently by induced pluripotency than adult fibroblasts. *Cell Reprgr.* 14, 193–203.
- Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., Hasegawa, M., 2009. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B: Phys. Biol. Sci.* 85, 348–362.
- Lefort, N., Feyeux, M., Bas, C., Feraud, O., Bennaceur-Griscelli, A., Tachdjian, G., Peschanski, M., Perrier, A.L., 2008. Human embryonic stem cells reveal recurrent genomic instability at 20q11.21. *Nat. Biotechnol.* 26, 1364–1366.
- Li, C., Zhou, J., Shi, G., Ma, Y., Yang, Y., Gu, J., Yu, H., Jin, S., Wei, Z., Chen, F., Jin, Y., 2009. Pluripotency can be rapidly and efficiently induced in human amniotic fluid-derived cells. *Hum. Mol. Genet.* 18, 4340–4349.
- Tsankov, A.M., Akopian, V., Pop, R., Chetty, S., Gifford, C.A., Daheron, L., Tsankova, N. M., Meissner, A., 2015. A qPCR ScoreCard quantifies the differentiation potential of human pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* 33, 1182–1192.

Supplementary Figure 1



Colors correlate to the fold change in expression of the indicated gene relative to the undifferentiated reference set.



Contents lists available at ScienceDirect

Stem Cell Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scr

Generation of IPI002-A/B/C human induced pluripotent stem cell lines from MARCH amniotic fluid cells

Mikaël Boullé^{a,*}, Ambre Leleu^b, Siham Schacre^a, Céline Banal^c, Alix Boucharlat^a, Solene Renault^b, Marcel Hollenstein^d, Patrick Frosk^e, Frank Yates^b, Nathalie Lefort^c, Fabrice Agou^{a,*}

^a Chemogenomic and Biological Screening Core Facility, Center for Technological Resources and Research, Department of Structural Biology and Chemistry, Institut Pasteur, Université Paris-Cité, CNRS UMR 3523, F-75015 Paris, France

^b SupBiotech-CEA/DRF/IBFJ/SEPIA, 92260 Fontenay-aux-Roses, France

^c Université Paris-Cité, iPSC Core Facility, Institut Imagine, INSERM UMR U1163, 75015 Paris, France

^d Laboratory for Bioorganic Chemistry of Nucleic Acids, Department of Structural Biology and Chemistry, Institut Pasteur, Université Paris-Cité, CNRS UMR 3523, F-75015 Paris, France

^e Department of Pediatrics and Child Health, Department of Biochemistry and Medical Genetics, Max Rady College of Medicine, Rady Faculty of Health Sciences, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada

ABSTRACT

Human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) have become a revolutionary tool in biomedical research due to their unique *in vitro* properties and fate versatility. They offer insights into development or genetic disorders, facilitate drug discovery and hold promise for regenerative medicine. Here we generated three hiPSC cells – IPI002-A/B/C – from primary amniotic fluid cells (AFCs) obtained via amniocentesis for the prenatal diagnosis of MARCH syndrome: Multinucleated neurons, Anhydramnios, Renal dysplasia, Cerebellar hypoplasia, and Hydranencephaly. These AFCs underwent reprogramming through non-integrative viral transduction and the resulting hiPSCs exhibited normal karyotype and expressed typical pluripotency markers.

Resource Table

Unique stem cell lines identifier	IPI002-A IPI002-B IPI002-C
Alternative name(s) of stem cell lines	iPSC-MARCH-AFC-001 iPSC-MARCH-AFC-002 iPSC-MARCH-AFC-003
Institution	Chemogenomic and Biological Screening Core Facility, Institut Pasteur, Université Paris-Cité, CNRS UMR 3523
Contact information of distributor	Mikaël Boullé (mikael.boullé@pasteur.fr) Fabrice Agou (fabrice.agou@pasteur.fr)
Type of cell lines	iPSC
Origin	Human
Additional origin info	Week 15 of pregnancy Male Caucasian
Cell Source	MARCH amniotic fluid cells
Clonality	Clonal approach
Method of reprogramming	Non-integrating SeV-mediated delivery of <i>OCT3/4</i> , <i>SOX2</i> , <i>c-MYC</i> and <i>KLF4</i>

(continued on next column)

Resource Table (continued)

Genetic Modification	Yes
Type of Genetic Modification	Familial, autosomal recessive <i>CEP55</i> c.1274C A, p.Ser425Stop
Evidence of the reprogramming	RT-PCR
transgene loss (including genomic copy if applicable)	
Associated disease	MARCH syndrome
Gene/locus	<i>CEP55</i> / chr 10q23
Date archived/stock date	March 2024
Cell line repository/bank	https://hpscereg.eu/
Ethical approval	Informed written consent obtained using a form and a protocol ethically approved by the Health Research Ethics Board at the University of Manitoba (HS16978 – H2013:415); Generation, use and storage of human iPSCs received approval from the Comité de Protection des Personnes (CPP) Île-de-France – DC 2015-2595 and 2016-A00773-480

* Corresponding authors.

E-mail addresses: mikael.boullé@pasteur.fr (M. Boullé), fabrice.agou@pasteur.fr (F. Agou).

<https://doi.org/10.1016/j.scr.2024.103589>

Received 15 July 2024; Received in revised form 13 October 2024; Accepted 16 October 2024

Available online 19 October 2024

1873-5061/© 2024 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

1. Resource utility

We generated human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) from MARCH amniotic fluid cells (AFCs) as previously demonstrated (Boullé et al., 2024; Frosk et al., 2017). The pathological IPI002-A/B/C hiPSC lines are the first human primary models to investigate the disease as well as the role of CEP55 during cytokinetic abscission.

2. Resource details

MARCH syndrome is a rare severe human fetal disease linked to biallelic nonsense mutations in the *CEP55* gene (Frosk et al., 2017). Cryopreserved AFCs from a MARCH pregnancy underwent reprogramming into hiPSCs using irradiated mouse embryonic fibroblasts (MEFs) and non-integrating *Sendai* vectors (Boullé et al., 2024; Fusaki et al., 2009). Around three weeks post-infection, colonies of typical pluripotent stem cells were selected for expansion into feeder-free hiPSCs. Before integration into a master cell bank, characterizations were conducted (Table 1). Phase contrast imaging unveiled morphological hallmarks: cobblestone-like appearance with clear demarcations between neighboring hiPSCs, distinguished by their large nucleus-to-cytoplasm ratio (Fig. 1A). Immunofluorescence staining for pluripotency markers SOX2 and OCT4 was consistently positive in IPI002-A/B/C cells and quantified via image analysis (Fig. 1B and Supplementary Fig. 1A). Additionally, RNA expression in the IPI002-A line was assessed using the TaqMan hPSC Scorecard panel, confirming a transcriptional profile indicative of an undifferentiated state akin to our in-house healthy hiPSC reference IMAGINI005-A and our published IPI001-A line (Supplementary Fig. 1E) (Boullé et al., 2024; Tsankov et al., 2015). This previous analysis was only performed to compare several hiPSCs from different studies, which is why we did not test our lines as exhaustively as with the other herein presented techniques. Clearance of reprogramming *Sendai* viruses was confirmed via RT-PCR, concomitantly with the acquisition of endogenous pluripotency markers (Supplementary Fig. 1D). Furthermore, hiPSCs exhibited an enzymatically active alkaline phosphatase (Fig. 1C) and could form embryoid bodies (Fig. 1D), which we differentiated into cerebral organoids (data not shown). The

differentiation potential of IPI002-A/B/C cells was validated by immunofluorescence, revealing expression of ectodermal β -III-Tubulin and PAX6 markers, as well as mesodermal α -Smooth Muscle Actin and CD73 proteins in spontaneously differentiated cells using a medium containing fetal calf serum (FCS). Directed differentiation of hiPSCs towards endoderm using Activin A induced the expression of SOX17 and AFP markers (Fig. 1E and Supplementary Fig. 1B). Importantly, genomic integrity in parental AFCs and derived hiPSCs was evaluated through comparative SNP array analysis (Fig. 1F), demonstrating the absence of copy-neutral loss of heterozygosity, aneuploidy, insertions or deletions at a resolution capable of detecting sub-chromosomal defects frequently found in hiPSCs (Lefort et al., 2008). Nevertheless, this technique may not detect balanced rearrangements or mosaicism below 15 %. The lineage of the three lines was confirmed by matching genotypes with parental cells and the presence of the homozygous c.1274C A mutation was verified (Fig. 1G and 1H). Mycoplasma contamination was ruled out (Supplementary Fig. 1C).

3. Materials and methods

3.1. Ethical statement and origin of the AFCs

Two cases of MARCH syndrome had been diagnosed in a family. AFCs were sampled by amniocentesis during the third pathological pregnancy with infant 306. The mutation was identified using exome sequencing and homozygosity mapping. Sanger sequencing confirmed its presence in affected samples and showed appropriate autosomal recessive segregation in the family (Frosk et al., 2017). Serological testing was negative for *HIV*; *HCV* or *HBV*. The mother signed a consent form according to a protocol approved by the Health Research Ethics Board at the University of Manitoba.

3.2. Generation of iPSCs

AFCs maintained on a 0.1 % gelatin-coated surface with AmnioMAX (Gibco 17001-074 and 12556-023) medium underwent transduction using the CytoTune-iPS 2.0 *Sendai* Reprogramming Kit (Invitrogen

Table 1
Characterisation and validation.

Classification	Test	Result	Data
Morphology Phenotype	Phase contrast microscopy	Normal morphology	Fig. 1 panel A
	Qualitative analysis (Immunocytochemistry)	Expression of the pluripotency markers OCT4 and SOX2	Fig. 1 panel B Supplementary Fig. 1 panel D and 1 panel E
Genotype	Quantitative analysis (Immunocytochemistry counting)	IPI002-A: 98 % OCT4+, 96 % SOX2+; IPI002-B: 97 % OCT4+, 93 % SOX2+; IPI002-C: 85 % OCT4+, 96 % SOX2+;	Fig. 1 panel B Supplementary Fig. 1 panel A
	Alkaline phosphatase activity Karyotype (SNP array of 300,000 markers)	Positive staining Normal karyotype for IPI002-A/B/C Arr(1–22)x2, XYx1	Fig. 1 panel C Fig. 1 panel F
Identity	SNP array of 300,000 markers	SNP profiling comparing IPI002-A/B/C with parental AFCs – 9 matching SNPs shown	Fig. 1 panel G
Mutation analysis (IF APPLICABLE)	Sequencing	Matching genotypes <i>CEP55</i> c.1274C A in parental AFCs and iPSCs	Available with the authors Fig. 1 panel H
	Southern Blot OR WGS	N/A	N/A
Microbiology and virology	<i>Mycoplasma</i> (PCR)	Negative testing	Supplementary Fig. 1 panel C
	<i>Sendai</i> viruses (RT-PCR)	Loss of reprogramming transgenes	Supplementary Fig. 1 panel D
Differentiation potential	Embryoid body formation and directed differentiation	Protein expression in IPI002-A/B/C: Ectoderm, β -III-Tubulin and PAX6 Endoderm, SOX17 and AFP Mesoderm, α -SMA and CD73	Fig. 1 panel D and panel E Supplementary Fig. 1 panel B
Donor screening (OPTIONAL)	HIV 1 + 2, Hepatitis B, Hepatitis C	Negative	Not shown but available with author
Genotype additional info (OPTIONAL)	Blood group genotyping	N/A	N/A
Genotype additional info (OPTIONAL)	HLA tissue typing	N/A	N/A

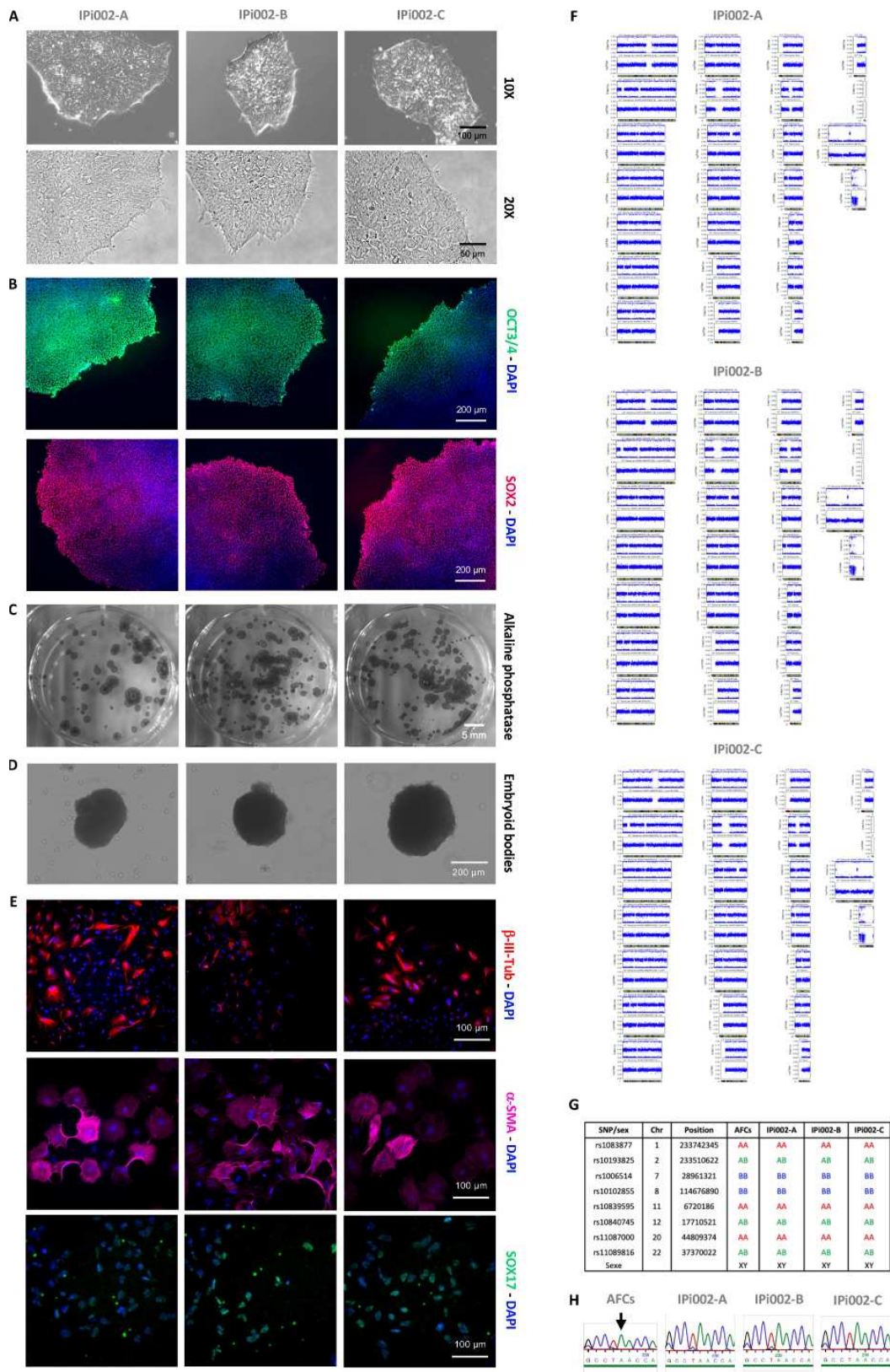


Fig. 1. Features of the hiPSC IPi002-A/B/C lines. **A)** Morphology of hiPSCs observed by phase contrast microscopy at 10x and 20x magnifications. **B)** Expression of OCT4 and SOX2 pluripotency markers detected by immunofluorescent staining. **C)** Images of the alkaline phosphatase activity in hiPSC colonies. **D)** Bright-field photographs of embryoid bodies. **E)** Immunofluorescence staining of hiPSCs differentiated into the three germ layers identified by specific markers, i.e. ectoderm (β -III-Tubulin), mesoderm (α -SMA) and endoderm (SOX17). **F)** Graphical representation of SNP array analyses showing normal male karyotypes in IPi002-A/B/C lines. **G)** Summary of the SNP concordance between parental amniotic fluid cells and related hiPSC lines. **H)** Sanger sequencing of the mutation *CEP55* c.1274C A associated with the syndrome.

A16517). After transduction, cells were seeded onto irradiated mouse embryonic fibroblasts (MEFs; Gibco A34181) plated on gelatin-coated dishes. The following day, culture medium transitioned from Amnio-MAX to KSR medium, with regular change every third day until the emergence of hiPSC colonies. The KSR medium formulation included DMEM/F12, 20 % KnockOut Serum Replacement (KOSR), 2 mM L-glutamine, 1 % non-essential amino acids (NEAA), 1 % penicillin/streptomycin, 50 μ M 2-Mercaptoethanol (Gibco, 11330057; 10828028; 25030081; 11140050, 15140122, 21985023) and 8 μ l/ml StemBeads FGF2 (Tebubio, SB501). Selected colonies were expanded a minimum of 10 to 20 passages prior to characterization. Maintenance of hiPSCs was carried out at 37 °C in a humidified atmosphere with 5 % CO₂, on hESC-qualified Matrigel (Corning, 354277) and in mTSeR Plus medium (StemCell Technologies, 100-0276). Passaging was performed using the ReLeSR method (StemCell Technologies, 100-0483) (Boullé et al., 2024).

3.3. Trilineage differentiation

Single-cell suspensions of hiPSCs at passage (P) 10 or 20 in KnockOut Serum Replacement (KSR) supplemented with 4 ng/ml bFGF (Gibco, PHG0368) and 50 μ M ROCK inhibitor (Tocris, 1254) were used to form embryoid bodies following the hanging drop method. EBs were matured in ultra-low adherent plates before transfer onto gelatin-coated tissue culture-treated wells in DMEM/F12 supplemented with 10 % fetal calf serum (FCS). Endodermal differentiation in a 2D environment was promoted with 100 ng/ml Activin A (Preprotech, AF-120-14E).

3.4. Immunofluorescence staining

Differentiated or undifferentiated hiPSCs (P10 or P20) were fixed in 4 % PBS-buffered paraformaldehyde and stained as previously described (Boullé et al., 2024). Cells were permeabilized with 0.2 % X-100 Triton and treated with 50 mM NH₄Cl. They were blocked in PBS containing 1 % bovine serum albumin (BSA). Incubation with the primary antibody

Table 2
Reagents details.

Antibodies used for immunocytochemistry/flow-cytometry				
	Antibody	Dilution	Company Cat #	RRID
Pluripotency markers	Rabbit polyclonal anti-OCT4	1:200	Stemgent – 09-0023	RRID: AB_2167689
	Rabbit polyclonal anti-SOX2	1:200	Stemgent – 09-0024	RRID: AB_2195775
Differentiation markers	Mouse monoclonal anti- β -III-Tubulin	1:200	BioLegend – 801202	RRID: AB_10063408
	Mouse monoclonal anti- α -SMA	1:100	Sigma-Aldrich – A5228	RRID: AB_262054
	Mouse monoclonal anti-SOX17	1:50	R and D Systems – AF1924	RRID: AB_2195646
	Rabbit polyclonal anti-PAX6	1:350	BioLegend – 901301	RRID: AB_2565003
	Mouse monoclonal anti-CD73	1:500	Miltenyi Biotec – 130-112-060	AB_2659164
	Mouse monoclonal anti-AFP	1:60	R and D Systems – MAB1369	AB_2258005
Secondary antibodies	Goat anti-Rabbit IgG, Alexa Fluor 647	1:1000	Thermo Fisher Scientific - A-21244	RRID: AB_2535812
	Goat anti-Mouse IgG2a, Alexa Fluor 555	1:1000	Thermo Fisher Scientific – A-21137	RRID: AB_2535776
	Goat anti-Mouse IgG, Alexa Fluor 488	1:1000	Thermo Fisher Scientific – A-11029	RRID: AB_2534088
Primers				
	Target	Size of band (bp)	Forward/Reverse primer (5' -3')	
Rerogramming <i>Sendai</i> viruses (RT-PCR)	SeV	141	GGATCACTAGGTGATATCGAGC ACCAGACAAGAGTTTAAGAGATATATGTATC	
	KOS	528	ATGCACCGATACGACGTGAGCCG ACCTTGACAATCCTGATGTGG	
	c-MYC	532	TAAGTGACTAGCAGGCTTGTGCG TCCACATACAGTCCTGGATGATGATG	
	KLF4	410	TTCCTGCATGCCAGAGGAGCC AATGTATCGAAGGTGCTCAA	
Endogenous pluripotency markers (RT-PCR)	OCT3/4	63	GGGTTTTGGGATTAAGTCTTCA GCCCCACCCTTTGTGT	
	SOX2	64	CAAAAAATGGCCATGCAGGTT AGTTGGGATCGAACAAAAGCTATT	
	c-MYC	55	CGGGCGGGCACTTTG GGAGAGTCGCTCCTTGCT	
	KLF4	68	TTCCTGCATGCCAGAGGAGCC AATGTATCGAAGGTGCTCAA	
Housekeeping gene (RT-PCR)	RPLP0	162	CATTGCCCATGTGAAGTC GCTCCACTTTGTCTCCAGT	
Mycoplasma (PCR)		464	ACTCTACGGGAGGAGCAGTA TGACACATCTGTCACTGTAAACCTC	
CEP55 mutation	Fragment amplification	893	aaattgctgaacaggctggg ACCCATTAGCAATAACCTGAGC	
	Sequencing		gccatgtttgcccactaca GCTGAGGTGAGAGGATTGCT	
TaqMan hPSC Scorecard assay	Pluripotency and germ lineage markers	N/A	Thermo Fisher Scientific – A15876	

was carried out for 1 h at 37 °C in 1 % PBS-BSA (Table 2). After washing steps, appropriate fluorescent-labeled secondary antibodies were diluted and applied under the same conditions while protecting from light. The nuclei were counterstained with DAPI. Images were acquired with an Apotome microscope (Zeiss) equipped with a 10x long-range objective and analysed with the Icy software.

3.5. Alkaline phosphatase activity

Colonies were fixed with 95 % ethanol and the enzymatic activity was revealed after addition of BCIP/NBT colorimetric substrates (Sigma-Aldrich, B5655).

3.6. DNA isolation, karyotype and PCR analyses

DNA was isolated using the NucleoSpin Tissue Mini kit (Macherey-Nagel, 740952.50) at P10. Molecular karyotyping was performed employing an Infinium HumanCore-24 v1.2 BeadChip (Illumina, 20024566) containing 300,000 SNPs. Data was analysed with the GenomeStudio software. The presence of the mutation was verified by Sanger sequencing after fragment PCR amplification (Table 2).

3.7. RNA extraction and RT-PCR analyses

RNA was extracted with RNeasy Mini Kit (Qiagen, 74134), assessed with a NanoDrop before cDNA synthesis using a cDNA RT kit (ThermoFisher, 4368814). At P16, the expression of pluripotency and germ layer markers for IPi002-A were evaluated by TaqMan hPSC Scorecard assay (ThermoFisher, A15876) and analysed with the hPSC Scorecard software. At P20, the loss of the reprogramming viruses was verified in all lines as well as the gain of some endogenous pluripotency markers (Table 2).

3.8. Mycoplasma detection

Mycoplasma contamination was excluded at P20 by PCR.

3.9. STR analysis

N/A. cf. “Cell line identity testing”.

3.10. Cell line identity testing

Instead of an STR analysis, we used an Infinium HumanCore-24 v1.2 BeadChip (Illumina, 20024566) containing 300,000 SNPs to compare the genome of the parental AFCs and the derived hiPSCs. A summary of the analysis is presented in Fig. 1F and G for all three lines. The complete results have been uploaded under the file type “STR analysis” to validate the cell lines, but they will not be published alongside the article to protect the identity of the donor. In addition, the pathological mutation was present in parental AFCs as well as in all related hiPSCs (Fig. 1H).

3.11. Karyotype

The karyotype was normal (Fig. 1F).

CRediT authorship contribution statement

Mikaël Boullé: Writing – review & editing, Writing – original draft, Visualization, Validation, Supervision, Software, Resources, Project administration, Methodology, Investigation, Funding acquisition, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Ambre Leleu:**

Validation, Methodology, Investigation, Formal analysis. **Siham Schacre:** Writing – original draft, Data curation. **Céline Banal:** Validation, Methodology, Investigation, Formal analysis. **Alix Boucharlat:** Resources. **Solene Renault:** Validation, Methodology, Investigation, Formal analysis. **Marcel Hollenstein:** Resources, Project administration. **Patrick Frosk:** Resources. **Frank Yates:** Supervision, Resources, Project administration. **Nathalie Lefort:** Visualization, Validation, Supervision, Software, Resources, Project administration, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Fabrice Agou:** Resources, Project administration.

Declaration of competing interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: Fabrice Agou and Mikael Boule reports financial support was provided by Finnish Academy of Science and Letters. Fabrice Agou reports financial support was provided by French National Research Agency. If there are other authors, they declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

During the COVID-19 pandemic, the Direction des Applications de la Recherche et des Relations Industrielles (DARRI) and the Institut Pasteur provided funding for this project. F.A. also acknowledges funding from the Agence Nationale de Recherche (ANR, grant number 21-CE17-0014-04 KREM-AIF). F.A. and M.B. thank the Finnish Academy of Science for funding. M.B. acknowledges the Université Paris-Cité, as he was a recipient of a Ph.D. fellowship at the beginning of this work. None of the funders were involved in the research process. We thank Dr. Patrick Frosk for providing us with the appropriate AFCs.

Appendix A. Supplementary data

Additional features of the hiPSC IPi002-A/B/C lines. **A)** Expression of the OCT4 and SOX2 pluripotency markers quantified by image analysis after immunofluorescence staining in IPi002-A/B/C. We used the respective fluorescence signal without adding the specific primary antibody as our control condition. We define a positive cell when the average intensity of a DAPI+ nucleus is above the threshold. **B)** Immunofluorescence of MARCH hiPSCs targeting markers of the three germ layers: PAX6 – ectoderm; CD73 – mesoderm; AFP – endoderm. **C)** Absence of *Mycoplasma* in our hiPSC lines verified by PCR with a positive control. **D)** Clearance of *Sendai* viruses (*SeV*) and gain of pluripotency markers expression in hiPSCs tested by RT-PCR. We compared these results with the expression in amniotic fluid cells (AFCs) before and after transduction (+*SeV*). RPLP0 is a technical control (lane 1). Pluripotency corroboration with endogenous expression of *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4* and *c-MYC* (lanes 2–5). Transduced *Sev*, *KOS*, *KLF4* and *c-MYC* viral RNAs are transiently expressed during reprogramming of AFCs into hiPSCs (lanes 6–9). **E)** A TaqMan hPSC Scorecard assay was performed in undifferentiated IPi002-A in comparison with our in-house established healthy hiPSC IMAGINi005-A derived from PBMCs and with our previously published healthy hiPSC IPi001-A derived from AFCs. Both lines were compared to the reference set. The expression heatmap of the tested genes is showed as well as the global correlation of expression between IPi002-A and the controls. Our lines displayed self-renewal features of hiPSCs without differentiation. Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.scr.2024.103589>.

References

- Boullé, M., Boucharlat, A., Leleu, A., Banal, C., Coussement, A., Hollenstein, M., Yates, F., Lefort, N., Agou, F., 2024. Generation of IPI001-A/B/C human induced pluripotent stem cell lines from healthy amniotic fluid cells. *Stem Cell Res.* 76, 103350.
- Frosk, P., Arts, H.H., Philippe, J., Gunn, C.S., Brown, E.L., Chodirker, B., Simard, L., Majewski, J., Fahiminiya, S., Russell, C., Liu, Y.P., Hegele, R., Katsanis, N., Goerz, C., Del Bigio, M.R., Davis, E.E., 2017. A truncating mutation in CEP55 is the likely cause of MARCH, a novel syndrome affecting neuronal mitosis. *J. Med. Genet.* 54, 490–501.
- Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., Hasegawa, M., 2009. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 85, 348–362.
- Lefort, N., Feyeux, M., Bas, C., Feraud, O., Bennaceur-Griscelli, A., Tachdjian, G., Peschanski, M., Perrier, A.L., 2008. Human embryonic stem cells reveal recurrent genomic instability at 20q11.21. *Nat. Biotechnol.* 26, 1364–1366.
- Tsankov, A.M., Akopian, V., Pop, R., Chetty, S., Gifford, C.A., Daheron, L., Tsankova, N. M., Meissner, A., 2015. A qPCR ScoreCard quantifies the differentiation potential of human pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* 33, 1182–1192.

1.1.2. Génération des lignées corrigées à l'aide de l'outil CRISPR-Cas9

1.1.2.1. Introduction

Les lignées hiPSCs saines et de patients n'ont pas montré de différences morphologiques ni de problème de croissance ou de division. Différentes productions d'organoïdes cérébraux générées en suivant le protocole de M. A. Lancaster ont montré des différences significatives en terme de développement des organoïdes notamment au niveau de leur taille et de leur structure (cf. *Résultats : génération d'organoïdes sain et MARCH*). Pour s'assurer que ces différences phénotypiques étaient bien dues à la mutation identifiée, il a été décidé de modifier génétiquement un des trois clones de patients afin de recréer une lignée saine à partir de ce clone. La modification génétique a été réalisée grâce à l'outil de modification génétique CRISPR-Cas9. L'intérêt d'obtenir une telle lignée isogénique est que les deux lignées auront le même fond génétique, seule la mutation au niveau du gène identifié diffère. Les mêmes expériences que sur les lignées saines et malades ont ainsi été réalisées afin de voir si la perte de cette mutation pathogène permet de générer des organoïdes cérébraux dont le développement est de nouveau normal et peut s'apparenter à un retour au phénotype sain.

1.1.2.2. Stratégie développée

L'objectif était de corriger le codon stop apparu en position 425 à la place d'une sérine pour obtenir à nouveau la séquence originale (**Figure 29**). Pour réaliser la modification génétique à l'aide de l'outil CRISPR-Cas9, il est nécessaire de construire un guide ARN pour permettre à l'enzyme de cibler l'endroit précis où la correction est souhaitée. De plus, l'utilisation d'une matrice de réparation servant de support pour introduire la séquence souhaitée est également nécessaire.

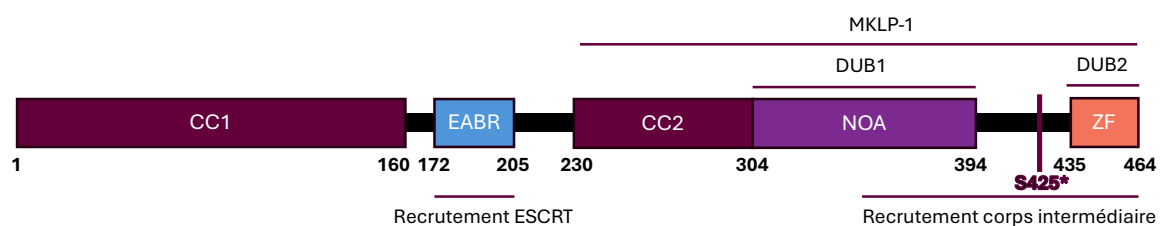


Figure 29 : Gène CEP55 avec la mutation S425* responsable du syndrome MARCH

Concernant la construction du guide, des paramètres précis doivent être respectés pour construire un guide qui soit efficace. Comme expliqué précédemment, l'endonucléase utilisée provient de la bactérie streptococcus pyogenes (spCas9) et a un site de reconnaissance, appelé motif adjacent au

protoespaceur (PAM), dont la séquence est NGG. Cette séquence PAM ne doit pas être comprise dans le guide pour qu'il soit fonctionnel. De plus, le guide doit avoir une taille de 20 paires de bases en amont de la séquence PAM. Pour augmenter l'efficacité du système afin d'obtenir la mutation souhaitée, plusieurs guides sont utilisés. Enfin, un dernier paramètre doit être pris en compte, le risque de mutations hors cibles, c'est-à-dire le risque qu'un des guides puisse cibler un autre endroit dans le génome que l'endroit souhaité. Plusieurs logiciels sont disponibles pour aider dans la tâche de construction de guides et ont été utilisés : CRISPOR, Benchling et CHOPCHOP. Il est important de comparer les résultats entre plusieurs logiciels car ils ne reposent pas tous sur les mêmes algorithmes. Prendre un guide optimal sur différents logiciels favorise le succès de coupure même si l'efficacité d'un guide ne peut être assurée avant d'avoir été testée.

Entourant la mutation dans le gène CEP55, la même séquence d'ADN de 200 paires de bases est entrée dans les trois logiciels suivant CRISPOR, Benchling et CHOPCHOP :

```
ttgaaacttatttttcagAAACAGCTTCATGAGTTTGCCATCACAGAGCCATTAGTCACTTTCCAAGGAG
AGACTGAAAACAGAGAAAAAGTTGCCGCCTACCAAAAAGTCCCCTGCTGCACTCAATGAAAG
CCTGGTGAATGTCCCAAGTGAATATACAGTATCCAGCCACTGAGCATCGCGATCTGCTTGTC
CA
```

Tous les guides ARN présents dans cette séquence sont donnés par les différents logiciels. Plusieurs guides sont présents au niveau de la mutation souhaitée. Parmi ces guides, deux guides ont été sélectionnés pour le projet. Les deux guides se trouvent sur le brin d'ADN négatif. Il faudra donc faire attention lors de la construction de la matrice de réparation de bien prendre en compte ce paramètre afin que les mutations soient correctement intégrées sur le brin positif.

Numéro du guide	Séquence du guide
1	3' - AGTGGGACTTTTTGGTG.AGG CGG - 5'
2	3' - AGCAGTGGGACTTTTTG.GTT AGG - 5'

Tableau 6 : Liste des guides ARN pour modifier le codon stop 425 en sérine
Pour chaque guide, la séquence en gras correspond au PAM qui ne doit pas être intégré dans le guide. De plus, le point surligné en jaune correspond à l'endroit de la coupure de l'enzyme Cas9.

Le guide 1 semble être le plus performant avec un taux d'efficacité de 58% et coupe à l'endroit voulu de la mutation. Le guide numéro 2, quant à lui, est prédit avec une efficacité de coupure à 52% en coupant à 2pb de l'endroit de la mutation souhaitée (**Tableau 6**).

La matrice de réparation est le deuxième élément clef du système et doit également remplir des critères précis pour réaliser une bonne modification. Le choix de la taille de la matrice de réparation ici est de 112 paires de bases. Pour une augmentation de l'efficacité de réparation, il est recommandé de ne pas construire une matrice de réparation totalement symétrique par rapport à la mutation que l'on souhaite corriger. Enfin, il ne faut pas oublier de modifier également le motif PAM car sinon, une cellule, qui a déjà été modifiée, peut être modifiée à nouveau tant que l'enzyme Cas9 s'exprime. Si plusieurs guides sont sélectionnés, il est important d'adapter la matrice de réparation en conséquence pour ne pas éviter ce problème de coupures infinies.

Numéro de la matrice de réparation	Numéro du guide ARN associé	Séquence de la matrice de réparation
1	1	5'- TCACAGAGCCATTAGTCACTTTCCAAGGAGAGACTGAAAACAG AGAAAAAGTTGT TCGCCT CACCAAAAAGTCCCCTGCTGCACTCA ATGAAAGCCTGGTGAATGTCCCAAGTGAATAT -3'
2	2	5'- TCACAGAGCCATTAGTCACTTTCCAAGGAGAGACTGAAAACAG AGAAAAAGTTG CCGTCT CACCAAAAAGTCCCCTGCTGCACTCA ATGAAAGCCTGGTGAATGTCCCAAGTGAATAT -3'

Tableau 7 : Liste des matrices de réparation pour modifier le codon stop 425 en sérine

En orange, le PAM à muter pour éviter que la Cas9 ne coupe indéfiniment ou en tout cas plusieurs fois. En rouge, la mutation A>C pour changer le codon STOP en sérine.

Pour la mutation au niveau du PAM, bien que le code génétique soit redondant ici, il n'y a pas la possibilité de garder le même codon alanine (Ala). La décision a été prise de muter ce codon Ala en prenant le codon le plus proche possible soit la valine (Val). Ces deux codons font partie de la famille des acides aminés aliphatiques, famille d'acides aminés qui ne comportent pas de charge et cycle particulier (**Tableau 7**).

Pour des raisons de contrainte de temps, bien que la stratégie ait été établie et validée par l'ensemble de l'équipe du projet, il a été décidé de sous-traiter cette partie à un partenaire industriel SYNTHÉGO, afin d'obtenir des clones plus rapidement. En effet, les cellules iPSCs sont des cellules dans lesquelles le taux de transfection reste faible, ce qui signifie qu'il peut être compliqué d'y faire entrer

de l'ADN (sous forme de plasmides), de l'ARN ou des protéines. De fait, l'apport du système CRISPR-Cas9 complet dans les iPSCs pour réaliser la modification avec un taux suffisant serait à mettre au point et à optimiser. Une fois l'étape de transfection mise au point, il faut procéder à une étape de sélection clonale. Celle-ci se fait principalement par tri au FACS, ce qui nécessite de dissocier les iPSCs. Cependant, les iPSCs sont sensibles à la culture unicellulaire et une résurgence de cellules non éditées peut être observées, surtout si le taux de transfection est faible.

1.2. Génération des organoïdes cérébraux sains, MARCH et corrigés

1.2.1. Matériel et méthode

1.2.1.1. Protocole de génération d'organoïdes cérébraux

Le protocole de génération des organoïdes cérébraux utilisé pour le projet est adapté de (Lancaster et al., 2013; Lancaster & Knoblich, 2014). Brièvement, les hiPSCs sont traitées avec de l'EDTA (SIGMA #E8008) puis placées pendant 3 minutes à 37°C pour commencer à détacher les colonies. L'EDTA est remplacé par de l'Accutase (STEMCELL Technologies, AT-104) puis les cellules sont incubées pendant 4 min à 37°C afin d'obtenir une suspension unicellulaire. Pour enlever l'Accutase, les cellules sont centrifugées et re-suspendues dans le milieu de génération des organoïdes cérébraux (pour 5mL) : 4mL de DMEM-F12+Glutamax (GIBCO, 11330-032), 1mL de KOSR (GIBCO, 10828-010), 50µL de MEM-NEAA (GIBCO, 11140-035), 50µL Pen/Strep (GIBCO, 151140-122), 0.2µL bFGF à 100ng/mL (GIBCO, 13256029), 25µL ROCK inhibitor à 10mM (EMD Chemicals, #688001), 1µL SB-431542 à 50mM et 0.5µL LDN-193189 à 100mM. Les cellules re-suspendues sont concentrées à 20,000 cellules par goutte de 22µL. Les gouttes sont ensuite déposées sur le couvercle d'une B10. Le couvercle est ensuite retourné sur le fond de la boîte contenant du PBS1X. Ceci permet aux cellules de s'agréger par gravité au fond de la goutte. Deux jours après, les corps embryoides sont récoltés dans 500µL de milieu hES et mis dans des puits de P24. 500µL de milieu de génération des organoïdes cérébraux sont ajoutés deux jours plus tard. Le milieu des organoïdes est changé pour un nouveau milieu pour induire la différenciation neuronale avec 500µL par puits composé de (pour 25mL) : 24,5mL de DMEM-F12+Glutamax (GIBCO, 11330-032), 250µL de MEM-NEAA (GIBCO, 11140-035), 250µL de Pen/Strep (GIBCO, 15140-122) et 250µL de N2 supplément 100X (GIBCO, 17502-048). A jour 8, 500µL de milieu de différenciation neuronale est ajouté. A jour 10, chaque organoïde est enrobé dans une goutte de Matrigel (CORNING, 354230). Les organoïdes sont déposés dans des puits de plaque P6 dans un milieu organoïdes sans acide rétinoïque composé de (pour 50mL) : 25mL DMEM-F12 + Glutamax (GIBCO, 11330-032), 25 mL Neurobasal Medium (GIBCO, 21103-049),

500µL Pen/Strep (GIBCO, 15140-122), 500µL de B27 sans acide rétinolique (GIBCO, 12587-010), 250µL de MEM-NEAA (GIBCO, 11140-035), 250µL de N2 supplément 100X (GIBCO, 17502-048), 12.5µL d'insuline humaine (SIGMA, 19278-5ML) et 0.5µL de β-mercaptoéthanol (GIBCO, 21985-023). A jour 17, le milieu des organoïdes devient un milieu organoïdes avec acide rétinolique composé de (pour 50mL) : 25mL DMEM-F12 + Glutamax (GIBCO, 11330-032), 25 mL Neurobasal Medium (GIBCO, 21103-049), 500µL Pen/Strep (GIBCO, 15140-122), 500µL de B27 avec acide rétinolique (GIBCO, 12504-044), 250µL de MEM-NEAA (GIBCO, 11140-035), 250µL de N2 supplément 100X (GIBCO, 17502-048), 12.5µL d'insuline humaine (SIGMA, 19278-5ML) et 0.5µL de β-mercaptoéthanol (GIBCO, 21985-023). Les milieux des organoïdes cérébraux sont changés toutes les semaines.

1.2.1.2. Suivi de croissance

A chaque changement de milieu, les corps embryoides ou les organoïdes cérébraux sont pris en photos grâce à un appareil photo fixé au niveau d'un microscope inversé Leica DMI LED. Les images sont traitées à l'aide du logiciel Fiji. Une photo de cellule de Malassez (Rogo Sampaic™ ZMB021) est prise avec l'appareil photo comme contrôle pour pouvoir faire une conversion de surface. Les organoïdes sont ensuite détournés à l'aide du logiciel Fiji avant de que les mesures soient converties en surface.

1.2.1.3. Cryopréservation et coupes d'organoïdes cérébraux

A l'arrêt de culture, les organoïdes sont fixés dans du paraformaldéhyde (PFA) 4% pendant 30 minutes à température ambiante (TA). Les organoïdes sont rincés 3 fois 5 minutes avec du PBS1X (SIGMA-ALDRICH, D8537-6X500ML). Les échantillons sont ensuite incubés dans une solution de sucrose 30% pendant la nuit puis pendant 1h à 37°C au bain-marie dans une solution de PBS1X contenant 15% sucrose et 7,5% gélatine. Les organoïdes sont placés dans des petits moules et incubés 10min à 4°C. Les échantillons sont enfin démoulés et plongés 1min dans une solution d'isopentane (SIGMA-ALDRICH, M32631) placée dans de la carboglace afin de les congeler.

Les organoïdes sont coupés au cryostat Leica CM3050. Des coupes de 7µm sont réalisées.

1.2.1.4. Immunomarquages

Pour réaliser les immunofluorescences ainsi que leur acquisition ultérieure, une étroite collaboration s'est développée avec la plate-forme d'histologie de l'Institut Pasteur. La plate-forme possède un colorateur IHC automatisé Bond

(Leica) qui permet de marquer des nombres importants de lames avec une précision, une homogénéité, une répétabilité et une rapidité bien supérieures à celles des tests réalisés par l'Homme. De plus, un système d'analyse d'images histologiques avec un scanner de lames semi-automatique est disponible au sein de la plate-forme avec une station d'analyse d'images. Avant de commencer la préparation des immunofluorescences, il faut préparer les mélanges de marquage, annoter les lames avec des autocollants selon une nomenclature rigoureuse, utiliser et programmer l'appareil de marquage et le scanner. Brièvement, les tranches ont été démasquées avec une solution de citrate 10 mM et 0,05 % de Tween 20 à pH6. Avant le marquage, elles ont été bloquées avec 1 % de BSA et perméabilisées avec 0,25 % de triton X-100. Les anticorps primaires ont été incubés pendant 1 heure à température ambiante, avant d'être lavés trois fois avec du PBS1X. Ensuite, les anticorps secondaires ont été appliqués, ainsi que le DAPI, et laissés pendant une heure supplémentaire. Cette étape a été suivie d'une autre séquence de trois lavages au PBS1X. À l'abri de la lumière, les lames ont été séchées et montées. La liste des anticorps primaires et secondaires utilisés est présentée dans le **Tableau 8**. Ces anticorps spécifiques ont été choisis pour la plupart en raison de leur efficacité précédemment prouvée dans d'autres articles, bien que nous ayons parfois dû choisir un nouvel anticorps moins testé (Lancaster et al., 2013). L'acquisition des images a été réalisée à l'aide d'un microscope confocal automatique Zeiss à un grossissement de 40x. Les signaux de fluorescence ont été enregistrés à trois longueurs d'ondes différentes pour les marqueurs (488, 555, 647 nm), ainsi qu'un signal UV pour le DAPI. Par la suite, les images ont été analysées à l'aide de l'application Zen Blue, spécialement conçue pour l'édition et l'analyse d'images d'immunofluorescence.

	Type cellulaire / tissu	Antigène	Isotype	Fournisseur	Référence
Marqueurs de la progression de la différenciation	Glie radiaire / NPCs	PAX6	Lapin PLC	BioLegend	901301
	Glie radiaire / NPCs	PAX6	Souris IgG1	Santa Cruz	sc-81649
	Glie radiaire / NPCs	PAX6	Lapin PLC	Invitrogen	#42-6600
	Glie radiaire / NPCs	PAX6	Lapin IgG2a	Santa Cruz	sc-53108
	Glie radiaire / NPCs	SOX2	Lapin PLC	Chemicon	AB5603
	Glie radiaire / astrocytes	GFAP	Lapin PLC	StemCell Technologies	60128
	Progéniteur intermédiaire	TBR2	Lapin MNC	Abcam	Ab216870
	Neurones	B3-Tubuline	Souris IgG2a	BioLegend	801202
Prolifération des NPCs	Neurones	DCX	Souris IgG1	Santa Cruz	sc-271390
	Prolifération	Ki-67	Souris IgG1	Bio Techne	NBP2-22112
Mort cellulaire	Prolifération	Phospho-vimentine	Souris IgG2b	MBL International	D076-3
	Mort cellulaire	Caspase 3 clivée (Asp175)	Lapin MNC	Cell Signaling Technology	D076-3 (5A1E)
Mort cellulaire	Mort cellulaire	Caspase 3 active	Lapin PLC	Bio Techne	AF835
	Localisation ventriculaire	N-cadhérine	Souris IgG1	BD Biosciences	610920
Régionalisation cérébrale	Choroïde plexus	TTR	Mouton	Bio-Rad	AHP1837
	Prosencéphale	FOXG1	Lapin PLC	Abcam	ab18259
	Pro/Mésencéphale	OTX1+2	Lapin PLC	Abcam	ab21990
	Rhombencéphale	PAX2	Souris IgG2a	Abnova	H00005076-M01
	Prosencéphale dorsal	EMX1	Lapin PLC	Sigma	HPA006421
	Prosencéphale dorsal	NKX2.1	Lapin PLC	Abcam	ab76013
Cytocinèse	Corps intermédiaire	CEP55	Souris IgG2a	Santa Cruz	sc-374051 (B8)
	Corps intermédiaire	CEP55	Souris IgG2b	Santa Cruz	sc-377018
	Corps intermédiaire	CEP55	Lapin PLC	Prestige	HPA023430
	Corps intermédiaire	MKLP1	Lapin PLC	Santa Cruz	sc-867 (N19)
	Pont intercellulaire	Kinase Aurora B	Souris IgG1	BD Biosciences	611083
Cil primaire	Cil	ARL13b	Lapin PLC	Proteintech	17711-1-AP
Anticorps secondaire	Souris IgG1		Chèvre - AF488	ThermoFisher Scientific	A21121
	Souris IgG2a		Chèvre - AF647	ThermoFisher Scientific	A21241
	Souris IgG2a		Chèvre - AF555	ThermoFisher Scientific	A21137
	Souris IgG2b		Chèvre - AF647	ThermoFisher Scientific	A21242
	Lapin IgG		Chèvre - AF555	ThermoFisher Scientific	A21428
	Lapin IgG		Chèvre - AF488	ThermoFisher Scientific	A11034
	Mouton IgG		Âne - AF647	ThermoFisher Scientific	A21488

Tableau 8 : Tableau récapitulatif des anticorps utilisés pour les immunofluorescences du projet MARCH

1.2.1.5. Différenciation des iPSCs en cardiomyocytes

Des plaques 4 puits sont traitées avec 12µL/mL de Geltrex (Thermo Fisher #A1413302) et incubées à température ambiante pendant 1h. Les iPSCs à une confluence de 80% sont détachées en ReLeSR (STEMCELL Technologies #05872). La **Figure 30** permet de visualiser les différentes étapes du protocole. Brièvement, les cellules sont re-suspendues dans 50µL de mTeSR™ Plus complet (STEMCELL Technologies #100-0276). Les cellules sont comptées etensemencées à une densité cellulaire de 5.10⁵ cellules par puits avec du Y-27632 (Rock1) à une concentration finale de 10µM (STEMCELL Technologies, 72302). Le lendemain, le milieu des iPSCs est changé en retirant le Rock1. La confluence des cellules doit être supérieure à 95% pour que le protocole de différenciation puisse être initié. Le premier milieu de différenciation de cardiomyocytes A, composé de 900µL de STEMdiff™ Cardiomyocyte Differentiation Basal (STEMCELL Technologies, 05011) et 100µL de mL STEMdiff™ Ventricular Cardiomyocyte Differentiation Supplement A (STEMCELL Technologies, 05012), dont 500µL par puits sont dispensés. Deux

jours plus tard, le milieu cardiomyocytes A est remplacé par la même quantité de milieu cardiomyocytes B, composé de 900µL de STEMdiff™ Cardiomyocyte Differentiation Basal (STEMCELL Technologies, 05011) et 100µL STEMdiff™ Ventricular Cardiomyocyte Differentiation Supplement B (STEMCELL Technologies, 05013). A jour 4, le milieu de différenciation cardiomyocytes B est remplacé par le milieu cardiomyocytes C, composé de STEMdiff™ Cardiomyocyte Differentiation Basal (STEMCELL Technologies, 05011) et 100µL STEMdiff™ Ventricular Cardiomyocyte Differentiation Supplement C (STEMCELL Technologies, 05014). Les cardiomyocytes sont laissés dans le milieu cardiomyocytes C pour 4 jours avec un changement de milieu tous les deux jours. A partir du huitième jour, les cardiomyocytes sont placés dans un milieu de maintien, composé de 990µL de mL STEMdiff™ Cardiomyocyte Differentiation Basal (STEMCELL Technologies, 05015) et 10µL de STEMdiff™ Ventricular Cardiomyocyte Differentiation Supplement M (STEMCELL Technologies, 05016), et qui est changé tous les deux jours jusqu'à l'arrêt de la culture.

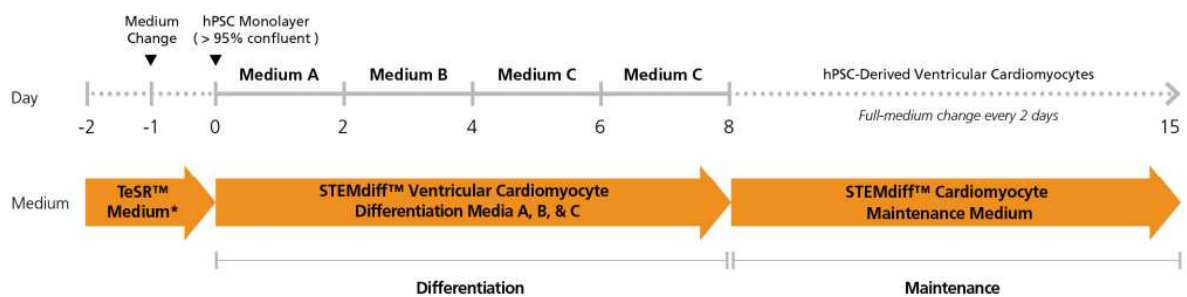


Figure 30 : Diagramme du protocole de différenciation des iPSCs en cardiomyocytes

1.2.2. Résultats : génération d'organoïdes sain et MARCH

1.2.2.1. Caractérisation et comparaison des organoïdes cérébraux sains et MARCH

Une première production d'organoïdes a été effectuée avec les trois clones de la lignée contrôle et trois clones de la lignée pathologique. Ne sachant pas quels résultats cette première production allait donner, il a été décidé de générer des organoïdes sur une durée de 3 mois pour s'assurer que les signes physiopathologiques du Syndrome MARCH soient détectables. Le plan d'expérience de cette première production est présenté en **Figure 31**.

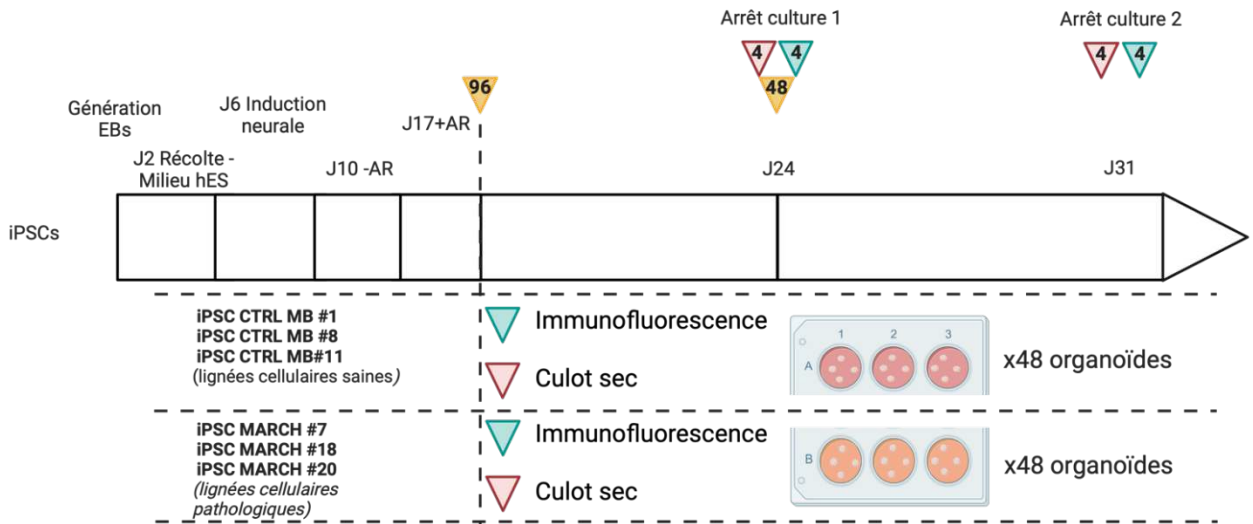


Figure 31 : Plan de manipulation de la première production d'organoïdes cérébraux

Le suivi des organoïdes cérébraux sur trois mois est présenté sur la **Figure 32**. A partir de la deuxième semaine de culture, une différence de taille significative est observable et se confirme sur les treize semaines de culture suivantes. Bien que la différence de taille soit importante, il est important de caractériser les organoïdes.

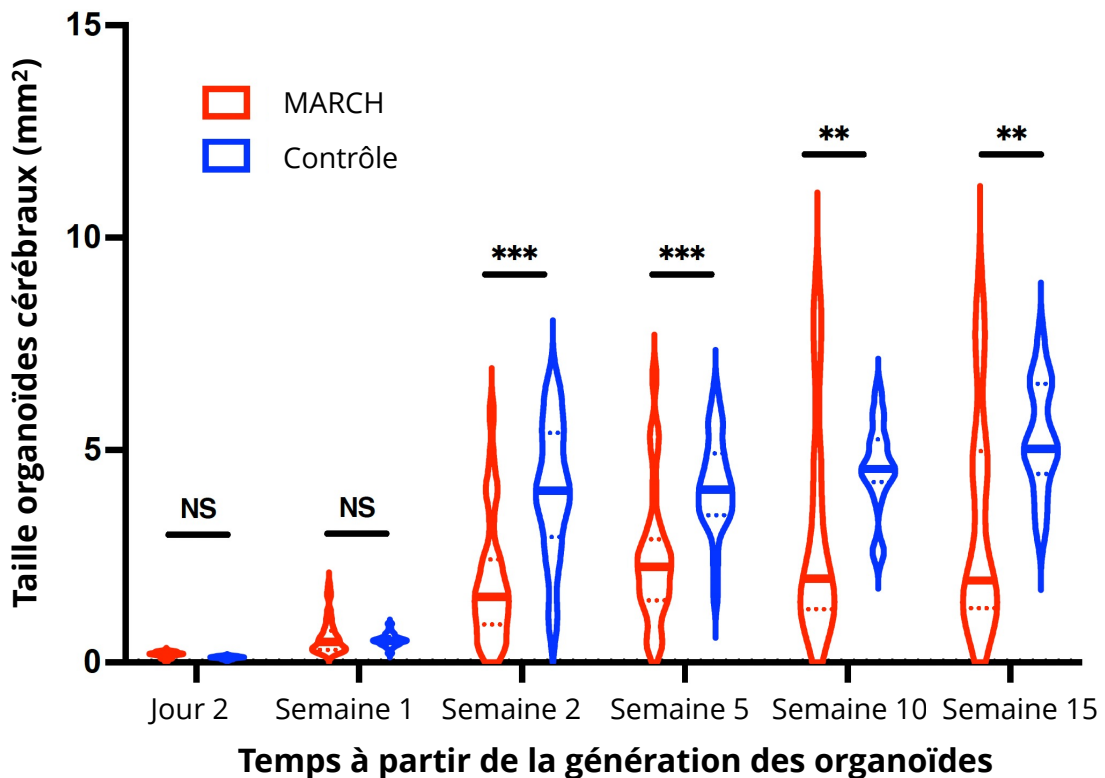


Figure 32 : Suivi de croissance de la première production des organoïdes cérébraux

A partir de 2 semaines, les organoïdes cérébraux MARCH sont significativement plus petits et le restent jusqu'à l'arrêt de la culture des organoïdes à 15 semaines. Les 3 clones MARCH et les trois clones contrôle sont regroupés pour être les plus représentatifs possible et refléter l'hétérogénéité présente entre les différents clones d'une même lignée.

Le suivi de croissance a permis de confirmer les attendus d'un point de vue de la taille des organoïdes mais cet unique paramètre ne permet pas de conclure sur l'état des organoïdes observés. De manière plus fine, la morphologie ainsi que l'organisation des organoïdes sont étudiées à l'aide de marquages sur fond clair hématoxyline/éosine sur des coupes d'organoïdes faites par cryostat. La **Figure 33** a été générée en essayant de continuer à prendre en compte les différences de taille observées entre les différents clones, c'est-à-dire que tous les clones sont représentés à la même échelle. Les clones sains 1, 8 et 11 ont des tailles similaires contrairement aux organoïdes cérébraux MARCH dont les clones 18 et 20 sont plus petits que les organoïdes contrôles. A l'inverse, le clone MARCH 7 est plus grand que les organoïdes contrôles. Les colorations hématoxyline/éosine permettent de déterminer que la structure des organoïdes sains 1, 8 et 11 ainsi que les organoïdes MARCH 7 sont très similaires même si la morphologie du clone sain 11 semble un peu moins structuré et que l'organoïde 7 présente un trou en son sein. Cette différence morphologique peut être due à la technique de génération des organoïdes car, comme les organoïdes sont non-guidés, une plus grande hétérogénéité peut être observée au sein d'une même production. Enfin, les organoïdes MARCH 18 et 20 semblent plutôt avoir des structures plus ou moins aléatoires avec des tissus qui paraissent très différents de ce qui est attendu au niveau du cerveau.

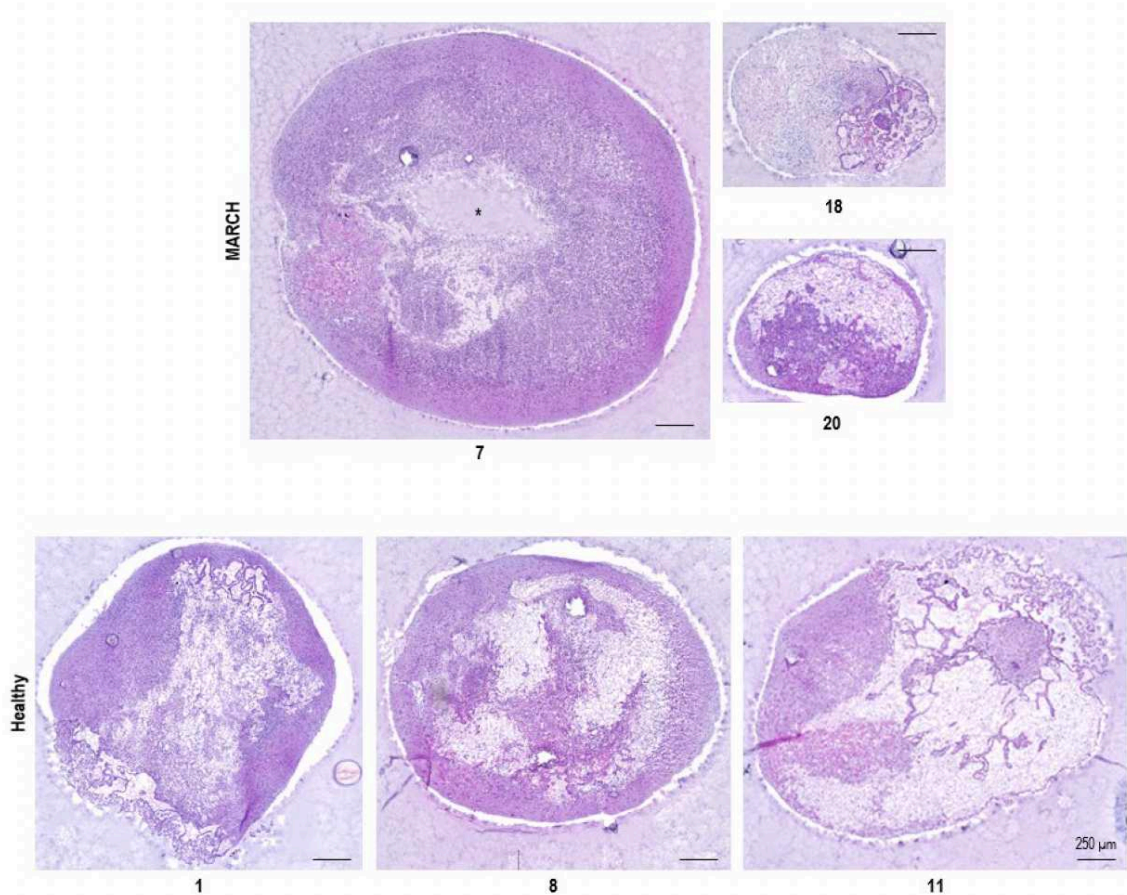


Figure 33 : Images représentatives d'un marquage hématoxyline et éosine sur des organoïdes cérébraux générés à partir des trois clones MARCH et des trois clones contrôle

Des organoïdes de treize semaines ont été marqués avec une coloration hématoxyline/éosine et imagés à 40X avec un microscope confocal Axio Scan Z1 ZEISS. La barre d'échelle correspond à 250µm.

Une fois la taille et la morphologie étudiée, il est important de s'intéresser à la composition globale des différents organoïdes. Plusieurs axes vont être étudiés :

- La progression de la différenciation cellulaire,
- La régionalisation cérébrale des différents organoïdes
- La présence ou l'absence des marqueurs de la cytokinèse.

Parmi plusieurs techniques possibles, il a été choisi d'étudier ces différents axes en utilisant la technique d'immunofluorescence. Pour le premier axe, des marquages β 3-Tubuline, DCX, GFAP, SOX2, PAX6 et TBR2 permettent de suivre l'évolution de la différenciation cellulaire au sein des organoïdes. Des cellules souches neurales ou de la glie radiaire sont marquées par les anticorps SOX2 et PAX6 et définissent un état de différenciation peu avancé. Le marquage TBR2, quant à lui, permet d'identifier les progéniteurs intermédiaires. Enfin, les marquages β 3-Tubuline, DCX vont permettre d'identifier les neurones, cellules qui

ont fini leur différenciation cellulaire, de même que les cellules marquées GFAP permettant d'identifier principalement les astrocytes mais également la glie radiaire. La **Figure 34** et la **Figure 35** sont des images représentatives obtenues pour les différents marquages qui permettent de suivre la progression de la différenciation au sein des organoïdes.

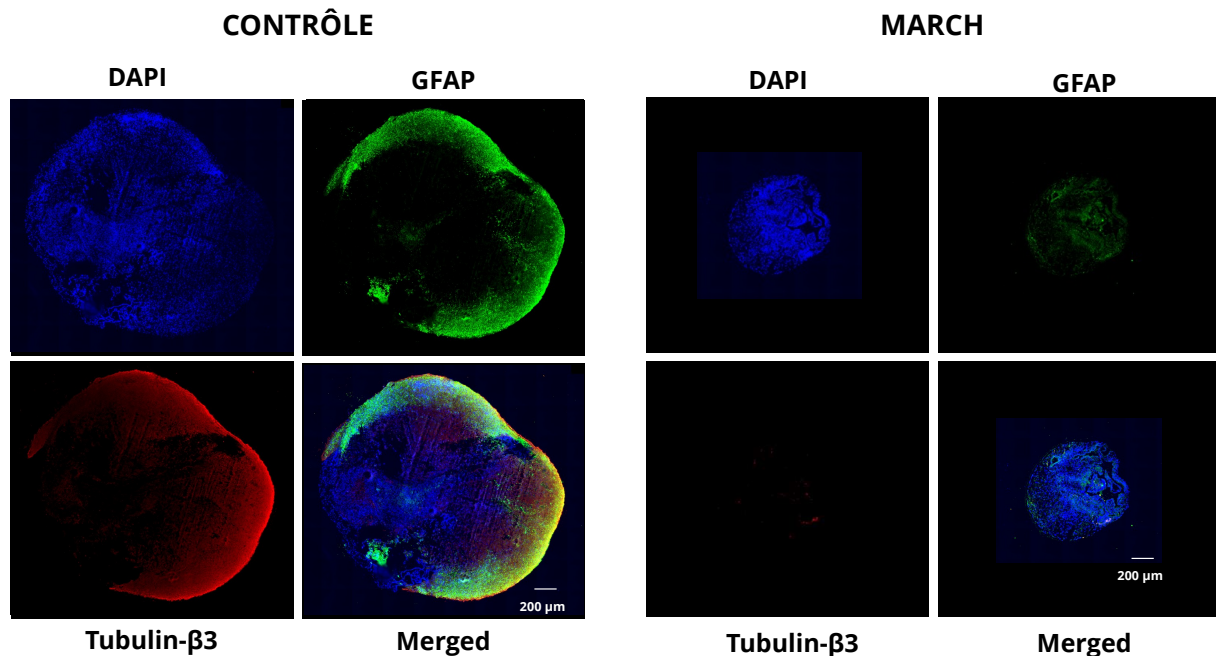


Figure 34 : Représentation illustrative de coupes histologiques d'organoïdes cérébraux marquées par immunofluorescence GFAP et β 3-tubuline

Un organoïde sain et un organoïde MARCH de 3 mois ont été marqués et une mise à l'échelle pour garder la différence de taille observée entre les deux organoïdes a été faite. Les deux organoïdes ont été marqués par les anticorps GFAP en vert et β 3-tubuline en rouge avec une contre-coloration des noyaux au DAPI en bleu. Les images ont été prises avec un microscope confocal automatique Zeiss au grossissement 40X. La barre d'échelle représente 200 μ m.

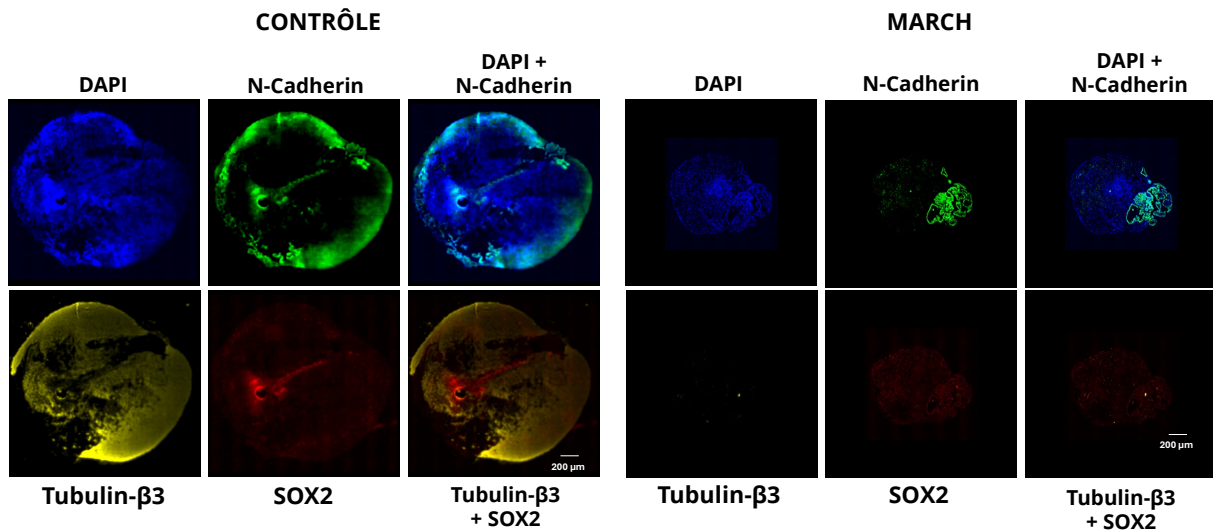


Figure 35 : Représentation illustrative de coupes histologiques d'organoïdes cérébraux marquées par immunofluorescence SOX2, β3-Tubuline et N-cadhérine.

Un organoïde sain et un organoïde MARCH de 3 mois ont été marqués et une mise à l'échelle pour garder la différence de taille observée entre les deux organoïdes a été faite. Les deux organoïdes ont été marqués par les anticorps N-cadhérine en vert, SOX2 en rouge, β3-tubuline en jaune avec une contre-coloration des noyaux au DAPI en bleu. Les images ont été prises avec un microscope confocal automatique Zeiss au grossissement 40X. La barre d'échelle représente 200µm.

Pour identifier les différentes zones cérébrales présentes dans ces organoïdes générés par un protocole de différenciation non-guidé, les marqueurs suivants sont utilisés : N-Cadhérine (N-Cad), TTR, FOXG1, OTX1+2 et Pax2. Le marquage N-Cad identifie les zones ventriculaires au niveau du cerveau. Le marquage TTR marque le plexus choroïde. Le marquage FOXG1 permet d'identifier le prosencéphale, le marquage OTX1+2, la jonction entre le prosencéphale et le mésencéphale enfin le marquage PAX2 identifie le rhombencéphale. La **Figure 36** montre des images représentatives obtenues pour les différents marquages qui permettent de suivre les localisations cérébrales au sein des organoïdes.

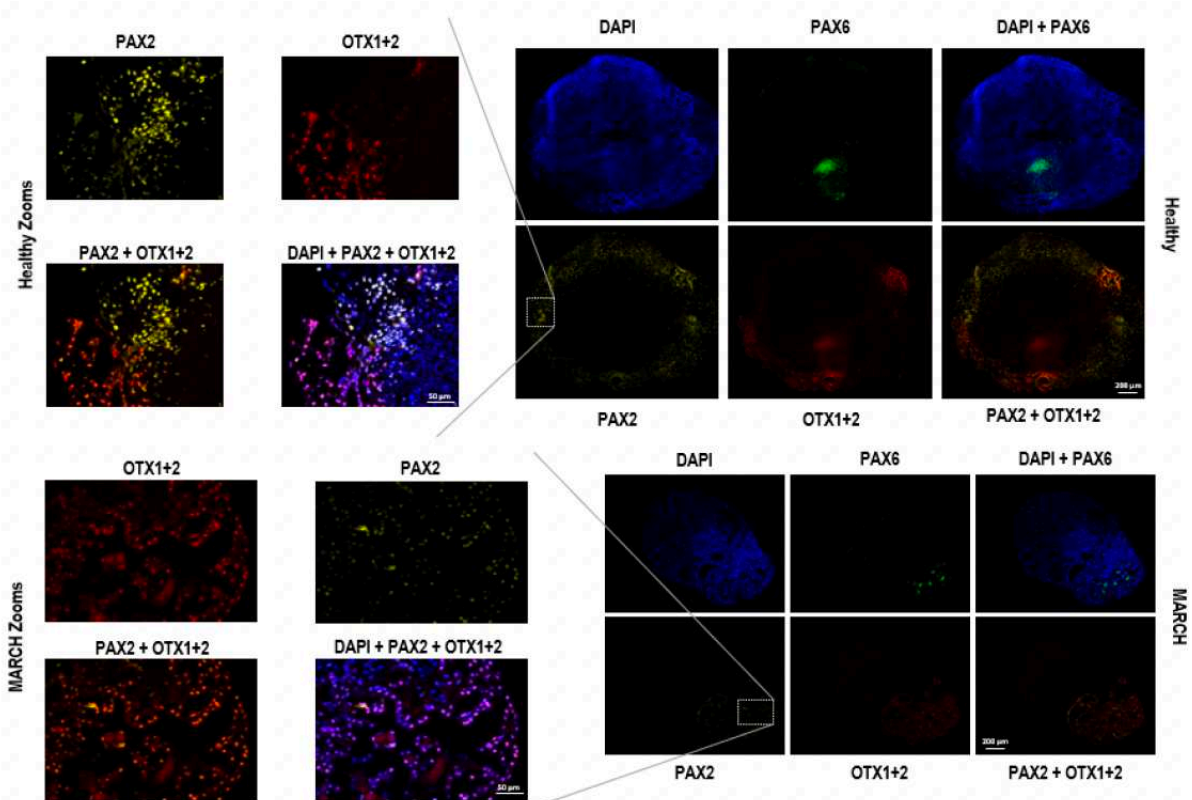


Figure 36 : Représentation illustrative de coupes histologiques d'organoïdes cérébraux marquées par immunofluorescence OTX1+2, PAX2 et PAX6

Un organoïde sain et un organoïde MARCH de 3 mois ont été marqués et une mise à l'échelle pour garder la différence de taille observée entre les deux organoïdes a été faite. Les deux organoïdes ont été marqués par les anticorps PAX6 en vert, OTX1+2 en rouge, PAX2 en jaune avec une contre-coloration des noyaux au DAPI en bleu. Les images ont été prises avec un microscope confocal automatique Zeiss au grossissement 40X. La barre d'échelle représente 200µm.

Afin d'obtenir une bonne vision d'ensemble des différents marquages, la **Figure 37** présente un résumé semi-quantitatif des différents marquages obtenus pour les premiers axes présentés que sont la progression de la différenciation cellulaire et la visualisation de la présence de différentes zones cérébrales au sein des organoïdes. Le nombre de coupes d'organoïdes cérébraux est différent entre les organoïdes contrôles et MARCH puisque leur taille est différente. Une coupe est comptabilisée positivement si elle exprime le marquage souhaité et négativement si elle ne l'exprime pas. Pour permettre une visualisation plus claire, le résultat obtenu a été transformé en pourcentage de marquage positif représenté par les zones colorées sur la **Figure 37** ou marquage négatif représenté par des zones blanches toujours sur cette même Figure. Tous les marqueurs mentionnés ci-dessus sont exprimés à plus de 50 pourcents dans tous les organoïdes sains avec des marqueurs neuronaux et astrocytaire/glie radiaire qui tendent vers 100%

d'expression. Ces résultats contrastent avec ceux obtenus avec les organoïdes MARCH. En effet, la plupart des pourcentages de marquages sont égaux ou inférieurs à 50% de positivité. Seuls deux marquages de régionalisation cérébrale : N-cad OTX1+2 atteignent plus de 85% de positivité. Pour tous les marquages de cellulaires, que ce soit pour les cellules progénitrices ou les neurones, astrocytes ou glie radiaire, tous les pourcentages sont diminués de moitié par rapport aux organoïdes sains.

Ces premiers résultats semblent concluants et vont dans le sens du syndrome MARCH. Une importante diminution du pourcentage positif de la présence de cellules différenciées ainsi que de cellules progénitrices est constatée dans les organoïdes pathologiques par rapport aux organoïdes sains. De plus, les organoïdes MARCH sont significativement moins bien régionalisés que les organoïdes contrôles.

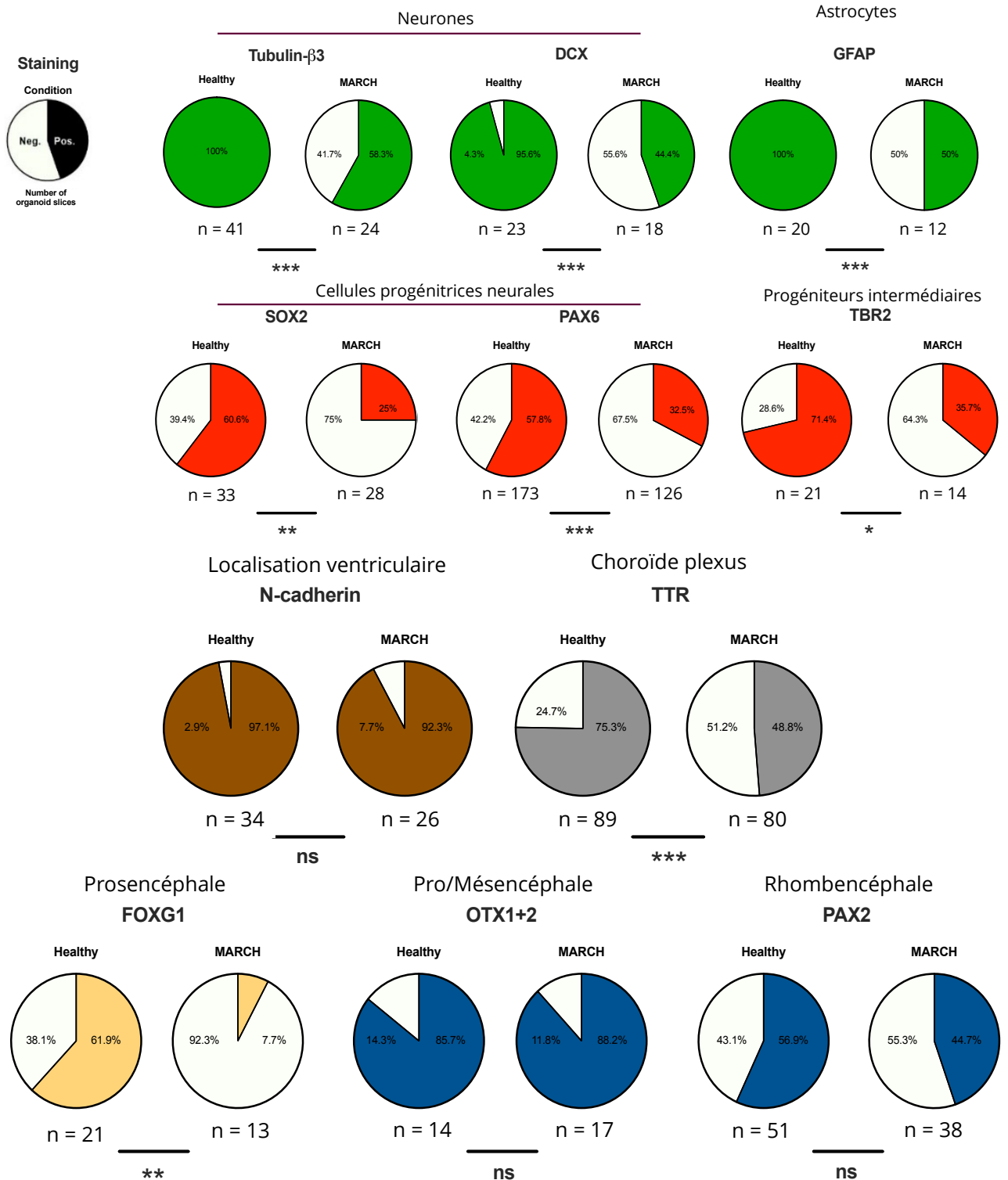


Figure 37 : Résumé des marquages d'immunofluorescence réalisé sur des coupes histologiques d'organoïdes sains et MARCH

Les diagrammes en secteurs sont séparés en deux parties. La partie colorée correspond au pourcentage du nombre de coupes sur lesquelles un marquage positif a été observé. A l'inverse, la partie blanche sur les diagrammes correspond au pourcentage du

nombre de coupes sur lesquelles aucun marquage n'a été trouvé. La taille des échantillons est indiquée respectivement par n sous chaque diagramme. Les résultats du test Chi-deux compare la fréquence entre les conditions. Pour attester de la significativité des différences observés une barre est présente sous chaque graphique avec : ns : non-significatif | * : p-value<0.05 | ** : p-value<0.01 | *** : p-value<0.001.

Une fois la composition globale des organoïdes cérébraux identifiée, il y un intérêt particulier à étudier la présence de la protéine CEP55 ainsi que deux autres protéines impliquées dans la cytocinèse, MKLP1 et Aurora kinase B, qui sont impliquées dans la stabilisation du fuseau mitotique. Une troisième protéine, ARL13b, est présente dans le cil primaire, organite présent quand les cellules sont en quiescence et qui sert de senseur du milieu extérieur pour adapter le comportement cellulaire. ARL13b est connue pour pouvoir interagir avec CEP55, son expression est donc analysée. Les marqueurs de la cytocinèse sont étudiés au regard des marquages positifs PAX6, pour les cellules progénitrices, et N-cad, pour les cellules issues du plexus choroïde. L'étude de la taille des cils primaires est réalisée dans deux types de cellules spécifiques. Une première étude s'intéresse aux cils primaires dans les cellules marquées PAX6 positives, car les cellules progénitrices se divisent beaucoup et sont à l'origine de la génération des neurones. Il est important de s'intéresser à ces cellules pour essayer de comprendre si la cause le problème de développement cérébral implique les cellules progénitrices. Les graphiques, présentés sur la **Figure 38**, ne montrent pas de différence significative entre les organoïdes sains et les organoïdes MARCH.

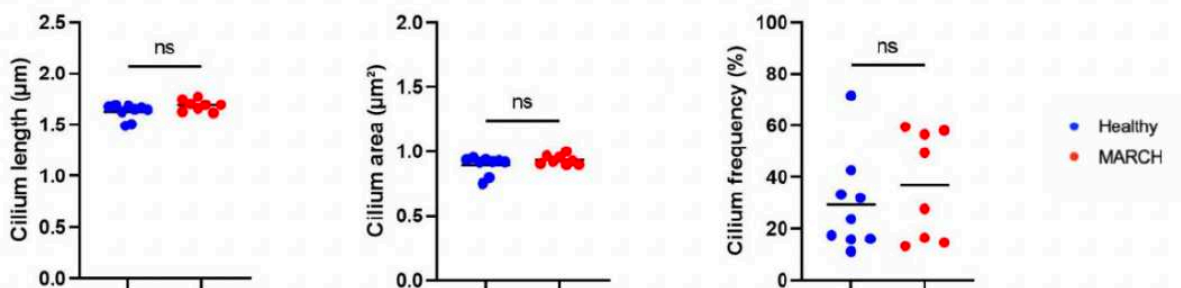


Figure 38 : Représentation graphique de la taille, la surface ou la fréquence d'apparition de cils primaires sur des cellules PAX6 positives.

Chaque point pour la longueur et la surface d'un cil primaire est compilé à partir de la moyenne d'au moins 10 cils primaires, provenant de 10 images représentatives de tranches d'organoïdes sains et d'organoïdes MARCH. Pour chaque paramètre, la distribution a été comparée via le test de Wilcoxon-Mann-Whitney, dont les résultats sont présentés dans une barre au-dessus. ns : non significatif.

L'étude de la taille des cils primaires dans les cellules marquées N-cadhérine positives a été faite dans le plexus choroïde, car il est impliqué dans le maintien du volume des ventricules ainsi que dans la sécrétion du liquide céphalorachidien (LCR). Les graphiques présentés sur la **Figure 39** montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les organoïdes sains et MARCH pour la fréquence d'apparition des cils primaires. Cependant, la différence de taille et de surface des cils primaires entre les organoïdes sains et les organoïdes MARCH est significative dans les cellules N-Cad positives. La mutation présente dans le gène CEP55 aurait donc un plus grand impact dans les cellules issues du plexus choroïde que sur des cellules neuronales.

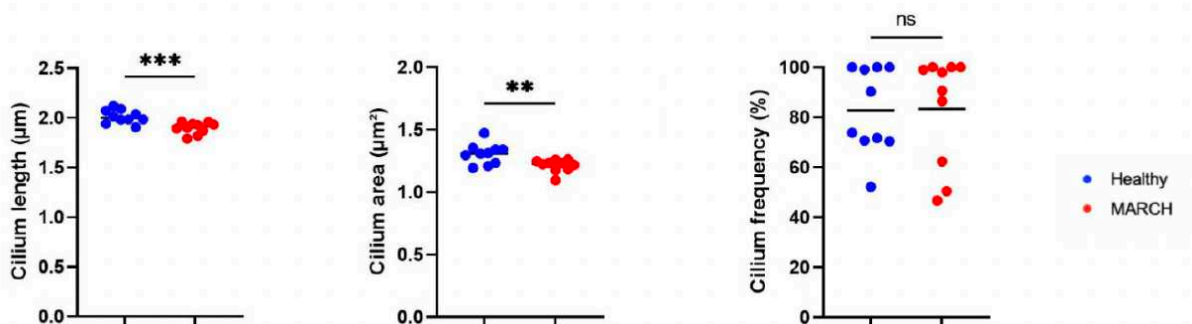


Figure 39 : Représentation graphique de la taille, la surface ou la fréquence d'apparition de cils primaires sur des cellules N-cadhérine positives.

Chaque point pour la longueur et la surface d'un cil primaire est compilé à partir de la moyenne d'au moins 20 cils primaires, provenant de 10 images représentatives de tranches d'organoïdes sains et d'organoïdes MARCH. Pour chaque paramètre, la distribution a été comparée via le test de Wilcoxon-Mann-Whitney, dont les résultats sont présentés dans une barre au-dessus. ns : non significatif | **: p-value < 0.01 | ***: p-value < 0.001.

Au regard des résultats obtenus, les mécanismes décisifs à cette différence de taille, de morphologie et de composition de l'organoïdes se mettraient en place entre la première et la troisième semaine de culture des organoïdes. Pour la génération des futures productions d'organoïdes, il a été décidé de les maintenir 3 à 4 semaines maximum en culture.

1.2.2.2. Résultats des productions d'organoïdes cérébraux MARCH corrigés

Au vu des résultats présentés, les productions suivantes d'organoïdes cérébraux ont été générées sur des temps de culture plus courts, 3 à 4 semaines, car ce temps est suffisant pour observer les différences entre les organoïdes sains

et pathologiques et ainsi pouvoir étudier les mécanismes physiopathologiques. Deux productions d'organoïdes ont été réalisées avec les trois clones de la lignée contrôle, les trois clones de la lignée pathologique et les trois clones lignées corrigées à l'aide de CRISPR et qui seront appelés KI MARCH dans la suite du manuscrit. En plus de ces 9 lignées, une dixième lignée correspondant au contrôle de transfection des clones CRISPR, non corrigée et appelée Mock, est également utilisé. Le plan de manipulation de ces nouvelles productions est présenté dans la **Figure 40**.

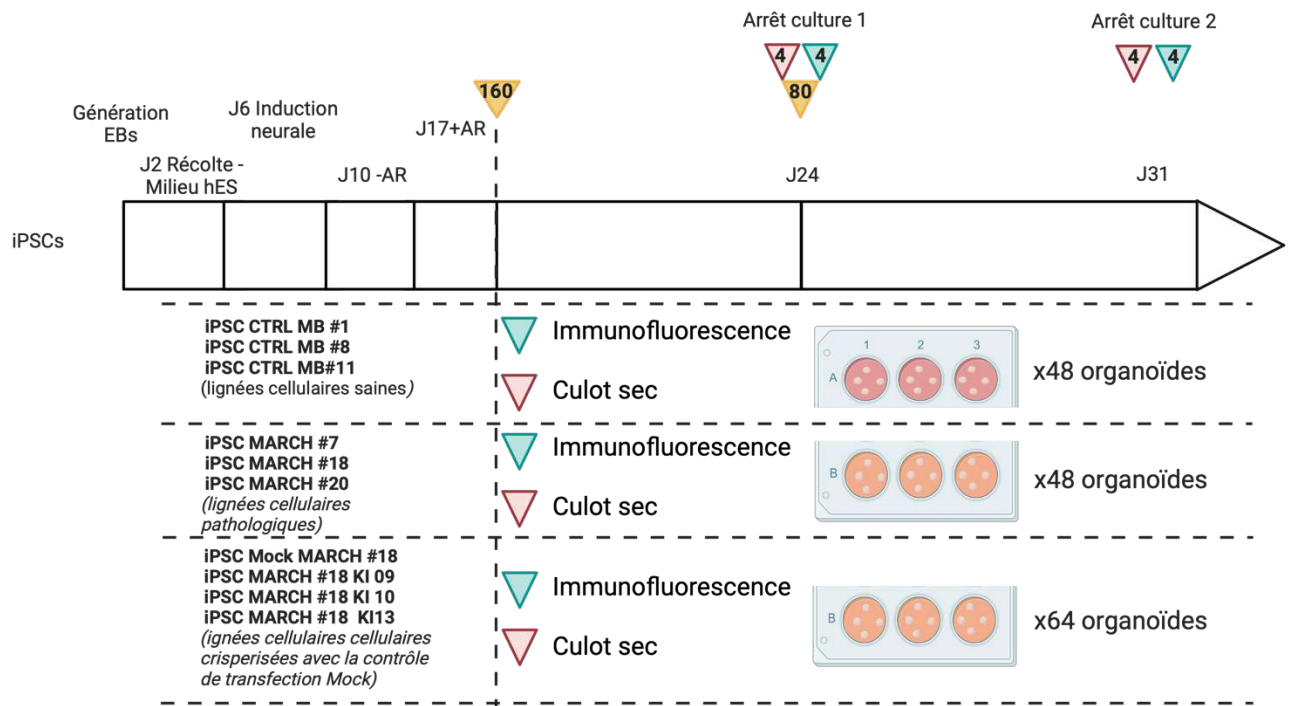


Figure 40 : Plan d'expérience des productions d'organoïdes cérébraux avec les clones révertés

Un suivi de croissance a été réalisé au cours de la culture des organoïdes pour suivre leur développement. Les résultats sont présentés sur la **Figure 41**. Ces suivis de croissance ont confirmé les premiers résultats observés sur la production d'organoïdes cérébraux de trois mois. Les graphiques A et B représentent les deux suivis de croissance de deux productions distinctes. Le troisième graphique C rassemble les informations présentes sur les graphiques A et B. Un test statistique a été réalisé afin de montrer que les différences de tailles entre les différents clones des lignées sont significatives entre les phénotypes sains, lignées saines et KI MARCH, et les phénotypes pathologiques, lignées MARCH et MARCH Mock.

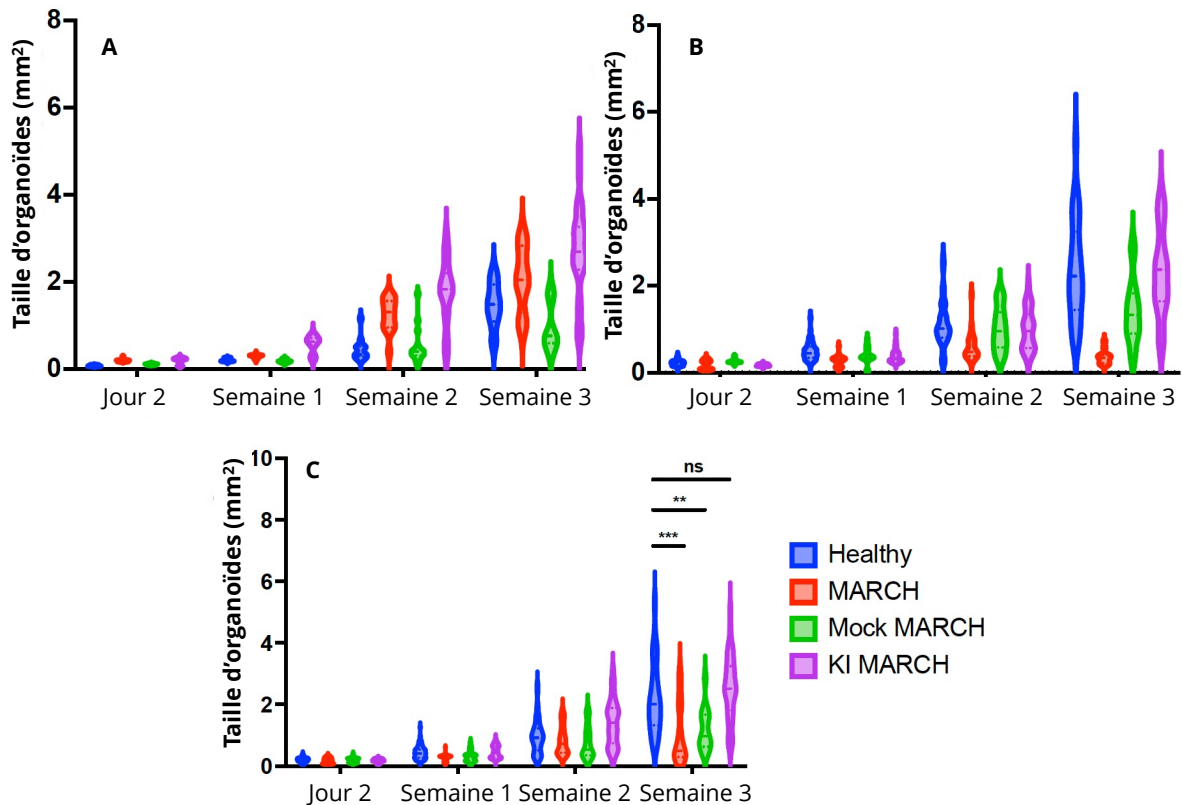


Figure 41 : Suivi de croissance des deux productions avec les clones révertés
 Le graphique A représente le suivi de croissance de la première production d'organoïdes et le graphique B est le suivi de croissance de la deuxième production. Le graphique C représente la compilation des suivis des deux premières productions. Il y a une différence significative de taille entre les organoïdes sains et les organoïdes MARCH et MARCH Mock. Cependant, aucune différence notable n'est observée entre les organoïdes sains et KI MARCH. ns : non-significatif | **: p-value < 0.01 | ***: p-value < 0.001.

La **Figure 42** présente les résultats des colorations histologiques réalisées sur les organoïdes CTRL MB, MARCH et KI MARCH âgés de 2 semaines. Dans le panel (A), les organoïdes sont imagés dans leur intégralité. La délimitation de l'enrobage Matrigel est délimité par une ligne noire et celle de l'organoïde par une ligne blanche. Les résultats montrent que les organoïdes CTRL MB et KI MARCH ont colonisé presque l'intégralité du Matrigel contrairement aux organoïdes MARCH. De plus, la taille des organoïdes MARCH est considérablement plus petite que celle des organoïdes des deux autres lignées. Le panel (B) de la **Figure 42** montre des rosettes neurales, structures contenant des cellules progénitrices. Les lignées CTRL MB et KI MARCH ont des rosettes dont l'épaisseur a une taille similaire, alors que celle des organoïdes MARCH est fortement réduite. Ces résultats confirment que les organoïdes MARCH ont des problèmes de neurodéveloppement par rapport aux organoïdes CTRL MB. De plus, les organoïdes générés avec la lignée

MARCH révertée, KI MARCH, montre le retour d'un développement normal des organoïdes.

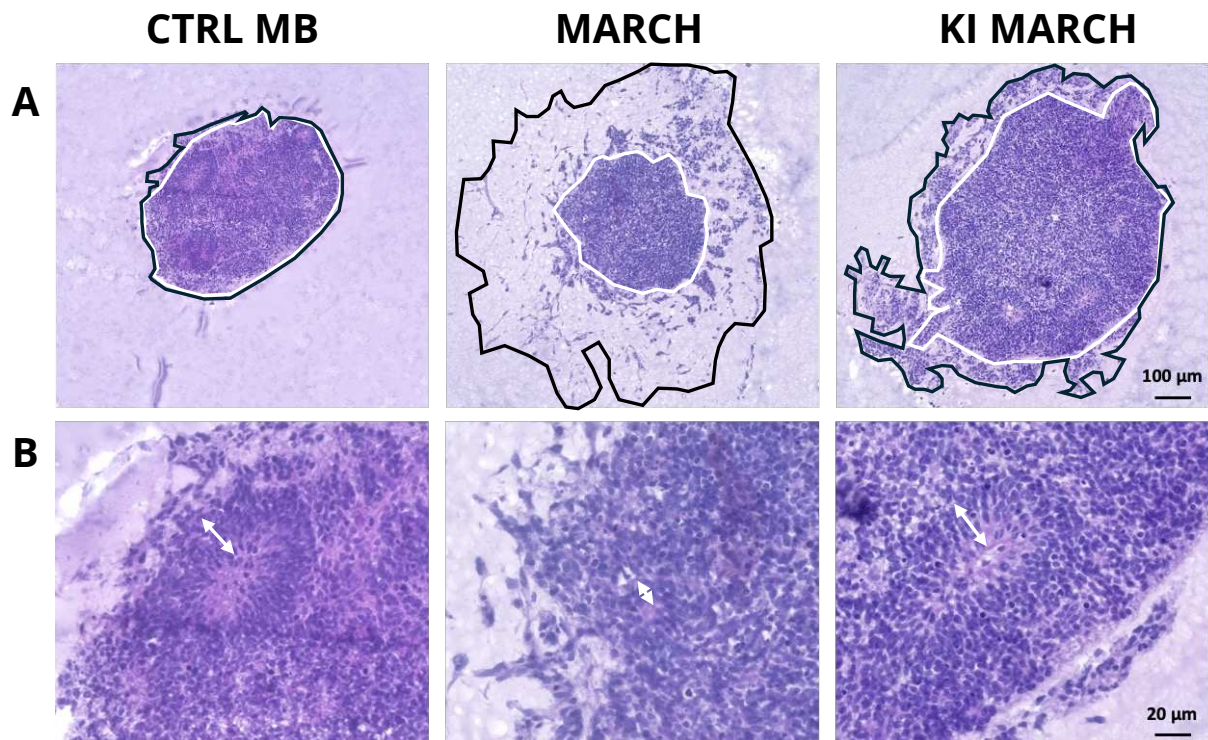


Figure 42 : Images représentatives d'un marquage hématoxyline et éosine sur des organoïdes cérébraux générés à partir des trois lignées CTRL MB, MARCH et KI MARCH

Des organoïdes âgés de deux semaines ont été marqués par un traitement hématoxyline/éosine et imagés à 5X et 40X avec un microscope confocal Axio Scan Z1 ZEISS. Sur le panel (A), la ligne noire délimite la présence du Matrigel et la ligne blanche délimite le pourtour de l'organoïde. Sur le panel (B), une double flèche blanche est placée au niveau d'une rosette. La barre d'échelle correspond à 100µm pour le panel (A) et 20µm pour le panel (B).

Les premiers résultats obtenus confirment les effets délétères de la mutation au sein de la protéine CEP55 sur la neurogenèse. D'autres analyses sur les productions qui ont été générées avec les trois lignées CTRL MB, MARCH et KI MARCH sont en cours. Un intérêt particulier sera porté aux marquages d'immunofluorescence.

1.3. Caractérisation des effets physiopathologiques du syndrome MARCH sur un autre type tissulaire : cardiomyocytes

Le syndrome MARCH affecte principalement le neuroectoderme. En effet, les autres feuilletts embryonnaires sont beaucoup moins affectés voire pas du tout.

Pour montrer que les problèmes de neurodéveloppement observés ne se retrouvent pas au cours du développement d'autres tissus, il a été décidé de mettre au point un protocole de différenciation des iPSCs en cardiomyocytes comme présenté dans la partie **1.2.1.5**.

Les trois lignées, saine, MARCH et KI MARCH, ont été différenciées en cardiomyocytes. Pour toutes ces lignées, les cellules musculaires cardiaques obtenues sont fonctionnelles puisque des contractions cellulaires spontanées sont observables à partir d'une dizaine de jours en culture. La différenciation en cardiomyocytes des lignées MARCH #7, MARCH #18 Mock et MARCH #18 KI 10 sont en cours.

Après 14 jours de différenciation, des enregistrements du nombre de contractions des cellules par minute ont été réalisés. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 9**. Nous avons noté une grande différence de fréquence de battement entre lignées, sans que celle-ci soit corrélée avec la présence ou l'absence de mutation. Cette grande hétérogénéité peut en grande partie s'expliquer par le fait que les cardiomyocytes ne sont pas gardés à 37°C, ni en conditions de CO₂ 5% pendant la mesure. La baisse de température graduelle induit une baisse du nombre de contractions spontanées. De plus, l'expérience de différenciation en cardiomyocytes n'ayant été réalisée qu'une seule fois, il serait donc nécessaire de reproduire l'expérience pour obtenir des résultats plus représentatifs.

Nom de la lignée	Nombre de battements par minute
CTRL MB #1	14
CTRL MB #8	42
CTRL MB #11	23
MARCH #18	43
MARCH #20	13
MARCH #18 KI 09	14
MARCH #18 KI 13	12

Tableau 9 : Tableau recensant le nombre de contractions de cardiomyocytes

Fréquence de contraction des cardiomyocytes en fonction des lignées prises après 12 jours de différenciation.

La **Figure 43** est illustrative de l'obtention des cardiomyocytes obtenus par la mise en place du protocole de différenciation. Au moins un clone par lignée saine, MARCH et MARCH KI a été différencié et les contractions spontanées des cellules cardiaques enregistrées pendant 30 secondes. Sur chaque image du panel B, des flèches ont été mises pour aider à la visualisation de la zone qui est contractée.

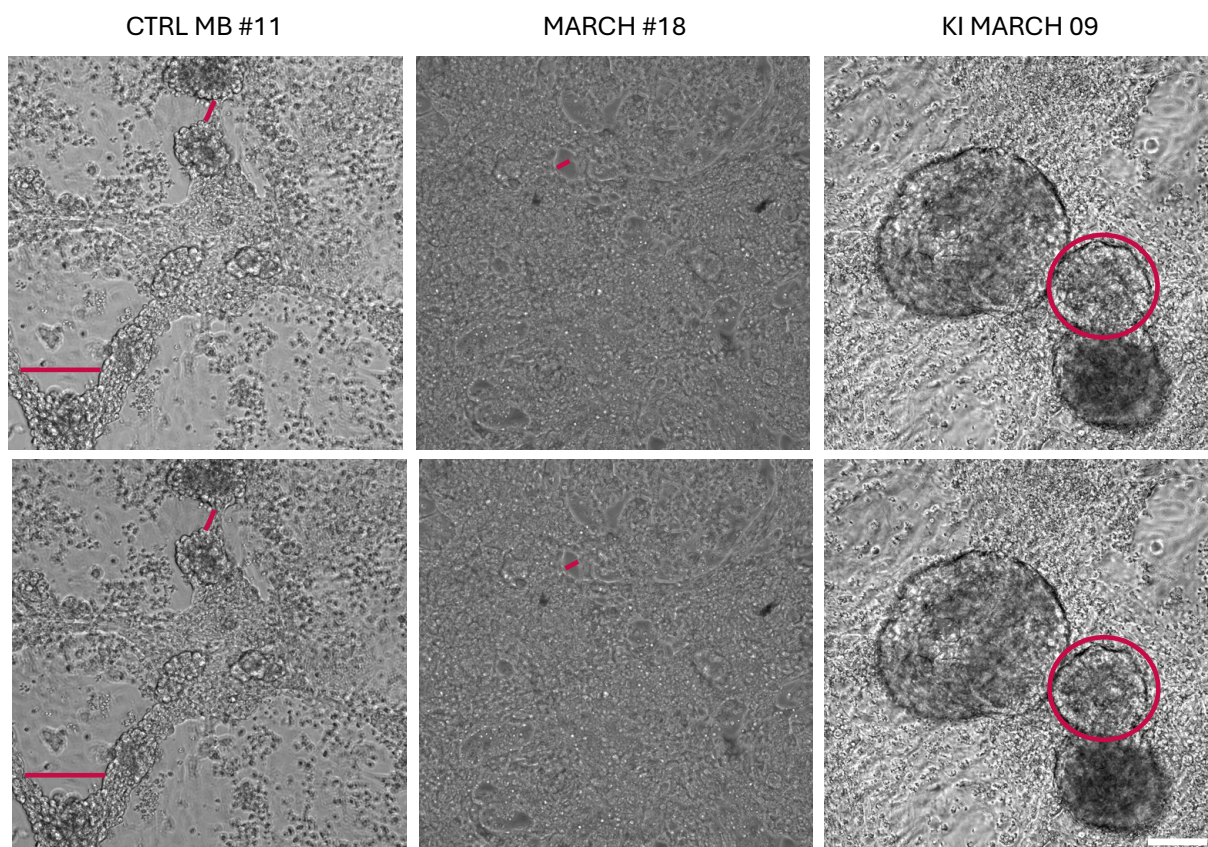


Figure 43 : Illustration représentative de cardiomyocytes des trois lignées, saine, MARCH et MARCH KI

Deux images extraites des 30 secondes de vidéo sont montrées. Les sites contractiles sont annotés en rouge. Les formes relâchées sur le panel du haut et les formes contractées sur le panel du bas.

1.4. Conclusion générale

Les organoïdes cérébraux, générés à partir de hiPSCs ont permis de modéliser l'une des caractéristiques principales du syndrome MARCH : la microcéphalie plutôt que l'hydranencéphalie. Le suivi de croissance réalisé pour suivre le développement des organoïdes cérébraux a ainsi montré, contrairement aux modèles animaux générés, une microcéphalie importante. Le remplacement du tissu par du liquide (hydranencéphalie) n'a pu être observé puisque les organoïdes sont cultivés en milieu liquide. L'organoïde modélise plus fidèlement les problèmes de neurodéveloppement qui représentent une des principales caractéristiques physiopathologiques du syndrome MARCH. De plus, les organoïdes générés à partir des clones corrigés ont montré un retour à la normal du développement des organoïdes cérébraux. L'analyse de la composition des organoïdes cérébraux ainsi que de leur régionalisation a également confirmé que le syndrome MARCH est à l'origine d'une perte de neurones et d'astrocytes importante ainsi qu'une très mauvaise régionalisation. Enfin, les équipes

partenaires étudient actuellement les mécanismes physiopathologiques de la maladie. Le modèle organoïde cérébral est donc un modèle adapté pour modéliser des pathologies neurodéveloppementales.

2. Modélisation d'une pathologie neurodégénérative : la maladie d'Alzheimer

Cette deuxième partie se consacre à la modélisation de la maladie d'Alzheimer. C'est une pathologie qui se développe plutôt sur la fin de vie d'un individu. Les organoïdes cérébraux ayant principalement des caractéristiques fœtales, il est important de se préoccuper de l'évolution de la maturation de l'organoïde cérébral. Une première partie est consacrée au développement et la mise en place de méthodes et d'outils afin d'étudier les caractéristiques fonctionnelles des organoïdes cérébraux. En effet, le degré de maturation d'un organoïde cérébral peut être évalué en fonction de sa capacité à générer des flux calciques ou électrophysiologiques entre les différentes cellules.

Toujours dans une optique d'influer sur une potentielle maturation des organoïdes cérébraux, il a été décidé d'adapter un protocole d'organoïdes corticaux. Le développement de ce protocole a également pour objectif de réduire l'hétérogénéité qui peut être observée entre les organoïdes d'une même lignée, que ce soit au sein d'une ou de différentes productions. L'adaptation et la caractérisation du modèle sera donc le deuxième axe développé dans cette partie.

Enfin, le dernier axe de cette partie est l'étude de la maladie d'Alzheimer grâce aux organoïdes corticaux. Des lignées porteuses de mutations responsables du développement de la maladie d'Alzheimer ont été utilisées afin de générer les organoïdes corticaux. Au sein du laboratoire, une première étude menée par S. Pavoni avait montré que le traitement des organoïdes par l'Aftin-5 augmentait la sécrétion des fragments $A\beta_{42}$. Pour essayer de potentialiser les effets observables sur les organoïdes générés à partir des lignées mutées, différents traitements Aftin-5 ont été réalisés.

2.1. Lignées cellulaires contrôle et mutées Alzheimer

Le laboratoire a fait l'acquisition d'une lignée iPSCs, AD4F17, provenant de la banque nationale de lignée cellulaire d'Espagne (BNLC). Ces iPSCs sont issues de fibroblastes commercialisés (Coriell Institute, catalog ID : AG07645) et ont été reprogrammées par rétrovirus comme présenté dans le **Tableau 10**. Ces cellules ont été acquises sans lignée contrôle isogénique, ce qui peut poser des problèmes dans la conception d'expériences ainsi que dans l'analyse de résultats obtenus. Le génotype des deux lignées comparées étant différent, cela peut amener un biais, les différences observées ne pourront pas être imputées exclusivement au fait

qu'une mutation induisant la maladie d'Alzheimer est présente sur l'une et pas sur l'autre. De plus, la méthode de reprogrammation utilisée est une méthode de reprogrammation intégrative où les transgènes sont éteints la plupart du temps par les cellules. Il s'avère que le transgène Sox2 n'est pas complètement éteint dans les iPSCs. Le fait qu'il y ait toujours une expression exogène de du facteur Sox2 doit favoriser l'obtention de précurseurs neuraux. Cependant, son expression pendant la différenciation des iPSCs en neurones ou organoïdes peut être problématique. La capacité de différenciation de ces cellules peut également être affectée tout comme les phénotypes observés, car les rétrovirus peuvent avoir tendance à s'intégrer à proximité d'oncogènes et ainsi activer leur expression.

Afin d'essayer de réduire au maximum les biais génotypiques ainsi que la non-extinction d'un des facteurs de reprogrammation, le laboratoire a fait l'acquisition de quatre nouvelles lignées iPSCs. La première lignée est une lignée contrôle, appelé WT-7889SA, reprogrammée à l'aide du Cytotune-iPS Sendai Reprogramming Kit (Life Technologies) à partir de fibroblastes de peau humaine prélevés sur un individu masculin de 18 ans (Coriell Institute, catalog ID: AG07889) (Sproul et al., 2014; Kwart et al., 2017, 2019)). A partir de cette lignée iPSCs contrôle ont été générés 16 lignées isogéniques d'iPSCs comportant des mutations induisant la maladie d'Alzheimer¹⁹ (Paquet et al., 2016; Kwart et al., 2017, 2019). Parmi ces 16 lignées, trois ont été sélectionnées et acquises. Les informations sur ces lignées sont disponibles dans le **Tableau 10**.

La lignée contrôle ainsi que ces trois lignées sont les lignées cellulaires principalement utilisées dans cette deuxième partie.

¹⁹https://nyscf.org/wp-content/uploads/2021/05/Alzheimers-Isogenic-iPSC-Panel-RockefellerTessier-Lavigne_May2021.pdf, consulté le 10 octobre 2024.

Nom lignée	Gène muté	Mutation	Reprogrammation	Banque et identifiant	Information sur les lignées
WT7889SA			Sendai	NYSCF - CO0002-01-SV-003	https://nyscf.org/wp-content/uploads/2021/05/Alzhaimers-Isogenic-iPSC-Panel-RockefellerTessier-Lavigne_May2021.pdf
PSEN1 Ki	PSEN1 Isoforme 1	M146V – Exon5	Sendai	NYSCF - CO0002-01-CS-001	https://www.alzforum.org/mutations/psen1-m146v
APP Ki	APP Isoforme APP770 [Swedish]	KM670/671NL – Exon 16	Sendai	NYSCF - CO0002-01-CS-004 / BN0013	https://www.alzforum.org/mutations/app-km670671n-swedish
APP/PSEN1 Ki	APP Isoforme APP770 - PSEN1 Isoforme 1	KM670/671NL et M146V	Sendai	NYSCF - BN0002	https://www.alzforum.org/mutations/psen1-m146v https://www.alzforum.org/mutations/app-km670671n-swedish
AD4F17	PSEN1 Isoforme 1	A246E – Exon7	Rétrovirus	BNLC - FiPSAG0764 5-4F-17	https://www.alzforum.org/mutations/psen1-a246e

Tableau 10 : Tableau récapitulatif des mutations des lignées Alzheimer
NYSCF : New York Stem Cell Foundation; BNLC : Banco Nacional de Líneas Celulares.

Dès la réception des lignées cellulaires, les cellules ont été amplifiées pour générer une banque de cellules mères. Des culots de cellules ont également été congelés. La **Figure 44** confirme bien la présence des mutations souhaitées dans chaque lignée.

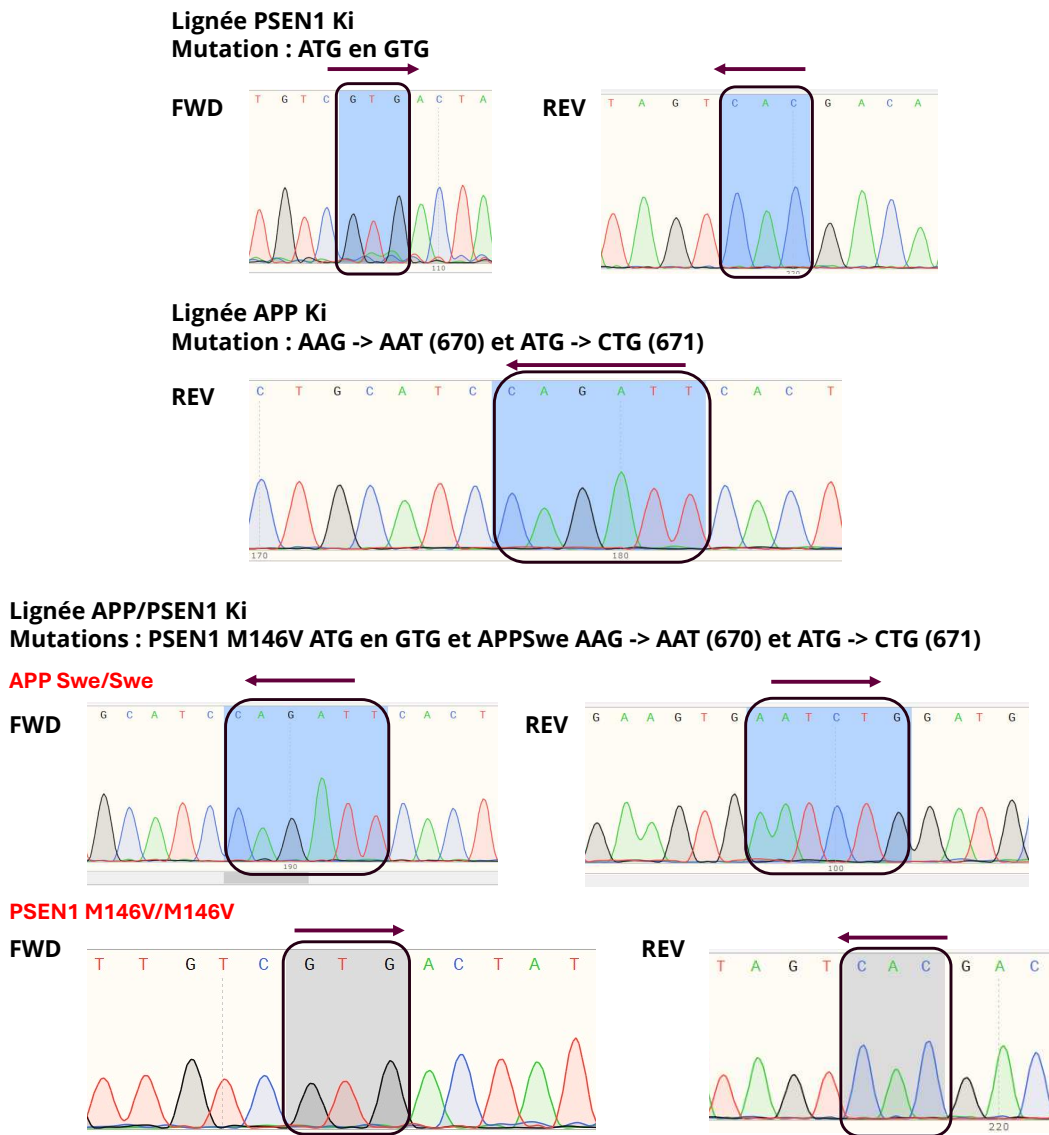


Figure 44 : Vérification par séquençage de la présence des mutations Alzheimer

Les séquençages ont été effectués en forward (FWD) et en reverse (REV). Les paires de bases surlignées entourées d'un cadre sont les codons qui sont mutés dans les lignées Alzheimer. Une flèche a été placée au-dessus de chaque cadre pour indiquer le sens de lecture. Swe : mutation Swedish

2.2. Développement de méthode et d'outils pour la caractérisation fonctionnelle des organoïdes cérébraux

Le développement de méthodes et d'outils de caractérisation fonctionnelle, au travers d'enregistrements de flux calciques et électrophysiologiques, est nécessaire pour s'assurer de la pertinence du modèle développé. Ces différents flux, qui apparaissent au cours de la culture, vont permettre de donner des

informations sur l'état de maturité de l'organoïde. En effet, le fait qu'un organoïde se mette à émettre des potentiels d'action et à générer des flux calciques de manière spontanée et régulière dans le temps atteste de la maturité des neurones et donc de l'organoïde. De ce fait, il y a une volonté de développer deux principaux outils :

- Des outils permettant de mesurer le flux calcique
- Des outils permettant la mesure de l'activité électrique

2.2.1. Etablissement d'un modèle de neurones en 2 dimensions

Pour permettre une mise au point facilitée des différents protocoles de visualisation du flux calcique au sein d'un réseau neuronal ou la mesure de l'activité électrique, il a été décidé de mettre au point un protocole de différenciation des iPSCs en neurones 2 dimensions (2D). Ce type de modèle simplifié a déjà fait ses preuves pour ce type d'utilisation (Y. Zhang et al., 2023; Lemieux et al., 2024). L'avantage de la 2D est également le développement d'un modèle plus simple que les organoïdes cérébraux car il mature et devient fonctionnel plus rapidement (Lemieux et al., 2024).

2.2.1.1. Génération de neurones 2D à partir d'iPSCs et de cellules progénitrices neurales

Un protocole classique de différenciation de neurones en 2D a été développé au sein du laboratoire. Le protocole se divise en deux étapes :

- Une première étape de différenciation des iPSCs en cellules progénitrices neurales (NPCs). Lors de cette étape, il est possible d'amplifier pour générer une banque de cellules qui puissent être réutilisées pour de futures différenciations.
- Une deuxième étape consiste à différencier les NPCs en neurones.

2.2.1.1.1. Matériel et méthode

2.2.1.1.1.1. Génération des NPCs à partir d'iPSCs

Pour se faire, les cellules sont passées en collagénase IV à une concentration de 1mg/mL (GIBCO, 17104019). Les cellules sont incubées pendant au moins 30min à 37°C dans une atmosphère humide avec 5% CO₂. Les cellules sont ainsi décollées du support en colonies qui sont mises en culture dans des boîtes B35 à très faible adhérence sous agitation 80rpm à 37°C avec atmosphère humide et 5% CO₂. Le milieu est changé dans tous les deux jours. Après 6 jours de culture, des boîtes B35 de culture sont coatées avec de la poly-L-ornithine (SIGMA ALDRICH,

P3655-50MG) à une concentration de 100µg/mL et incubées 3 heures à 37°C. Les boîtes sont ensuite rincées avant d'être coatées une nouvelle fois avec de la laminine (ThermoFisher Scientific, L2020) à une concentration de 10µg/µL avant d'être réincubées au moins 1 heure à 37°C. Les sphères de cellules sont récoltées et mises à adhérer sur les boîtes coatées poly-L-ornithine/laminine dans un milieu NPCs composé de 5mL de Neurobasal Medium (GIBCO, 21103-049), 50µL de Pen/Strep (GIBCO, 15140-122), 50µL de Glutamine (GIBCO, 25030-081), 100µL de B27 sans vitamine A (GIBCO, 12587-010), 1µL d'EGF à 100ng/mL (Invitrogen, PHG0311) et 2µL bFGF à 100µg/mL (GIBCO, 13256029). Le milieu NPCs est changé tous les deux jours jusqu'à l'obtention de rosettes, structure qui est constituée de NPCs, qui sont récoltées manuellement puis dissociées avec de l'Accutase (SIGMA-ALDRICH, A6964-100ML) pendant 4min. Les cellules sont ensuite réimplantées sur les boîtes B35 coatées poly-L-ornithine/lamine. Les NPCs sont ensuite passées, amplifiées et congelées.

2.2.1.1.1.2. Différenciation des NPCs en neurones

La deuxième étape consiste ensuite à différencier les NPCs en cellules neuronales. Des boîtes B35 sont coatées poly-L-ornithine/laminine (SIGMA ALDRICH, P3655-50MG ; ThermoFisher Scientific, L2020) à une concentration finale 100µg/mL et 20µg/mL respectivement. Les cellules sont dissociées avec de l'Accutase (SIGMA-ALDRICH, A6964-100ML) pendant 4min à 37°C. Les NPCs sontensemencées à une densité cellulaire de $5 \cdot 10^5$ cellules par B35 avec un milieu de différenciation neuronale composé de 5mL de Neurobasal Medium (GIBCO, 21103-049), 50µL de Pen/Strep (GIBCO, 15140-122), 50µL de MEM-NEAA (GIBCO, 12084947), 100µL de B27 sans vitamine A (GIBCO, 12587-010), 0.5µL de GDNF (StemCell, 78058) à 10µg/mL, 5µL de BDNF (StemCell, 78005.1) à 10µg/mL et 500µL de Dibutyryl-cAMP (StemCell, #73882) à 1mg/mL.

2.2.1.1.1.3. Culture des NPCs

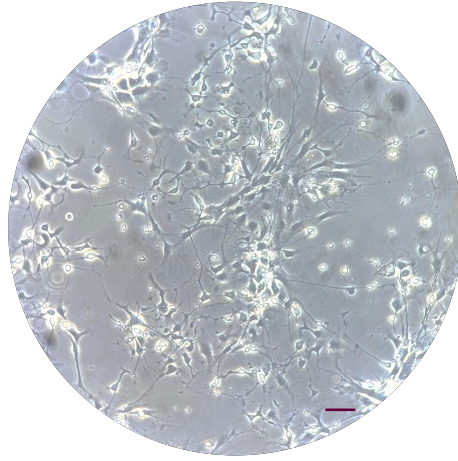
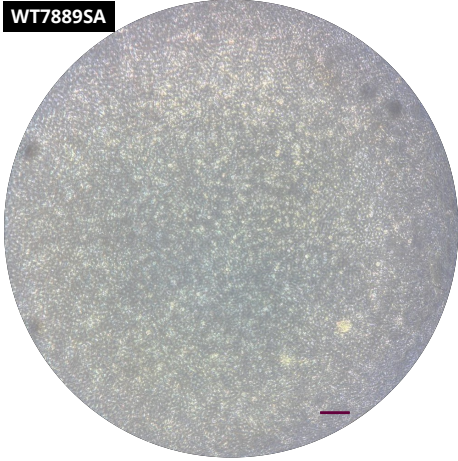
Des boîtes B35 sont coatées poly-L-ornithine/laminine (SIGMA ALDRICH, P3655-50MG ; ThermoFisher Scientific, L2020) à une concentration finale 100µg/mL et 10µg/mL respectivement. Les cellules sont dissociées avec de l'Accutase (SIGMA-ALDRICH, A6964-100ML) pendant 4min à 37°C. Les NPCs sont plantées à une densité cellulaire de $1,5 \cdot 10^6$ cellules par B35 avec un milieu de NPCs composé de 5mL de Neurobasal Medium (GIBCO, 21103-049), 50µL de Pen/Strep (GIBCO, 15140-122), 50µL de MEM-NEAA (GIBCO, 12084947), 100µL de B27 sans vitamine A (GIBCO, 12587-010), 1µL de EGF (Invitrogen, PHG0311) à 100µg/mL et 2µL de bFGF (GIBCO, 13256029) à 100µg/mL. Le milieu est changé tous les deux jours.

2.2.1.1.2. Résultats de la différenciation des iPSCs en neurones 2D

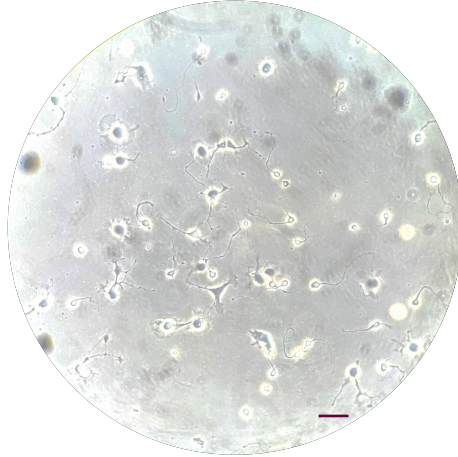
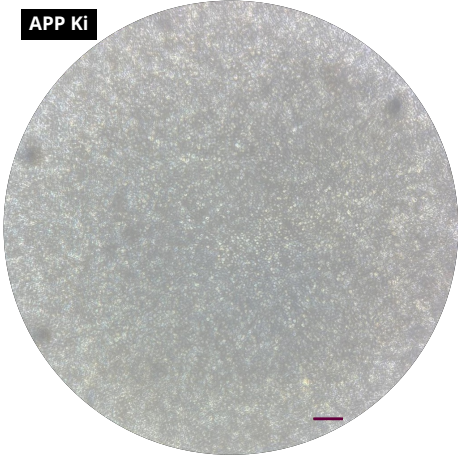
La lignée d'iPSCs contrôle ainsi les trois lignées d'iPSCs patients ont été différenciées selon le protocole présenté ci-dessus. Plusieurs productions de neurones en 2D ont été générées par lignée. Des images représentatives de chaque lignée sont présentées dans la **Figure 45**. Les différenciations des quatre lignées en NPCs sont à peu près équivalentes, même si en fonction des productions réalisées, il est plus facile d'obtenir des NPCs de certaines lignées que d'autres. Cependant, lors de la différenciation des NPCs en neurones, une très grande hétérogénéité a été observée. Toutes les lignées formaient des rosettes correctement et ont été prélevées manuellement. Ceci devait normalement favoriser une certaine homogénéité entre les différentes lignées puisqu' une certaine purification des précurseurs neuraux a été réalisée.

Malgré cela, les images illustratives montrent que lignées WT-7889SA et PSEN1 Ki ont tendance à générer des neurones avec des corps cellulaires assez brillants et des prolongements plus ou moins importants pour cette production. Quant aux lignées APP Ki et APP/PSEN1 Ki pour la production utilisée, les NPCs ont du mal à se différencier en neurones, une mort cellulaire importante est observée. De plus, pour la lignées APP Ki quelques neurones se sont différenciés mais ils semblent cohabiter avec d'autres types cellulaires. Pour la lignées APP/PSEN1 Ki, les cellules sont très larges et ne font pas beaucoup de prolongements.

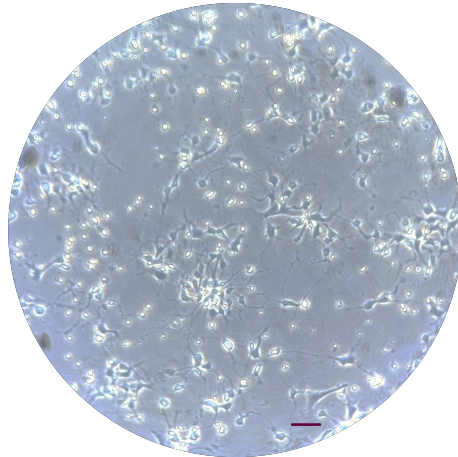
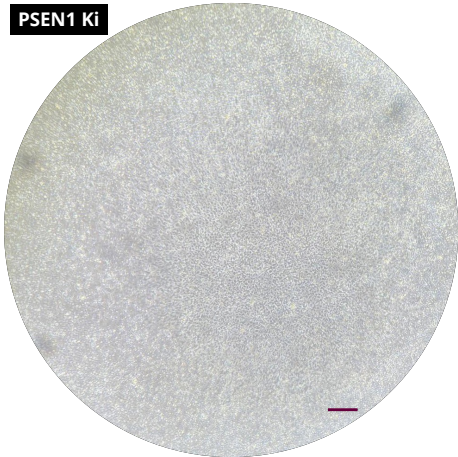
WT7889SA



APP Ki



PSEN1 Ki



APP/PSEN1 Ki

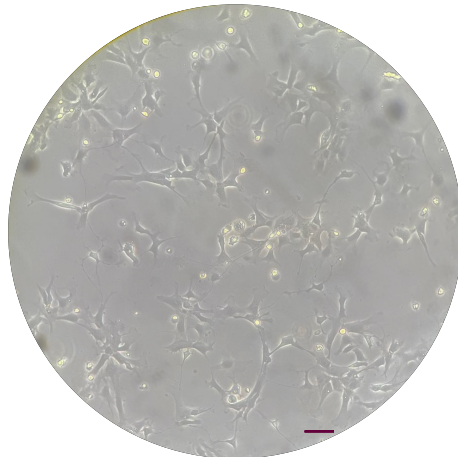
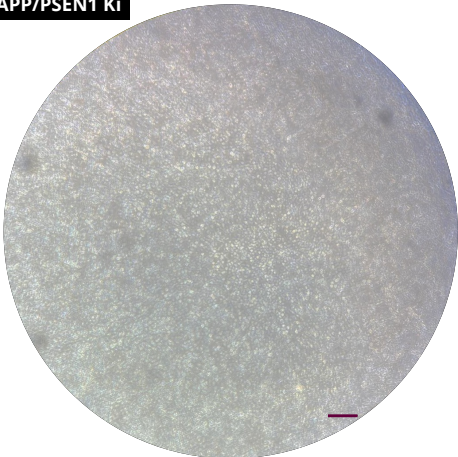


Figure 45 : Illustration représentative des différentes lignées iPSCs différenciées en NPCs puis en neurones

Des images illustratives des productions de NPCs, images de gauche, puis de leur différenciation en neurones à J+18, images de droite. Images réalisées en champ clair au microscope Leica DMI LED. La barre d'échelle représente 50µm.

Ce protocole a été compliqué à mettre en place sur les différentes lignées. De ce fait, une autre stratégie a été développée au sein du laboratoire pour permettre l'obtention des neurones plus rapidement et efficacement sur toutes les lignées souhaitées. Ce nouveau protocole se base sur l'utilisation de la protéine neurogénine 2 pour une conversion directe des iPSCs en neurones sans passer par le stade NPCs.

2.2.1.2. Développement d'un protocole de neurone en 2D à l'aide de la protéine neurogénine 2

Le développement et la mise en place du protocole de génération de neurones à partir d'iPSCs est divisé en 4 étapes principales : la génération des plasmides en quantité suffisante, la production des lentivirus, l'infection des iPSCs par lentivirus et l'induction de la différenciation des iPSCs en cellules neuronales.

Le système permettant de mettre en place la différenciation avec neurogénine 2 (Ngn2) est un système inductible, dont l'expression est régulée par la présence ou l'absence d'un composé spécifique, comme de la tétracycline. Ici, deux éléments sont nécessaires pour induire l'expression de la Ngn2 : l'expression du gène rtTA et l'ajout dans le milieu de culture de tétracycline. Si ces deux éléments sont présents dans le milieu, ils vont permettre l'expression de Ngn2 qui va induire la conversion des iPSCs en neurones.

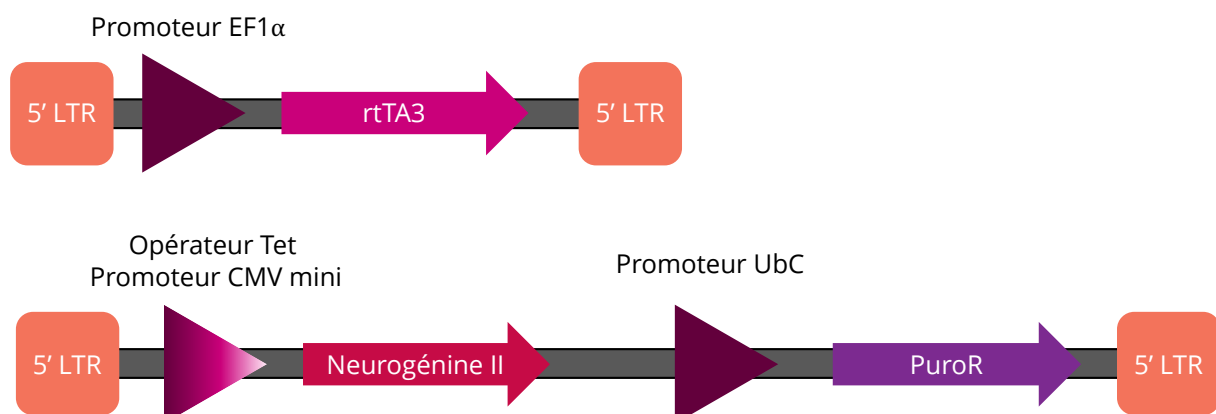


Figure 46 : Système neurogénine 2

2.2.1.2.1. Matériel et méthode

2.2.1.2.1.1. *Plasmides*

Les deux plasmides transgènes ainsi que les deux plasmides nécessaires pour construire le vecteur lentivirus ont été commandés sur Addgene : pLV_TRET_hNgn2_UBC_Puro (Addgene, 61474), pLV_hEF1a_rtTA3 (Addgene, 61472), pMD2.G-VSV-G-mut (Addgene, 196508) et psPAX2 (Addgene, 12260) dont les cartes plasmidiques sont disponibles en **Annexe 1**. Le plasmide pLKO.1-puro-CMV-TurboGFP (SIGMA-ALDRICH, SHC003) est un plasmide qui exprime la protéine fluorescence, gfp. Il est utilisé à la place des transgènes Ngn2 et rtTA3 pour générer des particules lentivirales fluorescentes qui seront utilisées comme contrôle positif de transfection. Sa carte plasmidique est disponible en **Annexe 2**.

2.2.1.2.1.2. *Préparation de plasmides*

Pour les MiniPrep, des minicultures bactériennes de 4mL sont purifiées en utilisant le kit NucleoSpin Plasmid (MACHEREY-NAGEL, 740588.250) selon les recommandations du fournisseur. 4 mL de culture sont dans un tube Eppendorf de 2mL (SARSTEDT, 72695500) et centrifugés 1min à 11,000g. Cette étape est réalisée deux fois. Le surnageant de culture est jeté et les culots sont re-suspendus dans 250µL de tampon A1, conservé à 4°C dès que la RNase a été ajoutée. 250µL de tampon A2 sont ajoutés et les bactéries sont incubées 4min à température ambiante avant d'ajouter 300µL de tampon A3. Les tubes sont agités vigoureusement avant d'être centrifugés 1min à 11,000g. Le surnageant bactérien est déposé sur la colonne puis elle est centrifugée 30 secondes à 11,000g. Le filtrat est jeté et 500µL de tampon AW sont ajoutés à la colonne puis centrifugé à nouveau 30 secondes à 11,000g. Le filtrat est jeté et 600µL de tampon A4 sont ajoutés à la colonne puis centrifugé 30 secondes à 11,000g. Le filtrat est jeté et la colonne est centrifugée 1 minute à 11,000g. Le tube collecteur est changé et 30µL d'H₂O sont ajoutés à la colonne qui est incubée 1 minute à température ambiante avant d'être centrifugée 1min à 11,000g.

Pour les MaxiPrep, des maxicultures bactériennes de 600mL sont purifiées en utilisant le kit NucleoBond Xtra Maxi (MACHEREY-NAGEL, 740414.50) selon les recommandations du fournisseur. Brièvement, les 600mL de culture sont versés dans un tube Eppendorf de 50mL (SARSTEDT, 62547254) et centrifugés 0 4°C pendant 10min à 11,000g. Le surnageant de culture est jeté et les culots sont re-suspendus dans 12mL de tampon RES, conservé à 4°C dès que la RNase a été ajoutée. 12mL de tampon LYS sont ajoutés et les bactéries sont incubées 4min à température ambiante avant d'ajouter 12mL de tampon NEU. Les tubes sont agités vigoureusement avant d'être centrifugés à 4°C pendant 10min à 11,000g. Le filtre est enlevé de la colonne et 25mL de tampon d'équilibration EQU sont ajoutés. Le surnageant bactérien est déposé sur la colonne. Après écoulement de celui-ci, un 2^{ème} rinçage est effectué avec 15mL de tampon WASH. Une fois le tampon

écoulé, le tube collecteur est changé et 15mL de tampon ELU sont ajoutés. Une fois l'éluât récupéré, 10,5mL d'isopropanol sont ajoutés à celui-ci, le mélange est secoué vigoureusement puis centrifugé à 4°C au moins pendant 30min à 4,500g. Le surnageant est jeté et le culot est re-suspendu dans 2mL d'éthanol 70%. Le tube est centrifugé à 4°C pendant 5min à 11,000g. Le surnageant est jeté et le culot est mis à sécher à l'air libre pendant au moins 30min. Le culot est ensuite re-suspendu dans 200 à 1000µL d'H₂O.

2.2.1.2.1.3. Production des vecteurs lentiviraux et infections

Trois vecteurs différents sont produits dans des cellules HEK293 T. Les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM high glucose avec pyruvate (Fisher Scientific, 10749864), 10% de sérum de veau fœtal (Fisher Scientific, 11573397), 1% de Pen/Strep (GIBCO, 15140-122), 1% de MEM-NEAA (GIBCO, 12084947). Les transfections sont réalisées dans des T75 (SARSTEDT, 83.3911.002) dans lesquels les cellules sontensemencées à 2×10^6 cellules/boîtes.

Le milieu est changé 3 heures avant la transfection. Le précipité en phosphate de calcium est réalisé en mélangeant deux solutions. La première contient du CaCl₂ (0.125 M), le plasmide psPAX2 (10.5 µg), le plasmide pMD2.G-VSV-G-mut (5.25µg) et le plasmide contenant le transgène pLV_TRET_hNgn2_UBC_Puro ou pLV_hEF1a_rtTA3 ou pLKO.1-puro-CMV-TurboGFP (21µg). La seconde est une solution HBS 2X (280mM NaCl, 100mM HEPES, 1,5mM NaHPO₄, NaOH). La première solution est ajoutée goutte à goutte à la solution HBS 2X que l'on fait buller. Le mélange est laissé 20 minutes à TA et 1mL de solution est ensuite ajouté par boîte de cellules. Le milieu est changé le lendemain afin de récupérer le maximum de pseudo particules virales infectieuses.

Deux jours après la transfection, le surnageant des cultures est récupéré et centrifugé 5min à 1,200g pour éliminer les débris cellulaires. Les surnageants sont ensuite centrifugés à 7°C pendant 4h à 18,000g (SIGMA, 3K30). Les culots sont re-suspendus dans 200µL de PBS1X. Les particules pseudo virales sont aliquotées dans des tubes Eppendorf et conservées à 4°C pour une utilisation dans les 7 jours ou à -20°C pour une conservation à plus long terme.

Le jour de l'infection des iPSCs, une heure avant la transduction leur milieu mTeSR Plus est changé et une concentration finale de 10µM de Rock inhibiteur (StemCell Technologies, 72304) est ajoutée. Différentes concentrations de vecteurs sont testées : 1µL Ngn2 + 2µL rtTA3, 5µL Ngn2 + 10 µL rtTA3, 10µL Ngn2 + 20µL rtTA3 et 10µL de contrôle gfp. Le milieu des cellules est changé le lendemain.

2.2.1.2.1.4. Extraction d'ARN

L'ARN total a été extrait en utilisant le kit NucleoSpin RNA XS (Macherey-Nagel, 740902.50). Les cellules sont re-suspendues et mélangées vigoureusement dans 100µL de tampons A1 avec 2µLTCEP. 5µL de carrier RNA working solution. La solution est déposée sur la colonne violette puis centrifugée 30 secondes à 11,000g afin d'éliminer les débris cellulaires. 100µL d'éthanol 70% sont ajoutés au filtrat avant d'être chargés sur la colonne bleue puis centrifugés 30 secondes à 11,000g. Le filtrat est jeté et la colonne est chargée avec 100µL de MDB puis centrifugée 30 secondes à 11,000g. Une solution de 30µL de DNase est préparée et ajoutée à la colonne qui est incubée 15 minutes à TA. Trois rinçages de la colonne sont effectués les deux premiers avec 100µL puis 400µL de tampon RA2 et un dernier avec 300µL de tampon RA3. L'élution est réalisée avec 10µl de H₂O sans RNase. La qualité de l'ARN a été testé en utilisant un NanoDrop™.

2.2.1.2.1.5. RT-PCR

Les ADN complémentaires (ADNc) sont synthétisés avec le kit iScript cDNA Synthesis Kit (BIORAD, 1708891). Les rétrotranscriptions sont réalisées avec 500µg. Les ADNc obtenus sont utilisés au quart pour amplifier les transcrits d'intérêt par PCR. Chaque mélange PCR contient une concentration finale de 1X Green GoTaq Reaction Buffer, un mélange de nucléotides ajouté à une concentration finale de 0.2mM, des amorces à une concentration finale de 1µM pour chaque et 1.25 unité de GoTaq par mélange qui est complété avec de H₂O pour atteindre le volume souhaité. Les paramètres d'amplification sont 5min à 94°C, entre 25 à 35 de 30sec à 94°C puis 30sec entre 57-65°C et 1min à 72°C avant une dernière amplification 7min à 94°C. Les échantillons sont ensuite déposés sur gel d'agarose pour réaliser une électrophorèse afin d'attester de l'expression du transcrit. Les séquences des amorces utilisées sont disponibles dans le **Tableau 11**.

Nom de l'amorce	Séquence de l'amorce
Neurogénine2_FWD	TGGGTCTGGTACACGATTGC
Neurogénine2_REV	GTCTTCTTGATGCGCTGCAC
rtTA3_FWD	AATCGAGATGCTGGACAGGC
rtTA3_REV	GTCGCGATGTGAGAGGAGAG
RPLP0_FWD	CATTGCCCCATGTGAAGTC
RPLP0_REV	GCTCCCACTTTGTCTCCAGT

Tableau 11 : Liste des amorces utilisées pour réaliser les RT-PCR

2.2.1.2.2. Génération et caractérisation des neurones en 2D générés par l'expression de neurogénine 2

Chaque vecteur a été vérifié après avoir réalisé les MiniPreps et les MaxiPreps. Le gel présenté en **Figure 47** montre le résultat des digestions des MaxiPreps.

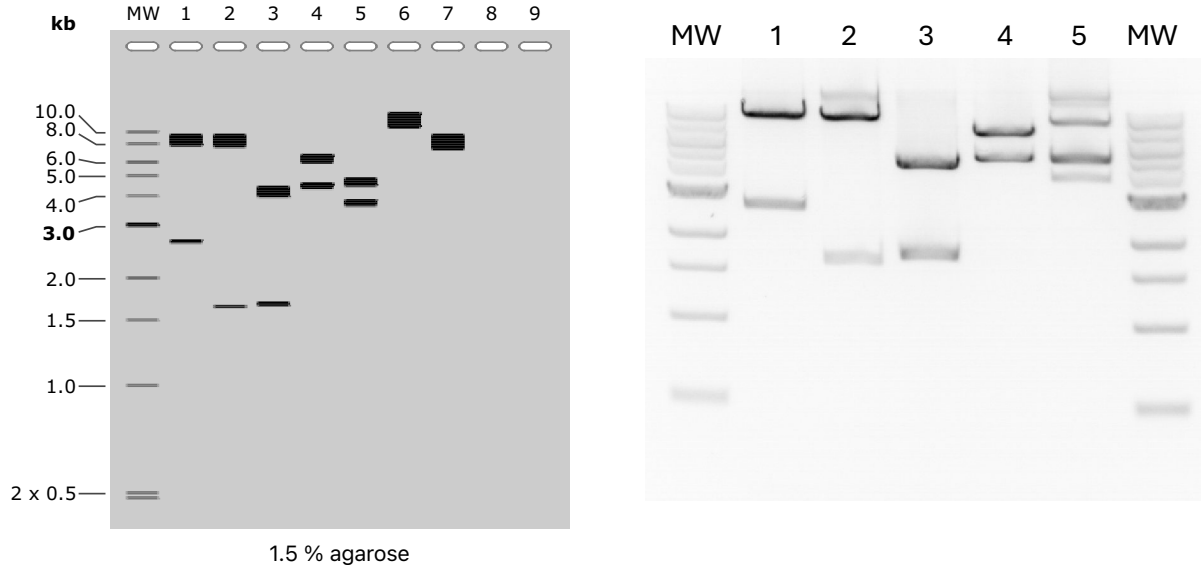


Figure 47 : Gel de vérification des plasmides amplifiés après MaxiPrep

Chaque vecteur a été vérifié par digestion avec des enzymes de restriction. Toutes les plasmides vérifiés sont des **MW**: 1 kb DNA Ladder ; **1**: pLV_TRET_hNgn2_UBC_Puro digéré par XhoI avec deux bandes attendues : 1. 8592 bp et 2. 2604 bp ; **2**: pLV_hEF1a_rtTA3 digéré par XhoI avec deux bandes attendues : 1. 8316 bp et 2. 1635 bp ; **3**: 01_PMD2_VSVG digéré par EcoRI avec deux bandes attendues : 1. 4154 bp et 2. 1668 bp ; **4**: PSPA2X_GAG-Pol digéré par EcoRI avec deux bandes attendues : 1. 6339 bp et 2. 4370 bp ; **5**: #0008 pLKO digéré par AflII avec deux bandes attendues : 1. 4691 bp et 2. 3656 bp ; **6**: #0008 pLKO non digéré à une taille à 1. 8347 bp et **7**: #0008 pLKO digéré une seule fois par AflII une seule fois avec une taille de bande à 1. 8347 bp.

Les lentivirus ont été produits puis transduits dans les iPSCs en testant différentes concentrations de vecteurs. Des culots secs des iPSCs transduites ont été récupérés afin de vérifier l'expression des transgènes. Les résultats sont présentés sur la **Figure 48**. L'expression de la protéine Ngn2 est contrôlée par la protéine rtTA3 et l'ajout de tétracycline. Le gel montre que la protéine Ngn2 n'est pas exprimée contrairement à la protéine rtTA3 qui est sous le contrôle d'un promoteur constitutif. Enfin, un gène de ménage est utilisé afin de s'assurer de la validité de l'expérience. Pour s'assurer que le matériel génétique amplifié est bien de l'ARN et non de l'ADN, un contrôle négatif sans rétrotranscriptase est réalisé. Comme attendu, la protéine rtTA3 est exprimée dans les trois conditions dans lesquelles le vecteurs rtTA3 a été utilisé. Les contrôles négatifs des puits 2 et 4 dans la condition RPLP0 montrent que des contaminations ADN sont visibles.

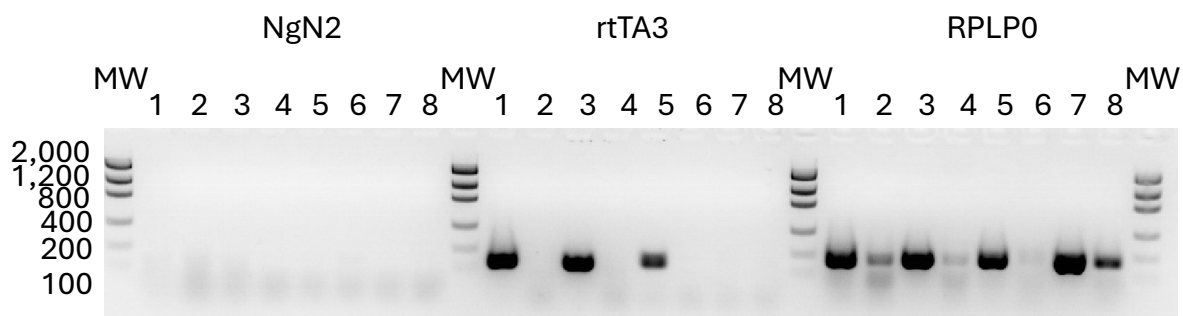


Figure 48 : Gel de vérification de l'expression des différents transgènes en absence de doxycycline au sein des iPSCs par RT-PCR

Les iPSCs ont été transduites avec différentes quantités de vecteurs. Les ARN des iPSCs transduites selon différentes conditions ont été extraites. Le contenu des puits est le suivant : 1 : 1 μ L Ngn2 + 2 μ L rtTA3, 2 : RT-, 3 : 5 μ L Ngn2 + 10 μ L rtTA3, 4 : RT-, 5 : 10 μ L Ngn2 + 20 μ L rtTA3, 6 : RT-, 7 : Contrôle *gfp*, 8 : RT-. Trois couples d'amorces ont été testés. Les deux premiers couples d'amorces visent les deux transgènes Ngn2 et rtTA3 et le dernier couple cible le gène de ménage RPLP0.

Les résultats obtenus sur les iPSCs transduites avec les vecteurs lentivirus Ngn2 et rtTA3 sont positifs. L'ajout de tétracycline dans le milieu de culture des iPSCs va permettre l'expression de Ngn2 et induire la conversion des iPSCs en neurones. Les neurones sont cultivés sur un support Geltrex (GIBCO, 12063569) dans un milieu de différenciation neuronal N2B27 qui est un mélange à 1 pour 1 d'un milieu N2 et d'un milieu B27. Le milieu N2 est composé de DMEM/F-12 GlutaMAX, 1 \times N-2 supplément, 5 μ g ml⁻¹ insuline (2000x stock), 100 (1x) μ M acides maniés non essentiels (NEAA), 100 μ M 2-mercaptoethanol (b2M), 50 U ml⁻¹ pénicilline and 50 mg ml⁻¹ streptomycine. (Pen/step is optional). Le milieu B-27 est composé de Neurobasal, 1 \times B-27 (without vitamin A), 1 x GlutaMAX, 50 U ml⁻¹ pénicilline and 50 mg ml⁻¹ streptomycine (Pen/step est optionnel).

Des culots secs des iPSCs à 48h et 72h après ajout de tétracycline ont été récupérés afin de vérifier l'expression des transgènes. Les résultats sont présentés sur la **Figure 49**. Le résultat montre que la protéine Ngn2 est exprimée dans deux des trois conditions dans laquelle la protéine rtTA3 est exprimée et la tétracycline ajoutée. La condition dans laquelle la protéine Ngn2 n'est pas exprimée, la protéine rtTA3 est exprimée faiblement. Tous les contrôles négatifs montrent qu'il n'y a pas eu d'ADN contaminant.

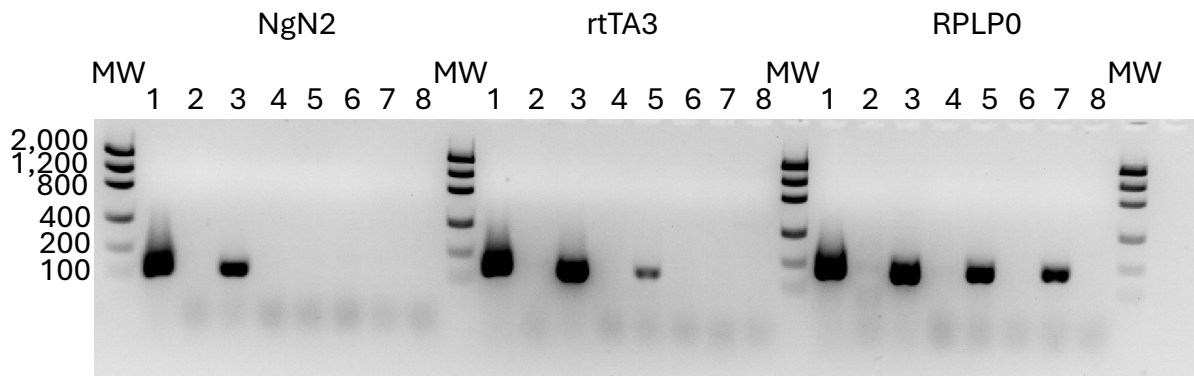


Figure 49 : Gel de vérification de l'expression des différents transgènes en présence de doxycycline au sein des iPSCs par RT-PCR

Les iPSCs ont été transduites avec différentes quantités de vecteurs. Les ARN des iPSCs transduites selon différentes conditions ont été extraites. Le contenu des puits est le suivant : 1 : 1 μ L Ngn2 + 2 μ L rtTA3 + Doxycycline, 2 : RT-, 3 : 5 μ L Ngn2 + 10 μ L rtTA3 + Doxycycline, 4 : RT-, 5 : 10 μ L Ngn2 + 20 μ L rtTA3 + Doxycycline, 6 : RT-, 7 : Contrôle gfp, 8 : RT-. Trois couples d'amorces ont été testés. Les deux premiers couples d'amorces visent les deux transgènes Ngn2 et rtTA3 et le dernier couple cible le gène de ménage RPLP0.

Une observation au microscope a été effectuée régulièrement afin de s'assurer de la différenciation des cellules. Comme présenté sur la **Figure 50**, les quatre lignées cellulaires d'intérêt, WT-7889SA, APP Ki, PSEN1 Ki ainsi que APP/PSEN1 Ki, ont un pouvoir de différenciation similaire. Une caractérisation des neurones a été réalisée par immunofluorescence. Trois marqueurs ont été utilisés β 3-tubuline qui permet d'identifier des prolongements neuronaux immatures et matures, MAP2 qui identifie les prolongements neuronaux matures et NeuN qui marque les noyaux des neurones, Une contre-coloration a également été faite avec du DAPI afin d'identifier tous les noyaux cellulaires. Les résultats de ces immunofluorescences sont présentés en **Figure 50**. Les quatre lignées cellulaires montrent bien la présence des 3 marqueurs de manière plus homogène.

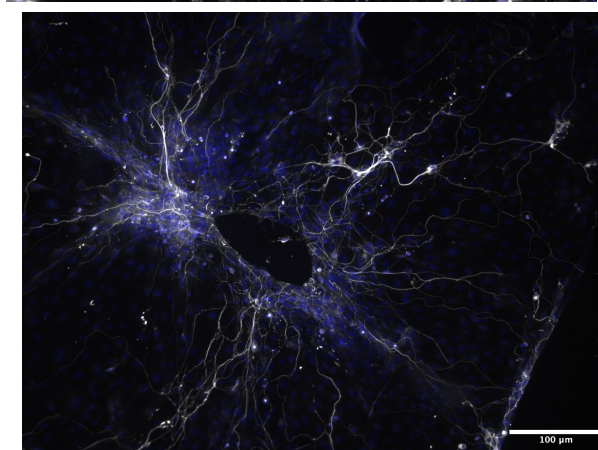
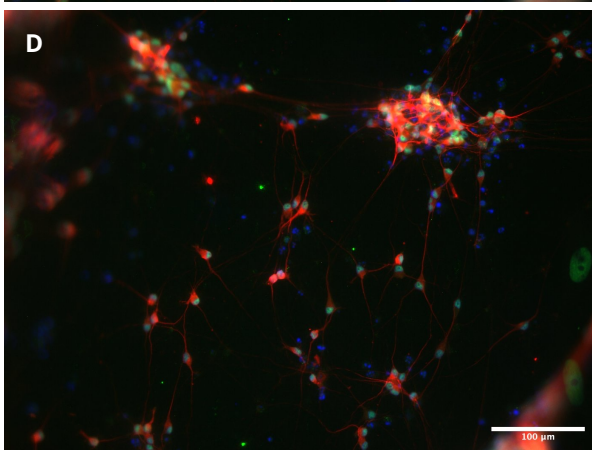
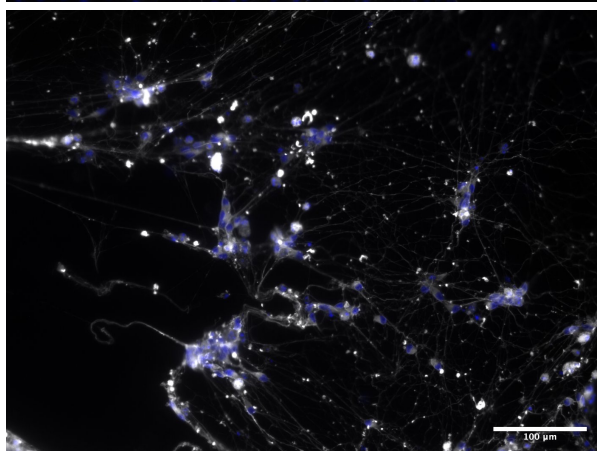
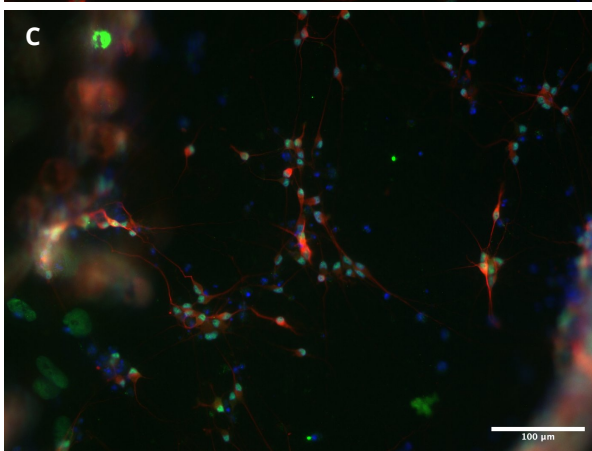
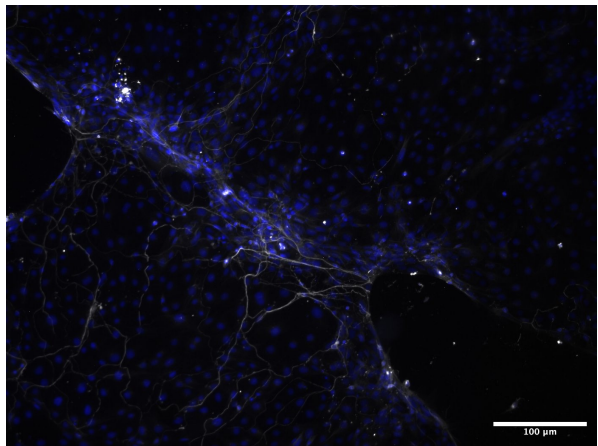
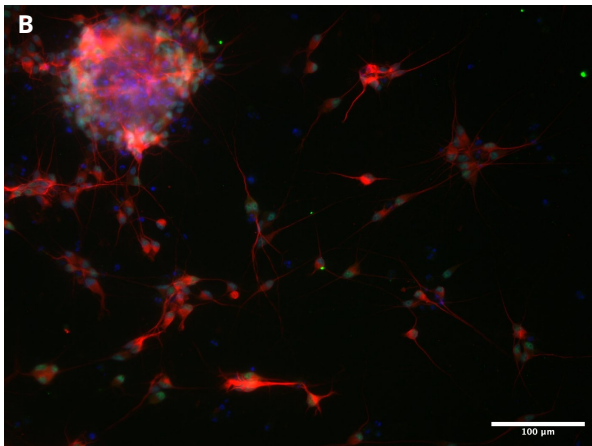
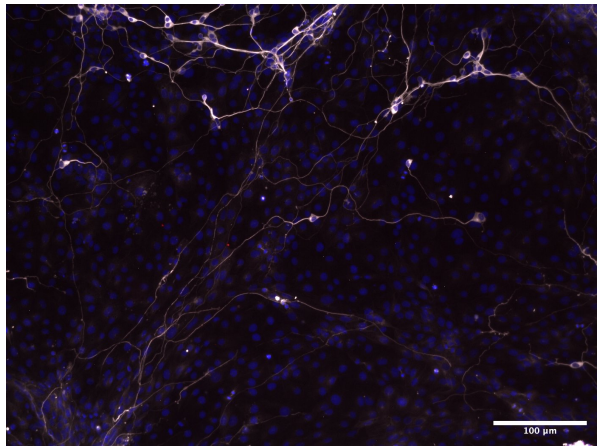
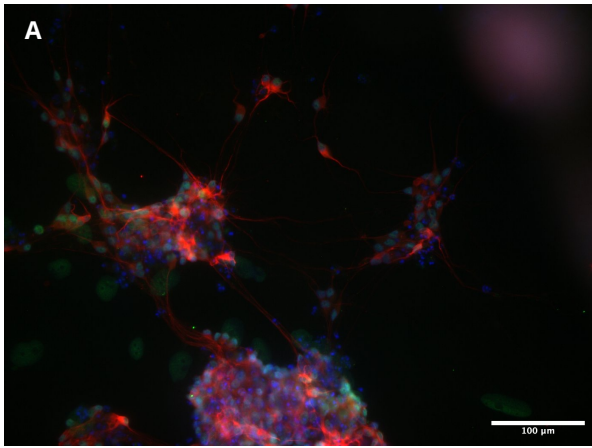


Figure 50 : Images représentatives de la différenciation en neurones 2D grâce à l'expression de la Neurogénine 2

Les immunofluorescences ont été réalisées sur les lignées WT-7889SA (A), APP Ki (B), PSEN1 Ki (C) et APP/PSEN1 Ki (D). Les marqueurs NeuN en vert et MAP2 en rouge ont été utilisés pour les immunofluorescences de la colonne de gauche et β 3-tubuline en blanc pour la colonne de droite. Les noyaux ont été marqués au DAPI en bleu. Les images ont été prises avec un microscope Leica DM6000b au 20X. La barre d'échelle représente 100 μ m.

Le protocole de génération de neurones en 2D à partir d'iPSCs grâce à l'expression de la protéine Ngn2 permet de générer des neurones de manière plus efficace et homogène que le premier protocole de génération des neurones 2D basé sur la simple culture. Une des principales limites de système est son intégration aléatoire dans le génome aussi bien en termes d'endroit que de nombre de copies. A terme, il serait utile de développer un système CRISPR-Cas9 inducible. Le système serait ainsi mieux contrôlé et permettrait de réaliser des études plus physiologiques.

2.2.2. Suivi du flux calcique à l'aide de sonde

2.2.2.1. Test Fluo-4

2.2.2.1.1. Matériel et méthode

Un aliquot de Fluo-4 (Invitrogen, F14201) doit être re-suspendu extemporanément dans du DMSO à une concentration de 1 à 5mM. Un détergeant non-ionique peut être ajouté et peut aider à disperser les esters dans le milieu aqueux, mais n'a pas été réalisé dans les expériences. Les cellules sont incubées entre 30 à 60 minutes à 37°C avec une concentration de Fluo-4 de 1 à 5 μ M. Les cellules sont ensuite rincées avec du PBS1X pour enlever tout le colorant qui ne se serait pas associé spécifiquement avec la surface des cellules. Les cellules sont incubées 30 minutes à 37°C dans du milieu sans colorant avant d'être imagées.

2.2.2.1.2. Résultats

Les tests de Fluo-4 ont été générés sur des organoïdes AD4F17 non-guidés, lignée comportant une mutation associée à la maladie d'Alzheimer. Les organoïdes utilisés sont âgés de plus de 6 mois. Ils ont été incubés 1h avec la sonde avant d'être rincés et incubés à nouveau 30 minutes sans sonde pour pouvoir être imagés. Chaque image de la **Figure 51** du panel A est la résultante de la projection moyenne des images de chacune des vidéos de 1 minute réalisées.

A chaque image est associée un graphique qui illustre les variations de fluorescence observées au cours de cette minute de film réalisé. Sur l'image (A) 1, la projection moyenne de l'image montre vraisemblablement un prolongement neuronal. L'étude du graphique qui lui est associée, (B) 1, montre des variations de fluorescence de faible intensité. Pour cette première partie de la figure, cela signifie qu'un flux calcique observable est généré au sein de ce prolongement axonal et par conséquent que le neurone pourrait être actif. Sur les 3 autres images, les morphologies cellulaires sont différentes de la première image, qui s'apparenteraient plus à des astrocytes ou des cellules de glie radiaire. Cependant, grâce à l'étude des graphiques qui sont associés à chaque image, une variation de faible amplitude est également observée pour chacune de ces cellules. Cela signifie qu'il y a dans ces cellules un flux calcique qui est généré bien qu'il ne s'agisse pas de neurones.

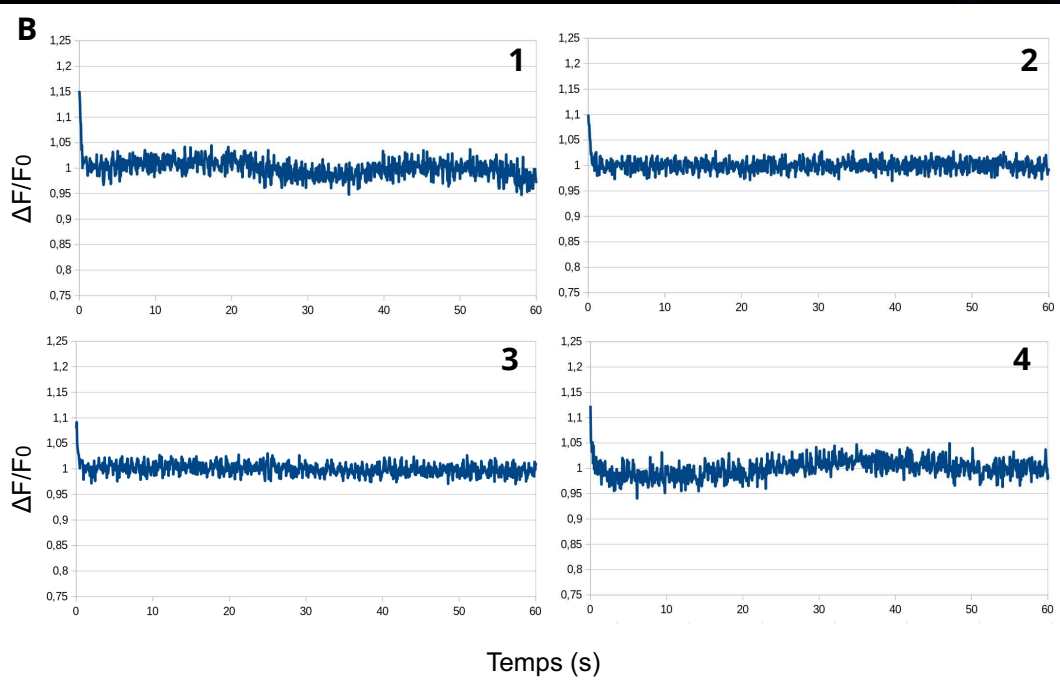
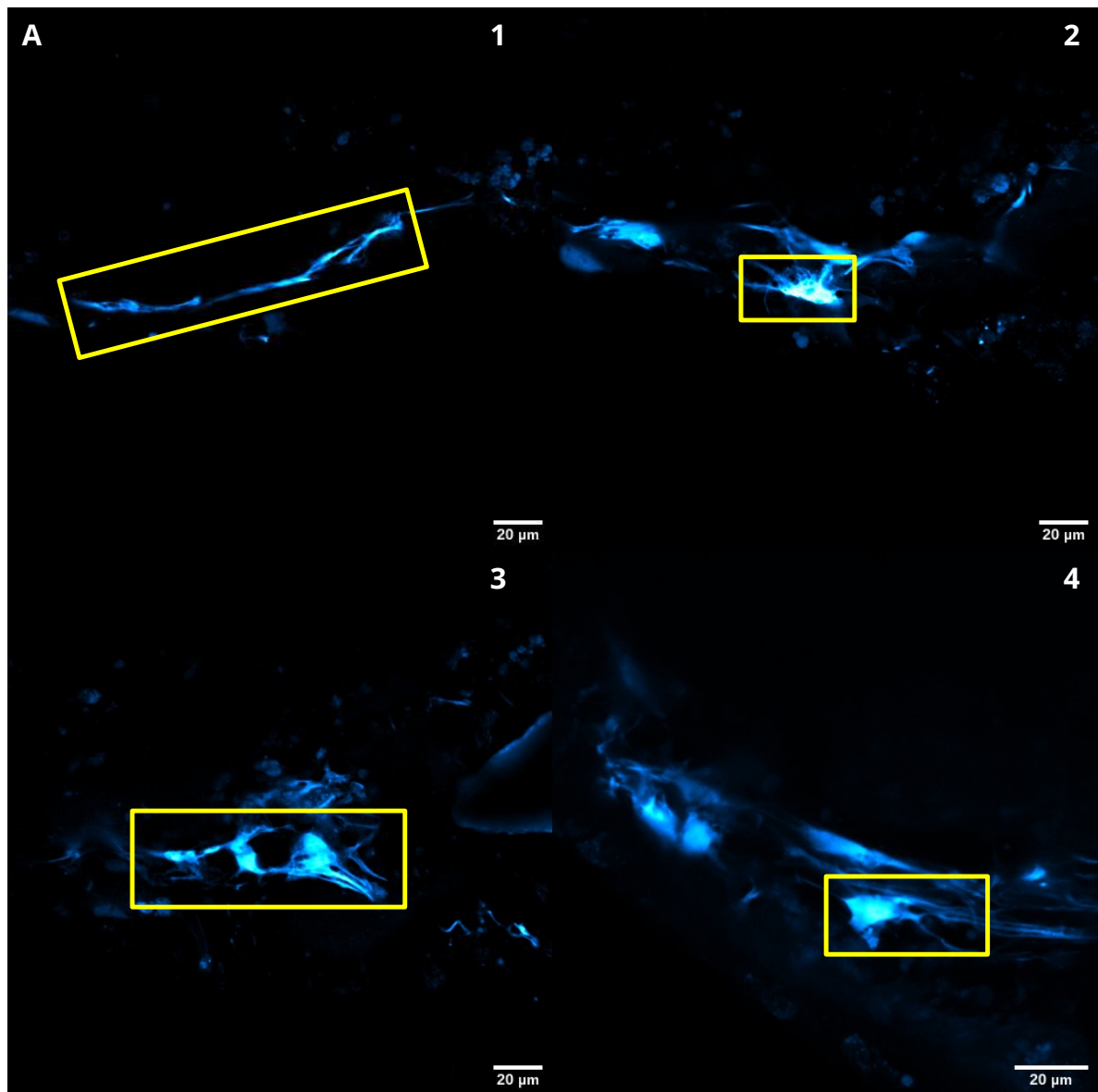


Figure 51 : Images illustratives de l'imagerie calcique d'organoïdes corticaux

Les images d'un organoïde en (A) ont été faites par un microscope spinning disque et sont la résultante d'une projection moyenne. La barre d'échelle représente 20µm. Chaque graphique en (B) représente le suivi de la variation de fluorescence sur une 1 minute.

L'utilisation du Fluo-4 a permis de révéler des cellules dont l'activité calcique a pu être suivie et monitorée. Cependant, il faut noter que très peu de cellules ont pu être détectées par l'imagerie Fluo-4 et les morphologies de ces dernières sont très variables. Le fait que très peu de cellules aient pu être détectées provient peut-être de la méthode utilisée pour générer les organoïdes cérébraux. De plus, les organoïdes cérébraux sont des structures très denses, ce qui peut limiter la pénétrance de la molécule au cœur des organoïdes.

Pour essayer de pallier ces premières difficultés rencontrées, d'autres rapporteurs calciques ont été envisagés, comme GCaMP. De plus, l'utilisation de vecteurs pour amener le rapporteur calcique au sein des cellules pourrait aider à maximiser l'entrée des sondes.

2.2.2.2. Mise au point de la sonde GCaMP8m

2.2.2.2.1. Matériel et méthode

2.2.2.2.1.1. Culture de neurones en 2D infectée par AAV GCaMP

Des vecteurs commerciaux pAAV-CAG-GFP (Addgene, 37825-AAV1), pAAV-hSyn-EGFP (Addgene, 50465-AAV1), pGP-AAV-syn-jGCaMP8m-WPRE (Addgene, 162375-AAV1) et pAAV-CAG-GCaMP6m-WPRE (Addgene, 100840-AAV1) sont utilisés pour transduire des cultures de neurones en 2D générés en suivant le protocole Ngn2 après 3 semaines de culture. Avant le début de l'infection, le milieu de chaque puits est changé en mettant un volume minimal, 150µL pour une P24. 5µL de vecteur est ensuite ajouté puis les cellules sont incubées 4 heures dans une atmosphère humide à 37°C avec 5% CO₂. 350µL de milieu sont ensuite ajoutés et les cellules sont incubées à nouveau pendant la nuit avant que la totalité du milieu soit changé le lendemain.

2.2.2.2.1.2. Organoïdes cérébraux infectés par des AAV GCaMP

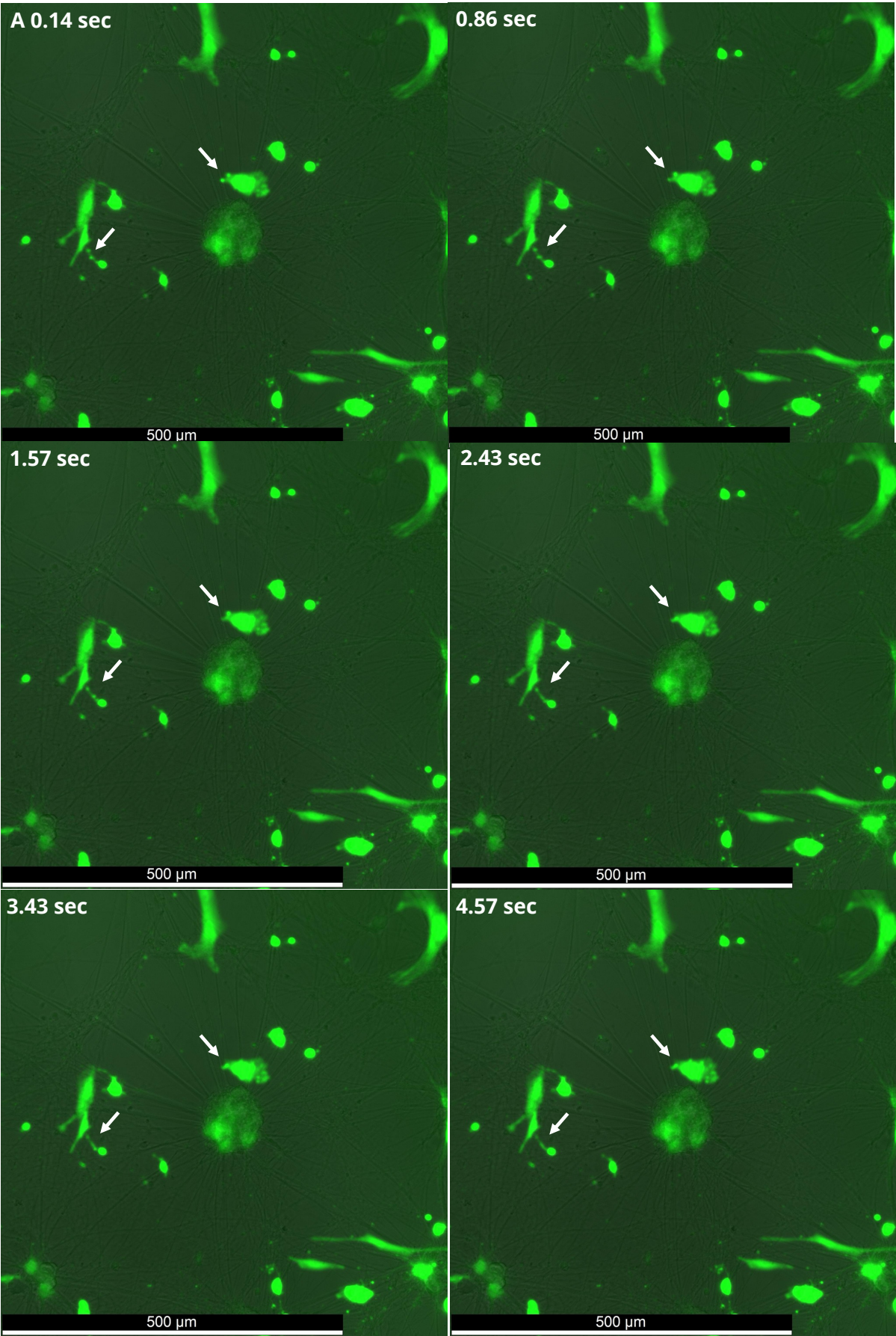
Des vecteurs commerciaux pAAV-CAG-GFP (Addgene, 37825-AAV1), pAAV-hSyn-EGFP (Addgene, 50465-AAV1), pGP-AAV-syn-jGCaMP8m-WPRE (Addgene, 162375-AAV1) et pAAV-CAG-GCaMP6m-WPRE (Addgene, 100840-AAV1) ont été utilisés pour les infections. Les organoïdes ont été générés et gardés en culture au moins 3 mois dans un milieu de différenciation corticale composé de 25 mL

DMEM/F-12, supplément GlutaMAX (GIBCO, 11524436), 25mL de Neurobasal Medium (GIBCO, 21103-049), 500µL de Pen/Strep (GIBCO, 15140-122), HEPES (1M) (GIBCO, 11560496), 500µL de B27 sans vitamine A (GIBCO, 12587-010), 250µL N2 Supplement (100X) (GIBCO, 11520536), 50µL de MEM-NEAA (GIBCO, 12084947), 50µL acide L-ascorbique (SIGMA-ALDRICH, A92902-25G), 45µL 2-Mercaptoethanol (GIBCO, 11508916), 12.5µL d'insuline humaine (SIGMA-ALDRICH, I9278-5ML), 10µL de BDNF (StemCell, 78005.1) à 10µg/mL et 2.5mL de Dibutyryl-cAMP (StemCell, #73882) à 1mg/mL. Avant le début de l'infection, les organoïdes corticaux sont placés dans des puits de plaque P96 milieu en mettant un volume minimal, 35µL pour une P24. 5µL de vecteur est ensuite ajouté puis les cellules sont incubées 4 heures dans une atmosphère humide à 37°C avec 5% CO₂. Les organoïdes sont transférés dans des puits de plaque P24 avec les 40µL de milieu contenant les AAV. 460µL de milieu sont ensuite ajoutés et les cellules sont incubées à nouveau pendant la nuit avant que la totalité du milieu soit changé le lendemain.

2.2.2.2. Résultats des infections AAV GCaMP sur neurones en 2D

Les neurones en 2D générés par l'expression de neurongénine 2 sont infectés dès 3 semaines de culture, moment à partir duquel les neurones sont matures et susceptibles de générer des flux calciques. L'utilisation du Fluo-4 nécessite de faire l'acquisition des neurones dans la foulée car la sonde disparaît des cellules après quelques heures. Cependant, toutes cellules dans lesquelles la sonde est entrée aura du signal s'il y a un flux. L'avantage de l'utilisation vecteurs AAV est qu'ils apportent le gène codant la sonde qui reste dans les cellules quiescentes jusqu'à leur mort. Cependant, il faut tout de même noter que l'infection de cellules en division aboutira à la perte du transgène dans les cellules filles au cours des divisions successives. Dans notre cas, il ne devrait y avoir presque que des neurones qui pourront émettre du signal. Une fois l'infection réalisée, les neurones peuvent être observés au moins 48 heures après l'infection, le temps que l'expression de la sonde puisse se faire.

La **Figure 52** présente deux panels qui sont issus de films pour suivre le flux calcique au cours du temps. Des flèches blanches sont placées aux différents endroits identifiés où la fluorescence liée à la protéine GCaMP varie. Pour le panel A et B, un flux calcique est détectable au cours du temps. Pour le panel A, les neurones sont bien en 2D et pour le panel B les neurones se sont agglomérés formant une structure plus proche de la neurosphère et donc d'une structure en 3D. Cette neurosphère en 3D semble plus active que les neurones en 2D qui ne se sont pas agglomérés.



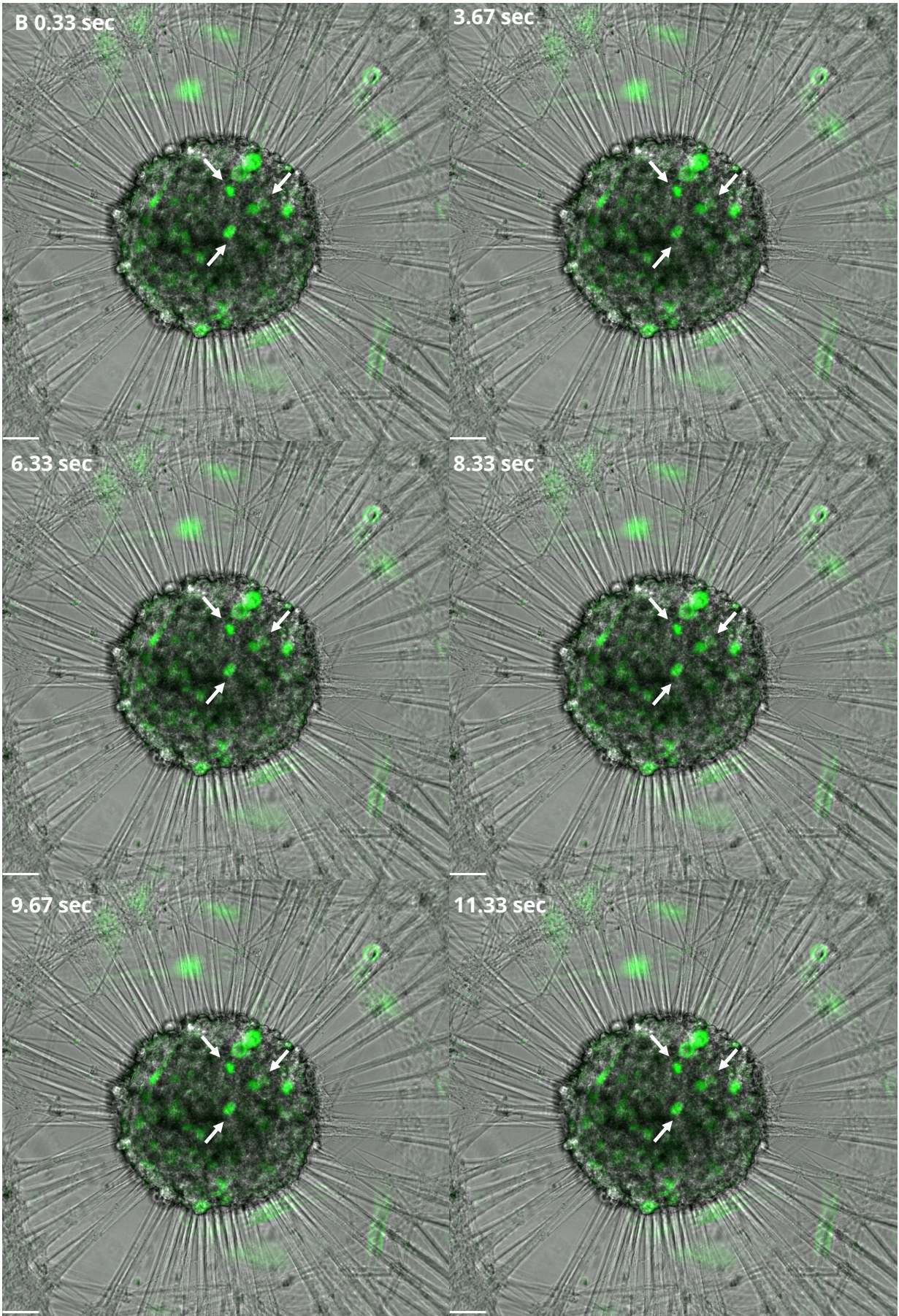


Figure 52 : Images illustratives de l'activité calcique des neurones en 2D en suivant la protéine GCaMP

Les panel (A) et (B) représentent des neurones en 2D différenciés 3 semaines après le début de leur différenciation. Pour le panel (B) les neurones se sont rassemblés spontanément pour former une pseudo-neurosphère. Les images ont été prises au microscope Leica Thunder au grossissement 20X. La barre d'échelle pour le panel (A) équivaut à 500µm et pour le panel (B) à 50µm.

Ces premiers résultats sont encourageants, car ils démontrent que les vecteurs AAV contenant la protéine GCaMP permettent de visualiser le flux calcique au sein des neurones. Les vecteurs AAV présentent une capacité de pénétration suffisante pour infecter cette pseudo-structure de neurosphère, ce qui est prometteur pour les futures infections sur les organoïdes. Toutefois, des tests supplémentaires sur les organoïdes sont nécessaires pour valider ces résultats de pénétration au sein d'une structure tridimensionnelle. Bien que la maturation des neurones en 2D dérivés de Ngn2 soit très rapide, ce n'est pas nécessairement le cas pour les organoïdes cérébraux. Il est donc important d'évaluer les organoïdes à différents stades de maturation, afin de déterminer à partir de combien de semaines de culture ils sont capables de générer des flux calciques.

2.2.2.2.3. Résultats des infections AAV GCaMP sur les organoïdes cérébraux

Les tests de transduction des vecteurs AAV ont été réalisés sur des organoïdes contrôles non guidés âgés de 3 mois. Le plan de manipulation d'une des infections réalisées est présenté sur la **Figure 53**. Brièvement, les organoïdes sont transduits dans des plaques de P96 avec 5µL de vecteur AAV et 35µL de milieu frais +AR. Après environ 4h d'incubation, les organoïdes sont transférés avec le milieu contenant les vecteurs dans des puits de P24. Le volume du puits est complété pour atteindre 500µL de milieu.

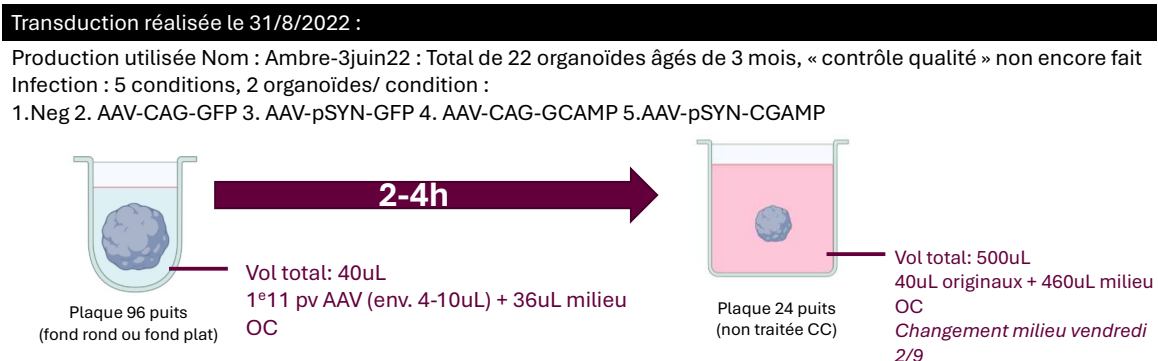


Figure 53 : Stratégie expérimentale d'une transduction d'organoïde cérébrale avec des vecteurs AAV

Les quatre vecteurs AAV ont été testés, seuls les résultats concernant les vecteurs AAV utilisant les constructions sous le promoteur synapsine sont présentés. Les organoïdes ont été imagés plus de deux semaines après l'infection. Sur la **Figure 54**, les images montrent un organoïde infecté par le vecteur pAAV-hSyn-EGFP. Le vecteur contient une protéine fluorescente sous le contrôle du promoteur synapsine. Ainsi, seuls les neurones seront fluorescents.

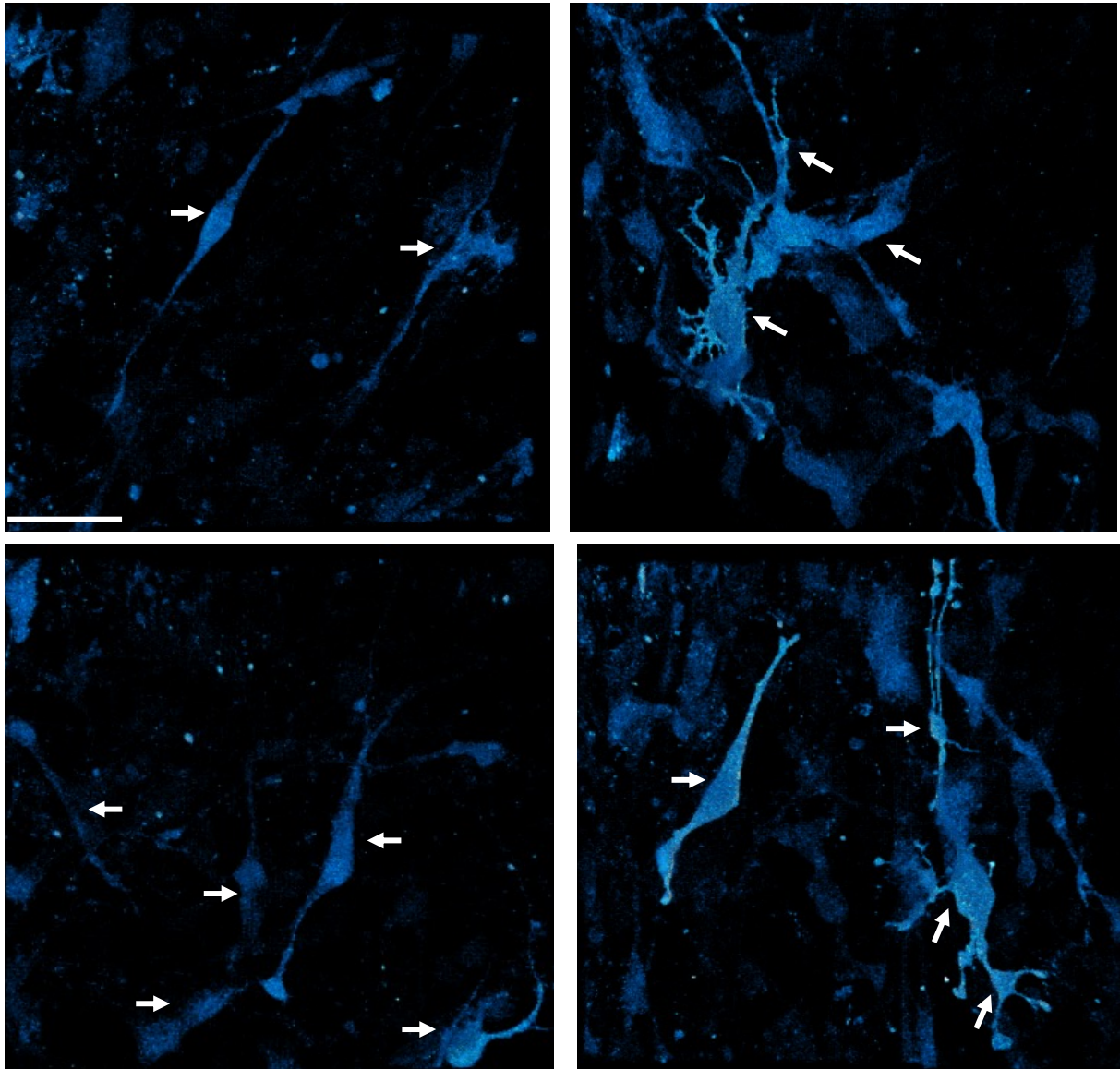


Figure 54 : Images illustratives de la transduction d'un organoïde de la protéine GFP sous le contrôle du promoteur synapsine

Images réalisées avec un microscope confocal à disque rotatif Leica SP8 en collaboration avec l'équipe de François Treussart. Les cellules (flèches) au sein de l'organoïde expriment le rapporteur sous le contrôle du promoteur synapsine, protéine spécifique des neurones. La barre d'échelle correspond à 50µm.

Les infections avec le vecteur pGP-AAV-syn-jGCaMP8m-WPRE se sont révélées positives. La **Figure 55** présente les résultats de la transduction d'un organoïde contrôlé avec le vecteur pGP-AAV-syn-jGCaMP8m-WPRE. Sur l'image, une zone est entourée en jaune et montre l'axone d'un neurone actif puisqu'un flux calcique est présent. Le graphique de droite montre les différences de fluorescence au cours des deux minutes de film générés. Un pic d'activité calcique est visible entre 80 et 100 secondes.

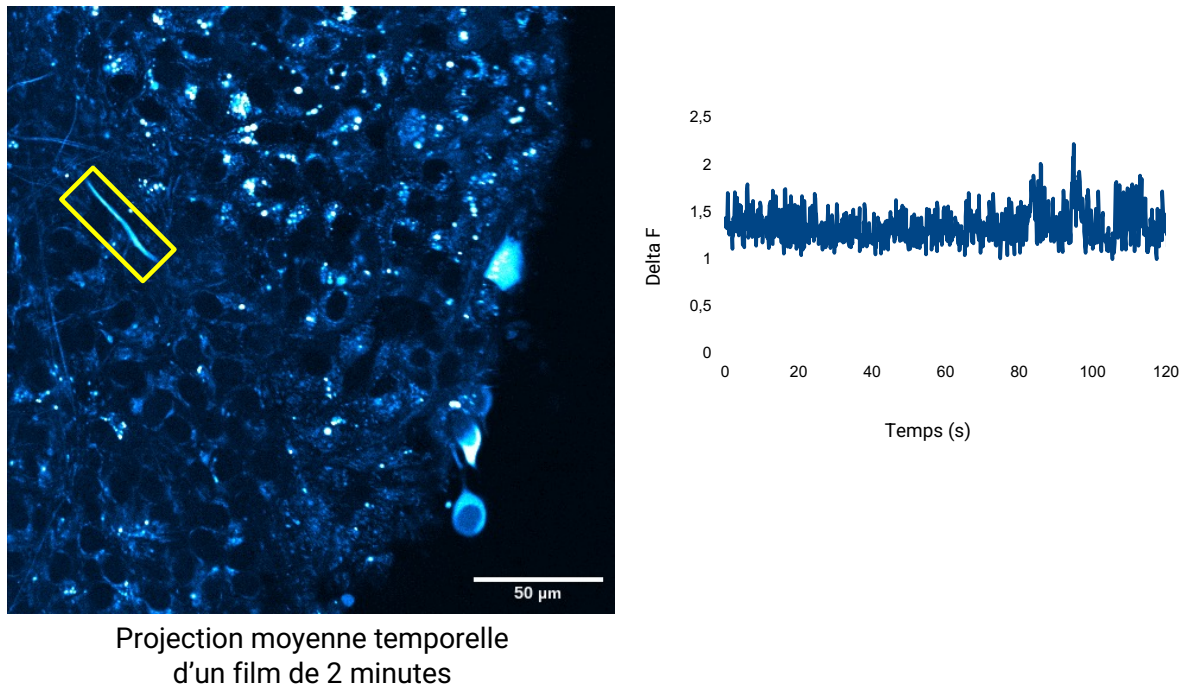


Figure 55 : Images illustratives de l'activité calcique d'un organoïde cérébral non-guidé en suivant la protéine GCaMP8m

Image réalisée avec un microscope confocal à disque rotatif Leica SP8 en collaboration avec l'équipe de François Treussart. Les cellules marquées au sein de l'organoïde sont des neurones exprimant la protéine GCaMP8m qui permet de suivre le flux calcique. Les variations de fluorescence sont mesurées et montrées sur le graphique de droite. La barre d'échelle représente 50µm.

2.2.3. Génération de lignées rapportrices

2.2.3.1. Introduction

Les techniques présentées, Fluo-4 et AAV GCaMP8m, permettent de suivre les flux calciques sur des structures en 2D ou 3D. Le Fluo-4 est une sonde capable d'imager sur des courtes durées étant dégradée au fil du temps. Si un suivi de l'évolution des flux calciques au cours du temps est souhaité, deux options sont possibles : une incubation des cellules avec la sonde Fluo-4 à chaque observation,

ce qui peut peut-être à terme toxique, ou l'infection des cellules par un vecteur AAV GCaMP qui permettra un suivi à plus long terme. Comme évoqué précédemment, les cellules en division infectées par le vecteur AAV GCaMP ne transmettront pas le transgène à toutes leurs cellules progénitrices. Ce phénomène peut être un avantage, puisque la plupart des cellules neurones auront le transgène. Cependant, si l'on souhaite que la plupart des cellules d'un organoïde soit infectée, l'infection doit être réalisée à un stade précoce, ce qui peut présenter un désavantage. Ces sondes ont été cruciales dans un premier temps pour avoir la possibilité de visualiser les flux calciques sur des structures plus ou moins complexes. Sur des structures d'organoïdes cérébraux en 3D, un problème vient s'ajouter puisque la sonde seule ou le vecteur contenant la sonde n'arrivent pas forcément à pénétrer au cœur de l'organoïde. Ces problèmes de pénétration au sein des organoïdes peuvent ainsi biaiser les résultats obtenus mais également aboutir à une perte importante d'informations. Dans l'objectif de construire des études sur du moyen ou long terme de manière plus physiologiques, l'établissement de lignées rapportrices dans lesquelles les sondes seraient exprimées de manière continue ou spécifique est nécessaire. Ces lignées permettraient ainsi de suivre la maturation fonctionnelle des organoïdes dans des études plus longitudinales. La première étape de ce projet est la conception de ces lignées qui implique le design des différents éléments de l'outil CRISPR-Cas9. La seconde étape sera la génération de ces lignées par transfection des iPSCs, et sélection clonale. Et enfin, la dernière étape sera la caractérisation de ces lignées avant de pouvoir les utiliser.

L'objectif est d'insérer le transgène au sein du locus AAVS1. Le locus AAVS1 est un locus toujours ouvert pour la transcription de l'ADN. L'insertion dans ce site de transgènes avec un promoteur n'entraîne pas l'activation d'oncogène (Aznauryan et al., 2022). Afin de générer ces lignées de manière efficace, le système CRISPR-Cas9 d'insertion dans le site AAVS1 est testé dans plusieurs lignées tumorales avec un transgène eGFP. Maintenant que le système d'insertion a été mis au point dans le laboratoire, les constructions plasmidiques nécessaires pour générer la matrice de réparation pourront être réalisées. Dès que les constructions seront faites, elles pourront être testées sur cellules tumorales avant d'être testées sur iPSCs.

2.2.3.2. CRISPR-Cas9 au sein du locus AAVS1

2.2.3.2.1. Matériel et méthode

2.2.3.2.1.1. Plasmides utilisés et lignées cellulaires

Les plasmides utilisés sont des plasmides commerciaux commandés sur Addgene dont les références sont les suivantes : le plasmide pSpCas9(BB)-2A-Puro (Addgene, 48139) et le plasmide AAVS1-Pur-CAG-EGFP (Addgene, 80945).

Quatre lignées tumorales ont été utilisées pour réaliser les tests d'édition génétique dans le site AAVS1 :

- Les HEK293 sont des cellules saines issues de rein embryonnaire qui ont été immortalisées par transduction d'un adénovirus,
- Les HCT116 sont des cellules issues de cancer du colon
- Les T98G sont des cellules issues d'un neuroblastome
- Les Skmel37 sont des cellules issues d'un mélanome.

2.2.3.2.1.2. Préparation de plasmides

Même protocole que le paragraphe **2.2.1.2.1.2**

2.2.3.2.1.3. Transfection cellulaire

Les cellules sont préparées à une densité de 1×10^6 cellules par puits de P24. La transfection est réalisée en utilisant du jetPRIME (Polyplus-Sartorius, 101000027) en suivant les préconisations du fabricant. Utilisation d'un tube Eppendorf avec 1,5mL (SARSTEDT, 72706) 75 μ L de tampon jetPRIME avec 0.8 μ G d'ADN total dont 0.4 μ g du pSpCas9(BB)-2A-Puro et 0.4 μ g du AAVS1-Pur-CAG-EGFP. 1.6 μ L de réactif jetPRIME est ajouté et le tube est vortexé pendant une minute. Le tube est ensuite incubé à température ambiante pendant 15min. Pendant ce temps d'incubation, le milieu des cellules est changé pour 1mL de milieu frais. A l'issue des 15min, le mélange de transfection est ajouté de manière homogène sur les cellules. Les cellules sont incubées dans une atmosphère humide à 37°C avec 5 μ L de CO₂ pendant la nuit avant de changer leur milieu le lendemain matin.

2.2.3.2.2. Obtention des lignées tumorales AAVS1

Une étude de la littérature a été réalisée afin de déterminer la stratégie la plus adaptée pour insérer un transgène d'intérêt au sein d'une lignée d'iPSCs. Un tableau qui recense la plupart des lignées iPSCs rapportrices est présenté en **Annexe 4**. Une lignée rapportrice est une lignée dans laquelle une protéine fluorescente va être insérée dans le génome pour suivre un gène d'intérêt. Deux techniques sont utilisées :

- L'insertion en début ou en fin de gène d'intérêt, créant ainsi une fusion entre le gène d'intérêt et la protéine fluorescence, sauf si le fragment 2A est ajouté entre les deux protéines permettant ainsi leur clivage.
- L'insertion du promoteur du gène d'intérêt avec la protéine fluorescente au sein du locus AAVS1.

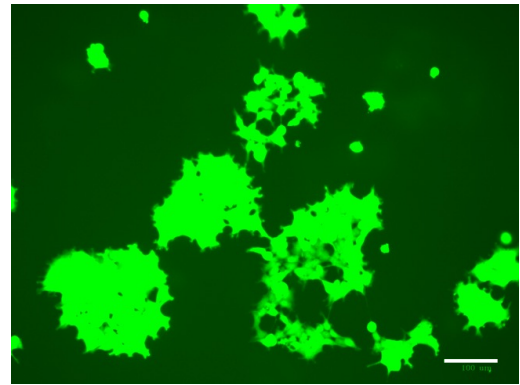
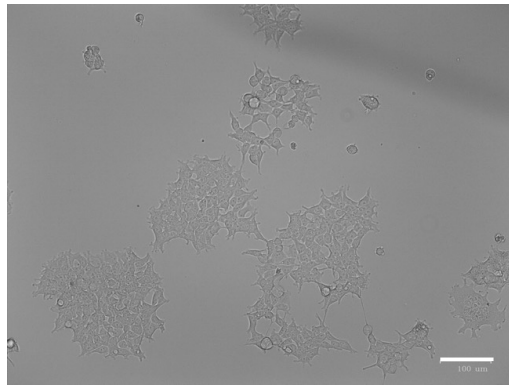
Cette deuxième stratégie a été choisie au sein du laboratoire, car il est parfois compliqué de trouver un guide à l'endroit souhaité au sein du gène d'intérêt ainsi que de réussir à rester en phase avec le cadre de lecture. De plus, l'insertion en N-ter ou en C-ter peut gêner le bon repliement de la protéine cible et pourrait ainsi impacter sa fonctionnalité. Utiliser le site AASV1 comme site d'insertion permet de s'affranchir de ces problèmes. Cependant, sauf si des constructions sont déjà disponibles, cela implique d'identifier le promoteur du gène d'intérêt, le cloner et de le tester avant de générer les lignées d'intérêt, ce qui nécessite du temps.

Afin de vérifier l'efficacité du système d'édition CRISPR-Cas9 au niveau du site d'insertion AAVS1, plusieurs lignées tumorales ont été utilisées. Quatre lignées tumorales humaines, HEK293T, HCT116, T98G et SKmel37, ont été choisies car elles ont des caractéristiques de culture différentes. Toutes les transfections ont été réalisées en jetPRIME. Sur la **Figure 56**, les cellules HEK293 et SKmel73 approchent d'un niveau de 100% de transfection sans avoir eu besoin de faire une sélection avec de la puromycine. Pour les lignées HCT116 et T98G, le taux de transfection est plus faible, une sélection puromycine a été nécessaire afin d'obtenir une lignée polyclonale 100% eGFP.

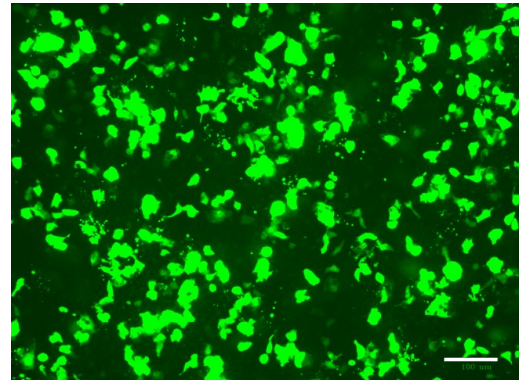
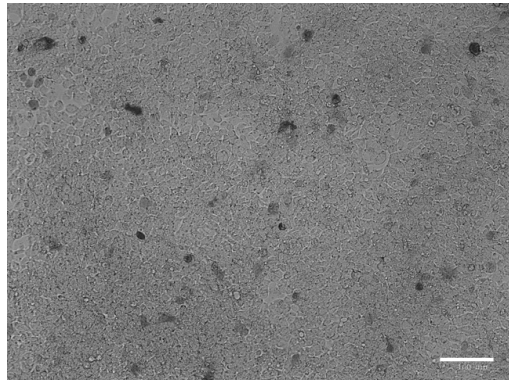
Sur les cellules T98G, différentes intensités de eGFP sont observables. Il serait intéressant de faire une isolation clonale pour obtenir des clones de différentes intensité. Les différents niveaux de fluorescence observés peuvent s'expliquer par le fait que les lignées tumorales humaines utilisées ont plus de 46 chromosomes. Il est possible qu'une différence dans le nombre d'intégration du transgène d'intérêt dans la lignée tumorale aboutirait à ces différentes intensités de fluorescence.

L'obtention de ces lignées permettrait de tester différents outils en cours de développement au sein du laboratoire. En particulier, un outil en cours de mise au point du laboratoire est la NanoBlade (Mangeot et al., 2019). Les NanoBlades sont des pseudo particules virales qui permettent de faire de l'édition génique. Ainsi, il pourrait être intéressant de savoir le nombre de copies à éteindre par lignée pour tester l'efficacité du système.

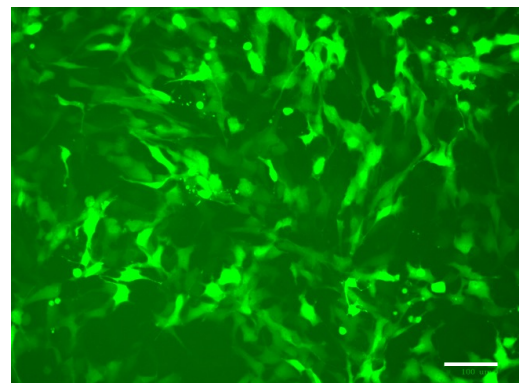
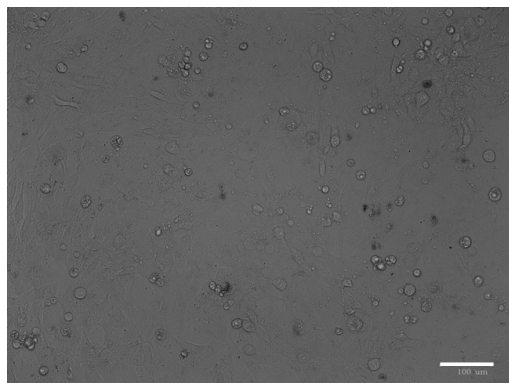
HEK293T



HCT116



T98G



SKmel37

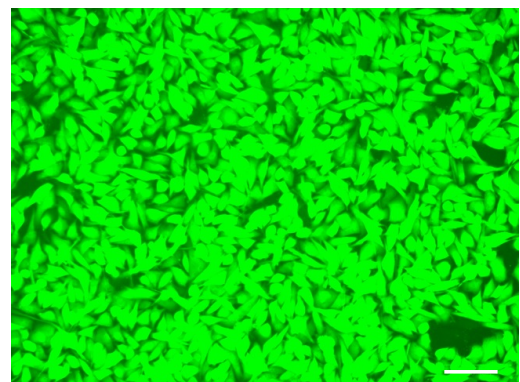
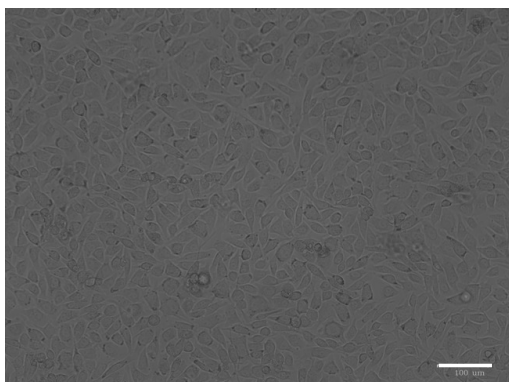


Figure 56 : Insertion de la protéine eGFP dans le locus AAVS1

Les images ont été prises 15 jours après la transfection de chaque lignée par un microscope ZOE Fluorescent Cell Imager au grossissement 20X. La barre d'échelle correspond à 100μm.

2.2.3.3. Stratégie de développement du modèle rapporteur iPSC- GCaMP

Pour ce projet, l'objectif premier était la conception d'une lignée rapportrice GCaMP8m. La lignée choisie pour effectuer les premiers tests est la lignée WT-7889SA, lignée contrôle à partir de laquelle ont été générées les lignées comportant les différentes mutations menant à terme au développement de la maladie d'Alzheimer. Comme évoqué précédemment, les organoïdes sont constitués en début de culture des précurseurs neuronaux. Ces précurseurs se différencient pour aboutir à des neurones à partir de 2 à 3 mois en culture constitués de deux principaux types cellulaires : les neurones et les astrocytes. Pour évaluer l'évolution de la maturation au sein des organoïdes, il a été décidé de cibler les neurones comme type cellulaire permettant d'avoir une idée de leur activité électrophysiologique. Pour restreindre l'expression de la GCaMP aux neurones, le promoteur de la synapsine (NCBI, GeneID 6853) a été choisi pour contrôler l'expression de GCaMP8m. Comme expliqué et mis au point précédemment, l'insertion de ce transgène est prévue dans le locus AAVS1. Une fois générée, la lignée sera caractérisée et la qualité ainsi que la pertinence des informations apportées permettront de déterminer si les autres lignées doivent être également générées.

Une stratégie de clonage a été mise en place pour récupérer le transgène d'intérêt du plasmide pGP-AAV-syn-jGCaMP8m-WPRE par PCR. Des amorces ont été créées pour récupérer la totalité de la séquence d'intérêt auxquels ont été ajoutés les sites de restriction d'intérêt ici SpeI et PacI, répertoriés dans le **Tableau 12**. Les enzymes de restrictions sont présentes en un seul exemplaire sur le plasmide receveur et vont ainsi permettre son ouverture. La stratégie a été établie avec deux enzymes de restriction dont les séquences ne sont pas homologues et ainsi se prémunir du risque de fermeture et d'une ligation du vecteur sur lui-même.

Nom du primer	Séquence du primers
phSyn-GCaMP8m_FWD	ATGCactagtaggaagatctctgcagagggc
phSyn-GCaMP8m_REV	GCGCttaattagcaattggtgtgtaactgtttattgc

Tableau 12 : Liste des primers utilisés pour la construction du plasmide bras d'homologie AAVS1-promoteur synapsine-GCaMP8m

La séquence rouge au sein du primer correspond au site de restriction qui a été ajouté et qui n'est pas homologue de la matrice sur laquelle est réalisée la PCR.

La **Figure 57** représente schématiquement la construction plasmidique souhaitée permettant l'insertion du transgène d'intérêt au sein du locus AAVS1. Pour sélectionner les cellules qui auraient intégré le transgène, le gène de

résistance à la puromycine a été ajouté. La puromycine est exprimée grâce à un promoteur déjà présent sur le locus AAVS1 (Oceguera-Yanez et al., 2016).

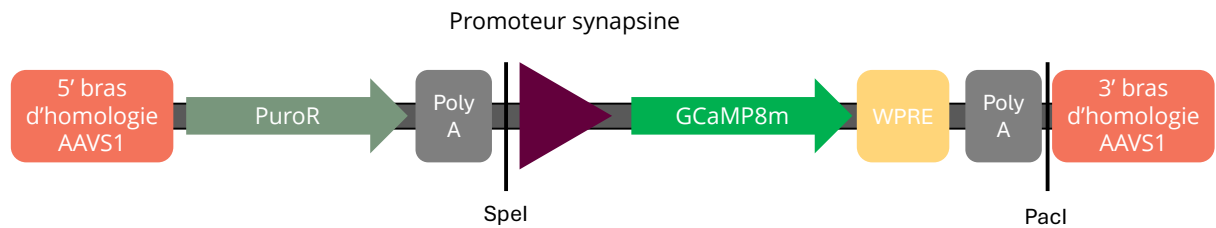


Figure 57 : Design du transgène GCaMP8m

Une stratégie définitive pour la construction de ces nouvelles lignées a été établie. L'établissement de lignées rapportrices dans des cellules iPSCs étant un travail très chronophage, il a été décidé de tester et de valider les différentes étapes. La stratégie de tester le rapporteur a été mise en place grâce à l'infection des organoïdes avec des vecteurs AAV. Cette première étape de validation a été réalisée dans des neurones 2D puis dans des organoïdes cérébraux. Ensuite, il était également important de valider la stratégie d'insertion au niveau du locus AAVS1 sur des modèles simples dans le laboratoire. Cette deuxième étape de validation s'est révélée positive pour les quatre lignées tumorales testées.

Par faute de temps, les lignées rapportrices n'ont pas été générées, une stratégie d'infection virale avec des AAV a été préférée. Les prochaines étapes de ce projet consistent en la construction du plasmide présenté sur la **Figure 57** puis la génération d'une première lignée rapportrice. Cette première lignée test sera réalisé dans une lignée tumorale en parallèle de la lignée iPSCs WT-7889SA.

2.2.4. Mise au point d'un protocole d'utilisation du MEA

2.2.4.1. Matériel et méthode

Les enregistrements électrophysiologiques MEA ont été réalisés dans le milieu aCSF composé de glucose 10 mM (1.8 g pour 1 L), chlorure de sodium 125 mM (7 g for 1 L), Phosphate monobasique de sodium anhydre 1.25 mM (0.119 g for 1 L), chlorure de potassium 2.5 mM (0.23 mg pour 1 L), bicarbonate de sodium 26 mM (2.18 mg pour 1 L), le pH doit être ajusté à 7.3 et l'osmolarité à 290-300 mOsm L⁻¹ avant de compléter le mélange avec ddH₂O pour obtenir 1L de solution.

Les signaux électriques ont été enregistrés à partir d'unités réparties sur de vastes zones de l'organoïde à l'aide du système Stimulo BioCaM Duplex de 3Brain. La puce Stimulo contient 4 096 électrodes disposés en grille 64 × 64 dans un carré de 5,06 × 5,06 mm avec une fréquence d'échantillonnage de 20 kHz et une résolution de 12 bits. La puce possède 16 électrodes de stimulation. Les puces

sont préparées afin que les organoïdes soient placés 3 heures avant l'enregistrement. Les organoïdes sont alors mis dans un mélange de milieu 50% +AR cortical et 50% aCSF dans une atmosphère humide à 37°C avec 5% de CO₂. Avant l'enregistrement, les organoïdes sont placés dans du milieu aCSF avec 1.3 mM de chlorure de magnésium et 2 mM chlorure de calcium. Les enregistrements ont été effectués sur l'organoïde intact à TA dans un dispositif utilisant du Carbogen. BrainWave v.5 a été utilisé pour enregistrer l'activité spontanée pendant 15 minutes.

2.2.4.2. Développement du protocole de MEA

L'évaluation du modèle d'organoïde cortical en développement au sein du laboratoire est importante pour déterminer sa capacité à reproduire les caractéristiques observées chez l'homme. Un aspect clef de cette évaluation est l'exploration de la fonctionnalité de l'organoïde, en particulier son activité électrophysiologique tout au long des phases de développement et de maturation. Cette approche contribue à enrichir notre compréhension du modèle et de ses implications. À cette fin, la technologie des réseaux de multi-électrodes, ou MEA, constitue une méthode efficace pour suivre l'activité électrique des organoïdes cérébraux. Un MEA de la marque 3Brain a été acheté dans le cadre d'un projet collaboratif financé par la FRM par l'équipe de notre collaborateur F. Treussart afin de mesurer l'activité au sein des organoïdes cérébraux. Cet appareil est constitué d'une puce sur laquelle les tranches de cerveaux de souris, des cellules en 2D ou des organoïdes sont placés afin d'enregistrer les activités électriques. Cette puce est ensuite insérée dans un dispositif capable de percevoir des différences de changements électriques et de les enregistrer. Le MEA comporte également des électrodes de stimulation qui vont permettre de stimuler des zones spécifiques de la puce. Le dispositif MEA permet ainsi d'enregistrer des activités électriques spontanées mais également des activités stimulées dans des zones d'intérêt autour des électrodes de stimulation.

La mise au point du protocole est d'abord réalisée sur des coupes fraîches de cerveau de souris, à des fins de contrôle. Trois zones principales du cerveau de souris sont utilisées pour mettre au point le protocole de MEA : le cervelet, le cortex et l'hippocampe qui spontanément ont une activité électrique importante si elles sont maintenues dans des conditions physiologiques. Le

Tableau 13 présente les différents tests réalisés sur souris dans le but de mettre au point le protocole.

Modèle étudié	Age	Précisions sur le modèle_conditions expérimentales	Paramètres d'enregistrement
tranche cortico-hippocampique, cervelet, foie, rein, péritoine	6 semaines		
cervelet cortex	1 an et demi		
cervelet hippocampe	15 jours		filtre 5Hz et 2Hz
cervelet hippocampe	8 semaines	tests avec plusieurs ancrs	
hippocampe	3 semaines	milieu 7mM K ⁺ ; 0,4mM Mg ²⁺ _poids_stimulation électrique	
cortex-hippocampe et hCO	4 semaines	+/-4AP	filtre high pass 5Hz
cortex et hippocampe	7 semaines		filtre 5Hz, 50Hz
cortex et hippocampe	7 semaines		
cervelet-cortex-hippocampe et hCO	4 semaines		filtre 10Hz
cortex et hippocampe	5 semaines	milieu aCSF +/-TTX_+/- 4AP	filtres 5Hz, 10Hz
cortex et hippocampe	4 semaines		filtre 2Hz échantillonnage 10kHz (tranche 3: 50Hz (filtre et échantillonnage 18kHz))
cortex et hippocampe	5 semaines	aCSF +/- Mg ²⁺ 25µM	filtres 2Hz, 3Hz, 4Hz échantillonnage 10kHz
cortex et hippocampe		milieu aCSF +/- Mg ²⁺ 25µM_5ml/min	filtre 5Hz échantillonnage 10kHz
cortex et hippocampe			filtre 5Hz échantillonnage 10kHz

Tableau 13 : Echantillons murins testés sur le MEA sur puce Stimulo 04

Les tranches de cerveaux de souris sont placées directement sur puce, Afin de maximiser le contact entre les tranches et les électrodes, des ancrs sont placées sur la tranche afin de maintenir le contact de manière permanente et optimale. Plusieurs ancrs de poids différents ont été testées afin d'optimiser le contact sans être délétères pour l'échantillon. Différents milieux ont également été testés afin de favoriser l'activité électrique des tranches de cerveaux de souris. Les informations concernant les différentes expérimentations sont disponibles dans le

Tableau 13. Bien que de nombreuses mises au point aient été réalisées afin d'optimiser les enregistrements électriques sur les cerveaux de souris, elles

restent peu concluantes. Les activités spontanées sur les tranches de cervelet restent très faibles par rapport à ce qui est observé habituellement sur d'autres dispositifs de MEA. Le seul moyen d'enregistrer les échantillons à peu près correctement a été de se placer en condition épileptique pour les neurones, ce qui signifie que les neurones sont en « suractivation » permanente. Il a quand même été décidé de faire des tests sur organoïdes cérébraux pour voir s'il était possible de détecter une potentielle activité électrophysiologique.

Les organoïdes étant des structures 3D, déposer l'organoïde avec l'ancre utilisée pour les tranches de cerveaux de souris ne s'est pas révélé optimal pour maintenir un contact étroit avec les électrodes. De nouvelles ancres plus lourdes ont été fabriquées afin de les maintenir correctement en place. Cependant, placer l'organoïde sur la puce et enregistrer immédiatement, comme cela a été fait pour les tranches de cerveau de souris, n'a pas fonctionné. Une optimisation du temps d'incubation permettant à l'organoïde d'établir de bons contacts avec la puce a été réalisée. Les puces commerciales pouvant être directement utilisées comme support de culture cellulaire, différents temps d'incubations ont été testés. Les résultats obtenus indiquent qu'un minimum de 3h à 37°C avec 5% CO₂ est nécessaire pour que le contact entre l'organoïde et la puce se fasse correctement. De plus, les puces étant sensibles à l'humidité, un temps d'incubation de 3h permet de ne pas les endommager et donc de pouvoir les réutiliser pour réaliser plusieurs enregistrements. Une première série d'enregistrements réalisés sur un organoïde WT-7889SA est présentée sur la **Figure 58**. Le panel (A) montre des images d'un organoïde cortical WT-7889SA posé sur une puce. Une ancre est apposée sur l'organoïde pour le maintenir en place et favoriser les interactions avec les électrodes. Il est important que les parties métalliques de l'ancre ne soit pas en contact avec les électrodes pour éviter des artéfacts. L'organoïde a ensuite été fixé et enrobé. La zone encerclée en rouge sur la deuxième image est la zone qui a émis sur le panel (B). Sur le panel (B), les cadres bleus représentent la surface d'électrodes de la puce et des flèches banches ont été placées aux endroits où une activité électrique a été enregistrée. Les graphiques correspondants à un pic d'activité sont montrés. Des signaux électriques sont observables dans l'organoïde WT-7889SA âgé de 4 mois, placé dans un milieu provoquant des signes épileptiques. Cependant, sur les différents organoïdes WT-7889SA testés, seul cet organoïde cortical a montré des signes d'activité électrique.

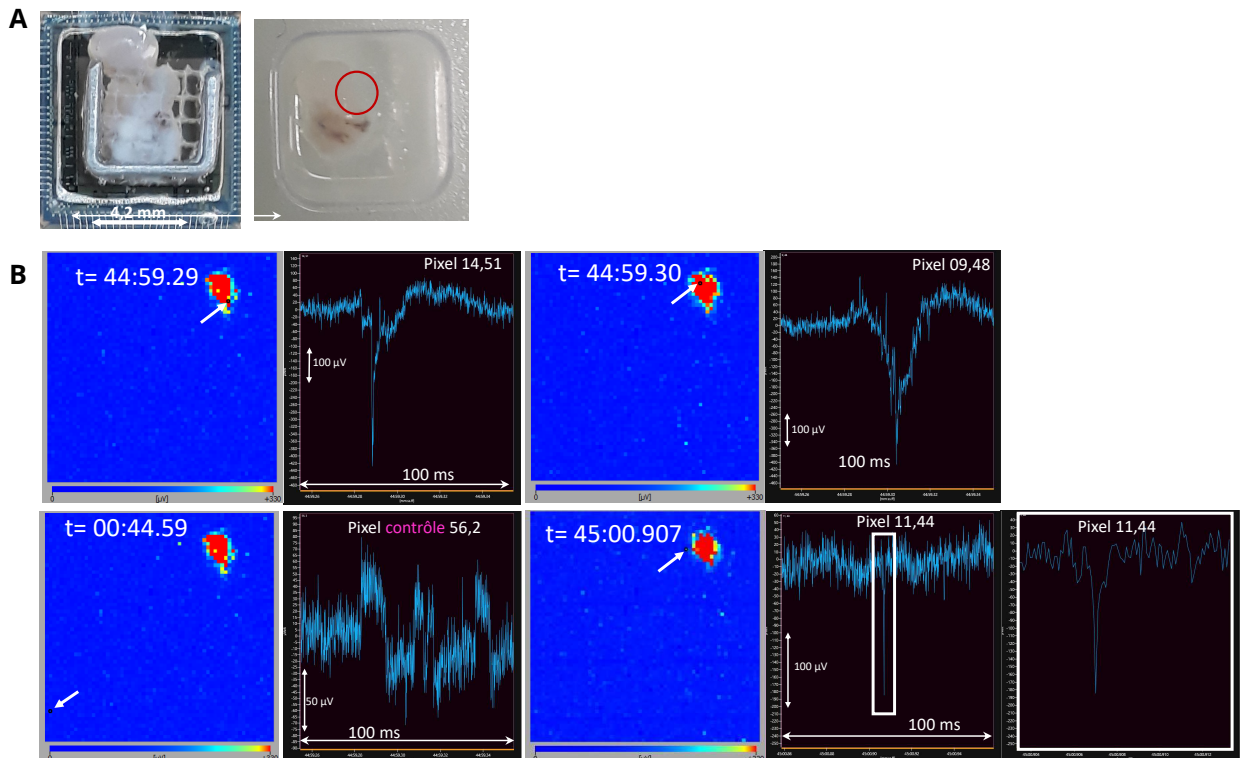


Figure 58 : Résultats d'un enregistrement MEA sur un organoïde WT-7889SA

Résultats obtenus en collaboration avec l'équipe de François Treussart dans le cadre d'un projet collaboratif FRM. Le panel (A) présente des images d'un organoïde WT-7889SA placé sur une puce MEA Stimulo 04. L'image de droite montre ce même organoïde fixé et enrobé. La zone encerclée en rouge sur la deuxième image est la zone qui a émise sur le panel (B). Sur le panel (B), les cadres bleus représentent la surface d'électrodes de la puce et des flèches blanches ont été placées aux endroits où une activité électrique a été enregistrée. Les graphiques correspondants à un pic d'activité sont montrés.

A la suite de ce résultat positif sur un organoïde WT-7889SA, les organoïdes générés à partir des lignées mutées issus de la même production ont été testés afin de vérifier si la présence d'une activité électrique était observable. La **Figure 59** montre un organoïde cortical généré à partir de la lignée APP/PSEN1 Ki âgé de 4 mois. La mise en place de l'organoïde est présentée sur l'image A. Le panel B représente un pixel d'activité électrique que nous avons pu enregistrer et indiqué par une flèche blanche.

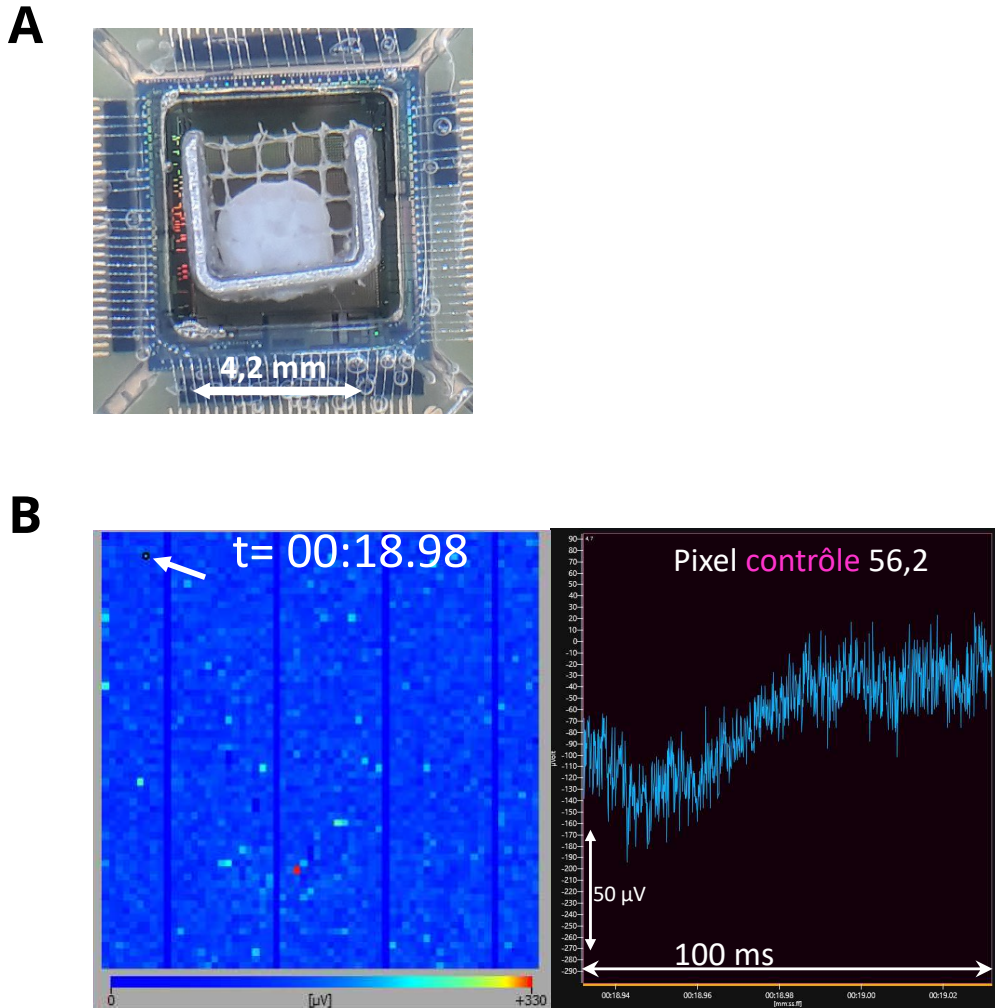


Figure 59 : Résultat d'un enregistrement MEA sur un organoïde APP/PSEN1 Ki

Résultats obtenus en collaboration avec l'équipe de François Treussart dans le cadre d'un projet collaboratif. Le panel (A) représente un organoïde APP/PSEN1 Ki par installé sur une puce MEA Stimulo 04 et maintenu grâce à une ancre. Sur le panel (B), le cadre bleu représente la puce MEA et l'électrode regardée sur le panel de droite est indiquée par une flèche blanche.

Suite aux enregistrements réalisés, pour comparer la composition de l'organoïde en fonction de son activité, des expériences de transcriptomiques spatiales ont été réalisées en collaboration avec l'équipe de Marco Mendoza (Genoscope). Les organoïdes, qui ont été testés avec le MEA, ont été fixés en PFA4% avant d'être enrobés dans de l'OCT (*optimal cutting temperature*). Plusieurs organoïdes ont ainsi été testés en transcriptomique spatiale. Les résultats obtenus sur l'organoïde APP/PSEN1 Ki sont présentés en **Figure 59**. Comme montré sur la **Figure 60 A**, les tranches d'organoïde sont réalisées au cryostat et les tranches 3, 7, 10 et 13 sont placées sur une lame de verre. Le panel (B)

représente sur l'image de gauche les différentes tranches qui ont été analysées en transcriptomique spatiale. Ces différentes tranches sont de nouveau présentes sur l'image de droite. Cette seconde image représente le nombre de lectures réalisées à l'aide d'une sonde structurale et de codes-barres. Le nombre de lectures est représenté par une échelle de couleur bleue pour un petit nombre de lectures allant jusqu'au rouge pour un nombre important de lectures. Suite à l'obtention de ces données, elles sont traitées et analysées sur le panel (C) de la **Figure 60**. Des communautés spatiales ont été identifiées et numérotées de 0 à 21. Le contenu cellulaire de chaque communauté est analysé. Chaque type cellulaire est noté à droite du graphique et plus le type cellulaire est présent, plus le carré blanc (absent) sera rouge (présent). Plus d'une dizaine de groupes identifiés contiennent principalement des cellules cérébrales mais force est de constater que, bien que les organoïdes corticaux soient générés à partir d'un protocole guidé, plusieurs types cellulaires n'appartenant pas à des cellules cérébrales ont été trouvés.

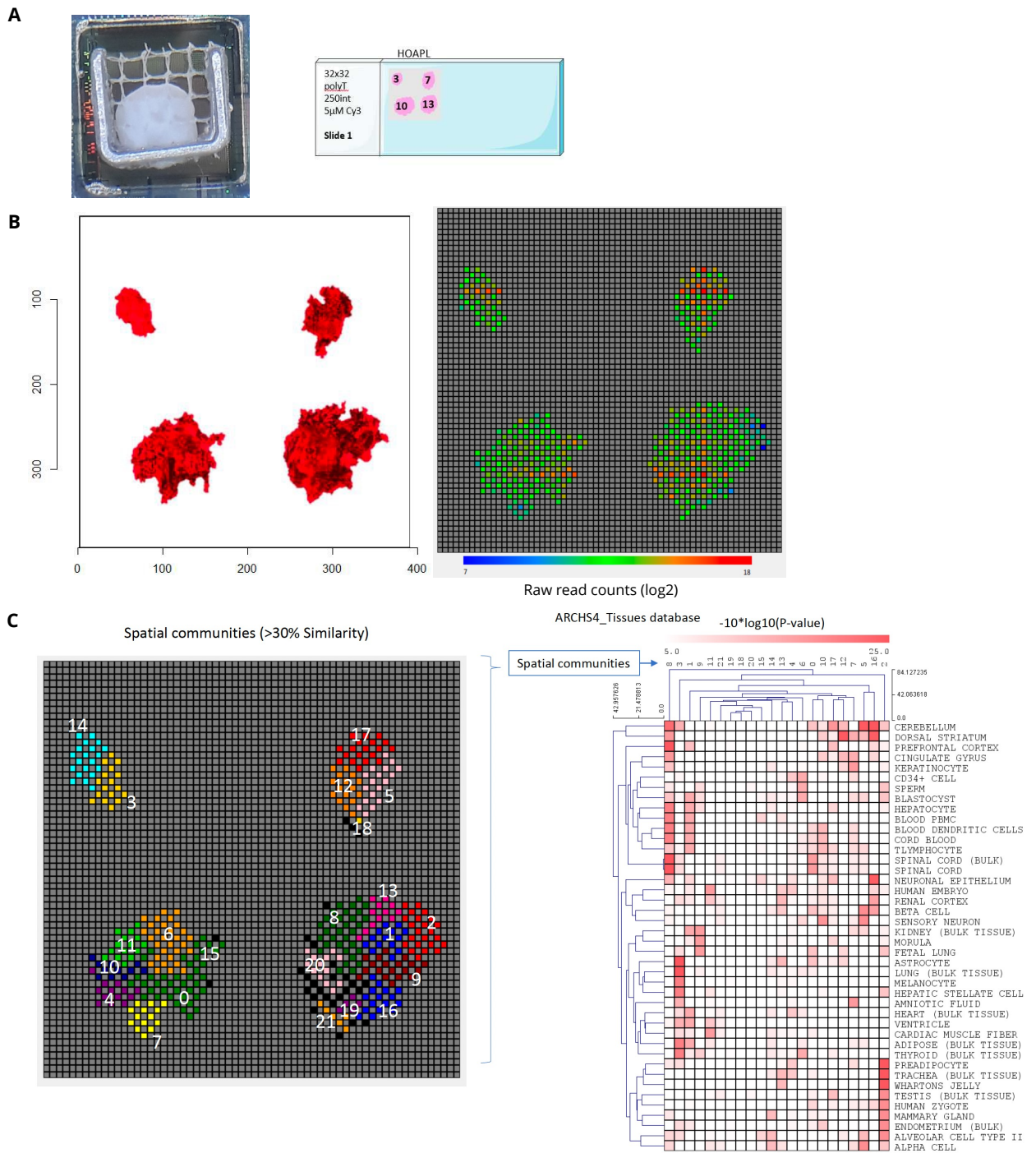


Figure 60 : Représentation illustrative d'une analyse de transcriptomique spatiale d'un organoïde APP/PSEN1 Ki

Analyses réalisées en collaboration avec l'équipe de Marco Mendoza dans le cadre d'un projet collaboratif. Le panel (A) représente l'organoïde APP/PSEN1 Ki qui a été enregistré avec un MEA sur la **Figure 59** avant d'être fixé, enrobé et coupé. 4 coupes à différents endroits de l'organoïde ont été réalisées. Sur le panel (B) l'image de gauche représente les coupes dont les transcrits de chaque cellule ont été lus à plusieurs reprises grâce à des sondes et des codes-barres. Plus le nombre de lecture est important, plus la couleur du pixel est rouge. Le panel (C) représente les 22 clusters

identifiés sur les 4 coupes différentes. Le diagramme de droite représente la répartition cellulaire et tissulaire présente dans chaque communauté identifiée.

Les tests effectués sur des cerveaux de souris et des organoïdes corticaux se sont avérés peu concluants. De plus, les tests réalisés au moyen de la technologie MEA sur des neurones dérivés de cellules progénitrices neurales (NPC) n'ont pas donné de résultats plus probants dans un contexte en 2D. Les résultats obtenus avec le MEA ne nous permettent pas de suivre l'évolution de la maturation des organoïdes corticaux. D'autres optimisations doivent être testées notamment avec l'achat d'un nouveau module comportant de nouvelles puces dont les électrodes ressemblent à des picots. Ces puces seraient un peu plus invasives mais plus sensibles que le dispositif actuel. Cependant, nos résultats remettent réellement en question la sensibilité du MEA 3brain qui semble trop faible pour mener ce type d'expériences.

2.3. Adaptation du protocole d'organoïdes corticaux

2.3.1. Limites du protocole d'organoïdes cérébraux Lancaster

Le protocole de différenciation non guidé d'organoïdes cérébraux déjà établi au sein du laboratoire comporte un avantage principal, à savoir que la plupart des zones présentes dans le cerveau humain peuvent y être retrouvées. Cependant, les organoïdes générés à partir de ce protocole présentent une grande variabilité en terme de taille ou de composition au sein d'une même production ainsi qu'une hétérogénéité importante entre différentes productions.

Plusieurs facteurs ont été décrits comme pouvant augmenter l'hétérogénéité constatée. La non-régionalisation des organoïdes cérébraux, et par conséquent la non-utilisation de molécules permettant l'inhibition de certaines voies ou l'activation d'autres, induit *de facto* une grande variabilité. Le développement de modèle *in vitro* ne permet pas de modéliser aussi fidèlement que possible le neurodéveloppement qui est finement régulé selon des gradients par l'activation et l'inactivation de gènes à des moments précis. Une modélisation d'organoïdes cérébraux avec des gradients précis de molécules et les technologies existantes reste peu envisageable à grande échelle pour le moment. De plus, dans ce protocole de génération d'organoïdes cérébraux, les organoïdes sont enrobés dans une matrice riche en protéines et nutriments qui est extraite de cellules tumorales de souris provenant de la tumeur EHS (Engelbreth-Holm-Swarm) (Hayashi et al., 2004), qui permet un meilleur développement. Plusieurs fournisseurs vendent cette matrice dont les noms les plus connus sont Matrigel ou Geltrex. Cependant, la composition exacte de cette matrice qui entoure

l'organoïde n'est pas connue et varie d'un lot de production à l'autre. S'affranchir de cette matrice pourrait participer à la réduction de l'hétérogénéité.

L'objectif a donc été de développer au sein du laboratoire un protocole d'organoïdes cérébraux permettant de réduire les différences qui peuvent être observées inter et intra-productions. Il a été décidé de s'intéresser à des protocoles guidés qui se concentrent particulièrement à une région spécifique. Différents protocoles permettant la génération de diverses régions ont été publiés. Le cortex cérébral est l'une des régions fréquemment atteintes lors des maladies neurodégénératives, nous nous sommes donc dirigés vers un protocole permettant d'obtenir des organoïdes corticaux.

2.3.2. Développement et mise au point d'organoïdes corticaux

Le protocole mis au point au laboratoire est une combinaison de deux protocoles (Xiang et al., 2017, 2019). Les principales différences avec le protocole de différenciation Lancaster sont les milieux de différenciation qui contiennent d'autres facteurs de différenciation, inhibiteurs de voies de signalisation ainsi que la non-utilisation de Matrigel.

Pour obtenir des organoïdes, les iPSCs sont dissociées en unicellulaire à l'aide d'EDTA (GIBCO, 11580626) pendant 3min puis d'Accutase (SIGMA-ALDRICH, A6964-100ML) pendant 4 min. Après centrifugation, elles sont re-suspendues à une concentration de 900 cellules/ μ L dans du milieu génération de corps embryoides (EBs) composé de DMEM-F12+Glutamax (GIBCO, 11330-032), 15% KOSR (GIBCO, 10828-010), 5 % de SVF (GIBCO, 10270106), 1% de Pen/Strep (GIBCO, 15140-122), 1% de MEM-NEAA (GIBCO, 11140-035), LDN-193189 à une concentration finale de 100nM (STEMCELL, #72147), SB-431542 à une concentration de 10 μ M finale (STEMCELL, #72232), Rock inhibitor à une concentration de 50 μ M finale (STEMCELL, #72304), XAV à une concentration de 2 μ M finale (SIGMA, X3004-5MG). Des gouttes suspendues de 22 μ L contenant 20,000 cellules par goutte sont déposées sur le couvercle d'une B10. Ces gouttes sont incubées à 37°C dans une atmosphère humide avec 5% CO₂. Après 48h d'incubation, les EBs sont récoltés et sont placés dans un puits de plaque P24 dans le même milieu sans SVF. A partir de jour 4, le milieu des EBs est changé tous les deux jours pendant 3 changements de milieu avec le même milieu de génération d'EBs sans SVF et Rock inhibitor. A partir de jour 10, les EBs sont changés avec un milieu d'induction neurale sans acide rétinoïque (-AR) tous les deux jours pendant 4 changements de milieu. Le milieu -AR est composé de 50% DMEM-F12 + GlutaMAX (GIBCO, 10565018), 50% Neurobasal Medium (GIBCO, 21103-049), 1% PenStrep (GIBCO, 15140-122), 1% B27- vitamine A (GIBCO, 12587-010), 0.5% MEM-NEAA (GIBCO, 11140-035), 0.5% N2 supplement 100X (GIBCO, 17502-048), β -

mercaptoéthanol à une concentration finale de 100µM (21985023, Gibco, Grand Island, NY, USA) et insuline humain (SIGMA, I9278-5ML). Enfin à partir de jour 18, les organoïdes sont changés un milieu d'induction neurale avec acide rétinoïque (+AR) tous les deux jours pendant 3 changements de milieu avant de changer le milieu une fois par semaine jusqu'à l'arrêt de la culture. Le milieu +AR est composé de 50% DMEM-F12 + GlutaMAX (GIBCO, 10565018), 50% Neurobasal Medium (GIBCO, 21103-049), 1% PenStrep (GIBCO, 15140-122), cAMP à une concentration finale de 4mM (STEMCELL, #73886), 1% B27 + vitamine A (GIBCO, 17504-044), 0.5% MEM-NEAA (GIBCO, 11140-035), 0.5% N2 supplement 100X (GIBCO, 17502-048), acide ascorbique à une concentration finale de 200µM (SIGMA, A92902-25G), β-mercaptoéthanol à une concentration finale de 100µM (21985023, Gibco, Grand Island, NY, USA), Human Insulin (SIGMA, I9278-5ML) et BDNF à une concentration finale de 20ng/µL (STEMCELL, #78005). Une frise récapitulative du protocole avec les différents changements de milieu est présentée sur la **Figure 61**.

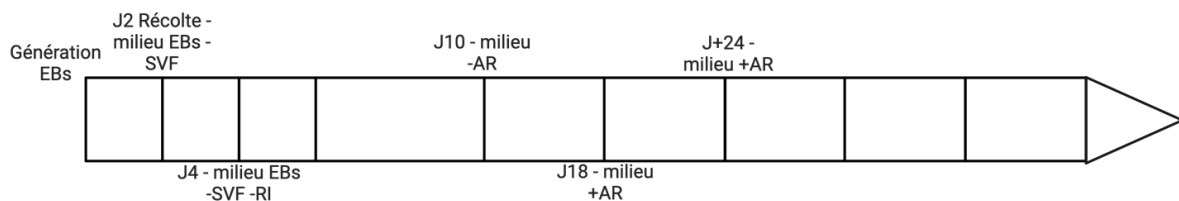


Figure 61 : Frise récapitulative du protocole de génération d'organoïdes corticaux adaptés des protocoles (Xiang et al., 2017, 2019)

Des organoïdes ont été générés à partir des lignées contrôle WT-7889SA, APP Ki, PSEN1 Ki et APP/PSEN1 Ki en utilisant ce protocole. Les résultats des organoïdes obtenus à partir de ce protocole sont présentés dans la partie suivante.

2.4. Mise en place d'un modèle cortical pour la maladie d'Alzheimer

2.4.1. Matériel et méthode

2.4.1.1. Suivi de croissance

A chaque changement de milieu, les corps embryoides ou les organoïdes cérébraux ont été pris en photos grâce à un appareil photo fixé au niveau d'un microscope inversé Leica DMI LED. Les images ont été traitées à l'aide du logiciel Fiji. Une photo de cellule de Malassez est prise avec l'appareil photo comme contrôle pour pouvoir faire une conversion de surface. Les organoïdes sont ensuite détourés à l'aide d'un outil de détourage avant que les mesures soient converties en surface.

2.4.1.2. *Fixation et préparation des échantillons pour des immunofluorescences*

Au temps désiré, les organoïdes sont fixés dans de la PFA4% pendant 2 heures à température ambiante (TA). Les organoïdes sont rincés 3 fois 5 minutes avec du PBS1X. Les échantillons sont ensuite incubés dans une solution de sucrose 30% pendant la nuit puis placés pendant 1h à 37°C en gélatine 7,5% sucrose 15%. Les organoïdes sont ensuite placés dans des petits moules et incubés 10min à 4°C. Les échantillons sont ensuite démoulés et plongés 1min dans une solution d'isopentane (SIGMA-ALDRICH, M32631) et placés dans de la carboglace afin de les congeler. Ils sont alors conservés à -80°C.

Les organoïdes sont ensuite coupés au cryostat (Leica CM3050) en tranches de 16µm. Pour marquer différentes zones d'un organoïde, des séries de 7 coupes mises sur 7 lames différentes sont réalisées. Une fois que ces 7 lames ont une coupe de l'organoïde chacune, une deuxième série est effectuée et ainsi de suite jusqu'à obtenir 7 coupes d'organoïde par lame. Un schéma récapitulatif est présenté sur la **Figure 62**.

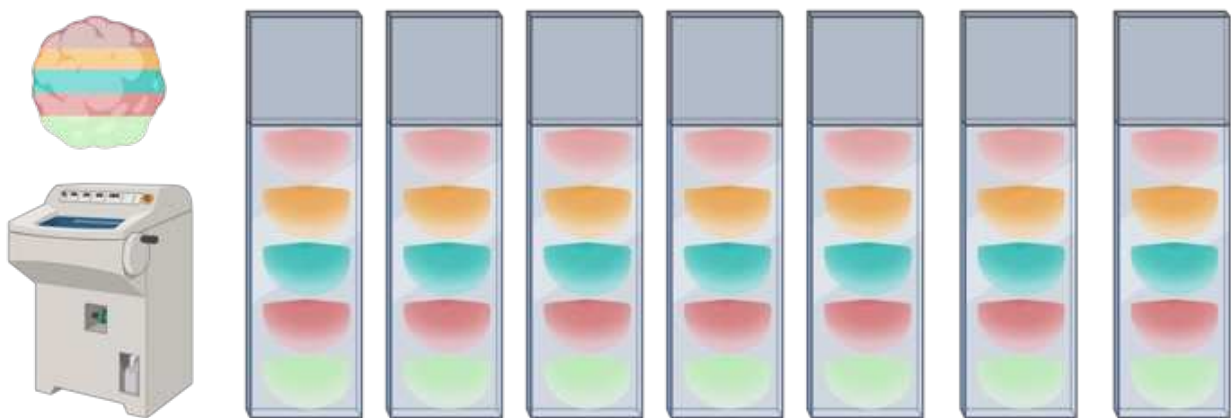


Figure 62 : Schéma explicatif de la réalisation et de la disposition des coupes d'organoïdes au cryostat

Chaque organoïde est coupé au cryostat en réalisant des coupes de 16µm. 7 lames sont générées par organoïde avec différentes régions de l'organoïde présentes sur chacune des lames, symbolisées ici par des tranches de couleurs.

2.4.1.3. *Immunofluorescence*

Les tranches réalisées au cryostat sont démasquées avec une solution de citrate 10 mM et 0,05 % de Tween 20 à pH6 à 95°C pendant 15min. Une deuxième étape de démasquage est réalisée avec une incubation de 2h à TA avec une solution de chlorhydrate de guanidine à 50mM (SIGMA-ALDRICH, 1372725000). Avant les marquer, les lames ont été bloquées avec du PBS 1X (SIGMA-ALDRICH, D8537-6X500ML) 3 % de BSA (SIMGA-ALDRICH, A2153), 1% de sérum de chèvre (SIGMA-ALDRICH, G9023-10ML) et perméabilisées avec 0,25 % de triton X-100

(SIGMA-ALDRICH, X100-1L). Les anticorps primaires ont été incubés pendant la nuit à 4°C, avant d'être lavés trois fois avec du PBS1X. Les anticorps secondaires ont ensuite été appliqués, ainsi que le DAPI, et incubés pendant une heure à TA. Cette étape a été suivie d'une autre séquence de trois lavages au PBS1X. À l'abri de la lumière, les lames ont été séchées et montées. La liste des anticorps primaires et secondaires utilisés est présentée dans le **Tableau 14**. Ces anticorps spécifiques ont été choisis pour la plupart en raison de leur efficacité précédemment prouvée dans d'autres articles (Gonzalez et al., 2018; Lancaster et al., 2013). L'acquisition des images a été réalisée à l'aide d'un microscope Leica Thunder à des grossissements 10X, 20X et 40X. Les signaux de fluorescence ont été enregistrés à quatre longueurs d'onde différentes pour les marqueurs (395, 488, 555, 647 nm). Par la suite, les images ont été analysées à l'aide du logiciel Fiji.

	Type cellulaire / tissu	Antigène	Isotype	Fournisseur	Référence
Marqueurs de la progression de la différenciation	Glie radiaire / astrocytes	GFAP	Lapin PLC	DAKO	Z0334
	Neurones	MAP2	Souris IgG1	BIOLEGEND	801801
Marqueurs de la maladie d'Alzheimer	A β 1-16	6E10	Souris IgG1	BIOLEGEND	803003
Anticorps secondaire		Souris IgG1	Chèvre – AF488	ThermoFisher Scientific	A21121
		Lapin IgG	Chèvre – AF555	ThermoFisher Scientific	A21428

Tableau 14 : Tableau récapitulatif des anticorps utilisés pour les marquages des productions d'organoïdes corticaux Alzheimer

2.4.2. Caractérisation des organoïdes corticaux

Pour l'adaptation du protocole d'organoïdes corticaux, un des plans expérimentaux mis en place sur 6 mois est présenté sur la **Figure 63**. Le même plan expérimental est reproduit sur les autres productions d'organoïdes corticaux générés avec plusieurs lignées WT-7889SA APP Ki, PSEN1 Ki et APP/PSEN1 Ki.

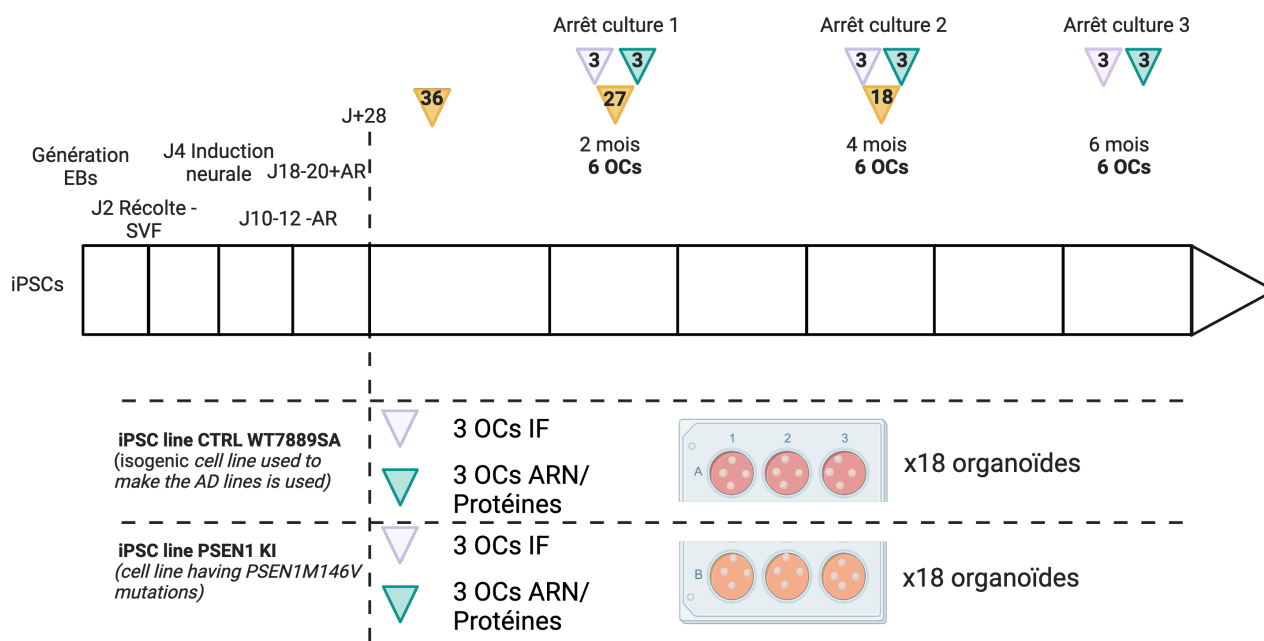


Figure 63 : Plan expérimental d'une production d'organoïdes corticaux sur 6 mois

Les différentes productions qui ont permis le développement et la caractérisation du modèle sont présentées dans le **Tableau 15**. Les trois premières productions d'organoïdes ont été lancées sur 6 mois. Cette durée a été choisie afin d'observer si de la culture à long terme permettrait le développement de signes physiopathologiques de la maladie d'Alzheimer. Le développement de modèles plus adaptés permettrait de reproduire plus facilement les expériences. D'autres productions ont été générées sur 3 mois.

	Production 1	Production 2	Production 3	Production 4	Production 5
Nom des lignées utilisées	WT7889SA PSEN1 KI	WT7889SA APP/PSEN1 KI PSEN1 KI	WT7889SA APP KI PSEN1 KI APP/PSEN1 KI	WT7889SA APP KI PSEN1 KI APP/PSEN1 KI	WT7889SA APP KI PSEN1 KI APP/PSEN1 KI
Temps en culture	6 mois	6 mois	6 mois	3 mois	3 mois
Nombres OCs/lignée	48 organoïdes par lignée	24 organoïdes par lignée	24 organoïdes par lignée	12 organoïdes par lignée	12 organoïdes par lignée
Nombre organoïdes total	96 organoïdes	72 organoïdes	96 organoïdes	48 organoïdes	48 organoïdes

Tableau 15 : Tableau récapitulatif des différentes productions d'organoïdes générées

Un suivi de croissance est réalisé pour surveiller le développement des organoïdes sur des périodes de 3 et 6 mois. Un des suivis de croissance est présenté sur la **Figure 64**. Les organoïdes PSEN1 Ki se développent moins que les organoïdes WT-7889SA. Cette observation a également été faite entre les lignées mutantes (APP Ki et APP/PSEN1 Ki) qui se développent moins vite que la lignée WT-7889SA. On peut cependant noter que ce retard peut être comblé au cours du temps. Les mutations provoquant la maladie d'Alzheimer génèrent des organoïdes plus petits qui pourraient peut-être être apparentés à de la microcéphalie.

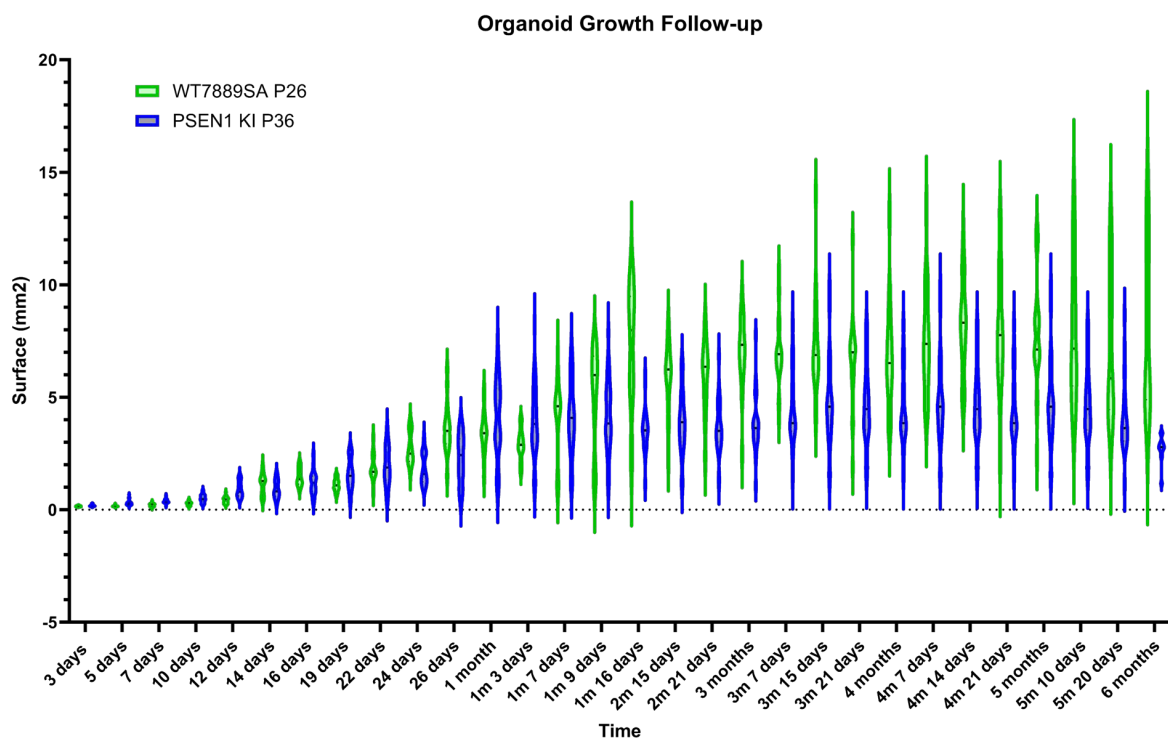


Figure 64 : Suivi de croissance de production d'organoïdes corticaux sur 3 et 6 mois

Une caractérisation plus fine des organoïdes corticaux a été réalisée à l'aide d'immunofluorescence. Une première analyse a été effectuée à l'aide de l'anticorps GFAP, pour identifier les astrocytes, et de l'anticorps MAP2, pour identifier les prolongements neuronaux ou les neurites. Le nombre de marquages réalisé étant important, un choix a été fait de présenter les marquages de lignées WT-7889SA et APP/PSEN1 Ki afin de faciliter la lisibilité. Parmi les trois lignées, la lignée double mutée a été choisie dans l'optique de présenter le phénotype malade susceptible d'avoir le plus de signes physiopathologiques. Sur la **Figure 65**, les deux marquages, MAP2 et GFAP, sont présents dans les deux lignées d'organoïdes dès deux mois de culture et continuent de se développer au cours

de la culture. Les organoïdes sont donc principalement constitués de neurones et d'astrocytes de manière assez homogène. Les premiers résultats de caractérisation des organoïdes corticaux montrent une réduction l'hétérogénéité au sein des organoïdes qui sont plus homogènes que ceux générés avec le protocole de Lancaster.

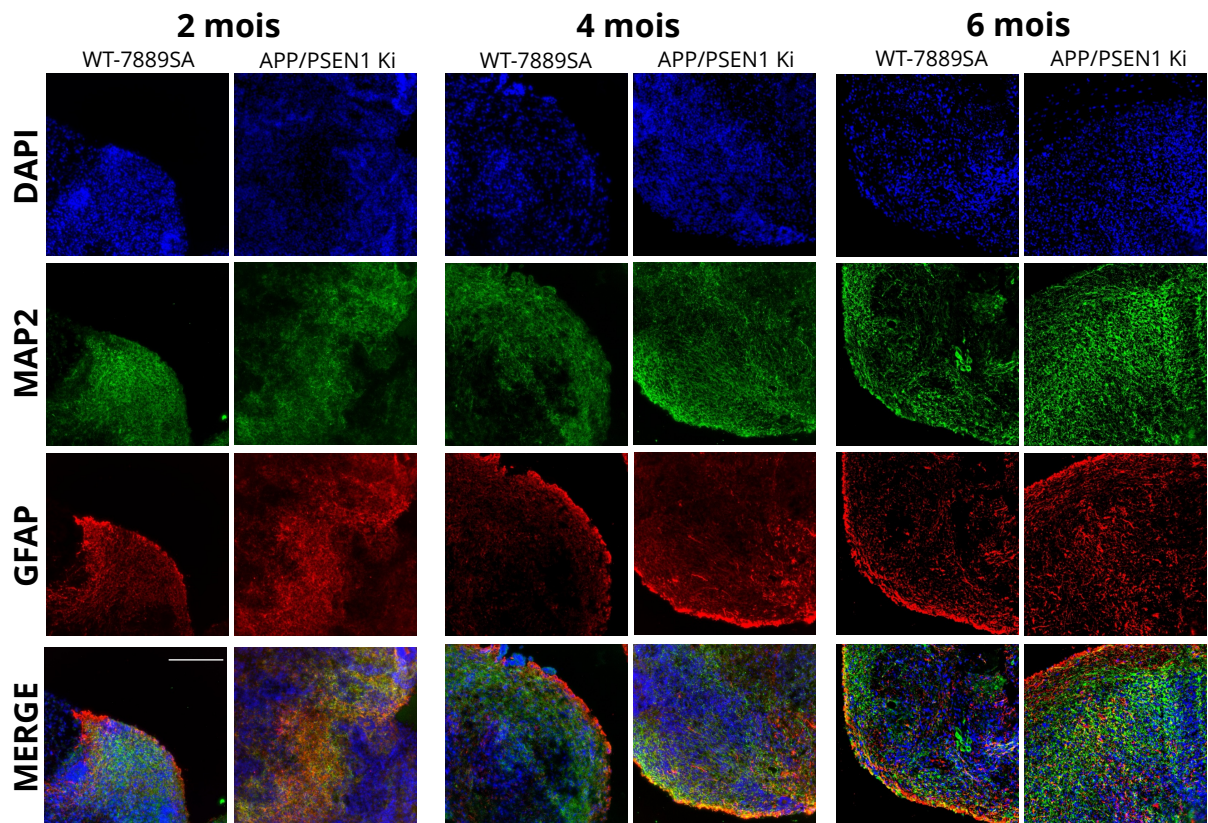


Figure 65 : Images illustratives de caractérisation des organoïdes corticaux au cours du temps avec les marqueurs MAP2 et GFAP

Les immunofluorescences sont réalisées sur des organoïdes WT-7889SA et APP/PSEN1 Ki avec les marqueurs MAP2 et GFAP et imagées avec le microscope Leica THUNDER à un grossissement 20X. La barre d'échelle représente 200µm.

Une deuxième analyse a été réalisée à l'aide de marqueurs de la maladie d'Alzheimer en utilisant l'anticorps 6E10 qui marque la partie 1-16 de la protéine A β . Le choix de cet anticorps a été fait en s'appuyant sur une publication de (Gonzalez et al., 2018). Sur la **Figure 66**, le marquage 6E10 sur les organoïdes âgés de deux mois est peu présent, que ce soit dans les organoïdes WT-7889SA ou APP/PSEN1 Ki. A partir de 4 mois de culture des organoïdes corticaux, la quantité de marque 6E10 augmente considérablement dans les organoïdes APP/PSEN1 Ki et reste peu présente sur la lignée WT-7889SA.

La présence de ce marquage 6E10 en quantité importante se confirme à 6 mois de culture dans les organoïdes APP/PSEN1 Ki. Il faut tout de même noter une petite augmentation du marquage dans les organoïdes WT-7889SA.

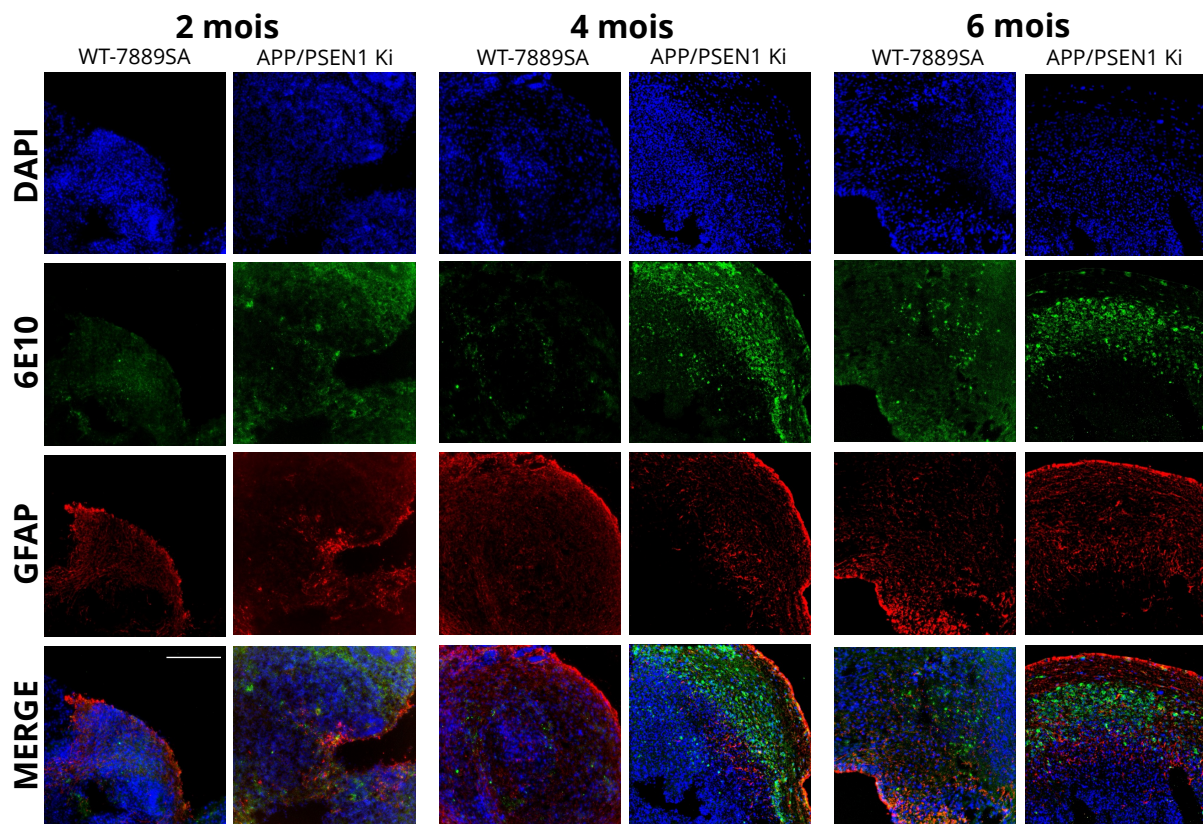


Figure 66 : Images illustratives de l'évolution du marquage 6E10 par immunofluorescence sur des organoïdes corticaux WT-7889SA et APP/PSEN1 Ki au cours du temps

Les immunofluorescences sont réalisées sur des organoïdes WT-7889SA et APP/PSEN1 Ki avec les marqueurs 6E10 et GFAP. La barre d'échelle correspond à 200 μ m.

Les cultures sur le long terme des organoïdes corticaux des lignées portant des mutations induisant la maladie d'Alzheimer montrent une accumulation plus importante de peptide A β que dans les organoïdes WT-7889SA. Les résultats montrent aussi que l'accumulation des plaques A β est visible dès quatre mois de culture. Il serait donc intéressant dans l'optique de faciliter les travaux de recherche, ou, pour développer un modèle à des fins industrielles, de réduire le temps de culture du modèle à 3 mois. Pour potentialiser les effets déjà observés avec la présence des différentes mutations, il a été décidé de traiter les organoïdes avec de l'Aftin-5, une molécule alzheimerogène, afin de permettre une apparition plus rapide de la protéine A β .

2.4.3. Traitement des organoïdes corticaux avec Aftin-5

Dans l'objectif d'optimiser le modèle et d'obtenir un développement pathologique plus rapide, la molécule Aftin-5 a été identifiée lors d'une précédente étude au sein du laboratoire et favoriserait la sécrétion des peptides A β -42 (Pavoni et al., 2018). Le plan d'expérience réalisé sur 3 à 4 productions différentes en fonction des lignées est présenté sur la **Figure 67**. Brièvement, les organoïdes sont traités pendant 7 jours à des concentrations différentes d'Aftin-5 à l'âge d'un mois puis à l'âge de 2 mois. Avant chaque traitement, des échantillons sont fixés puis enrobés pour être marqués et analysés ultérieurement par immunofluorescence.

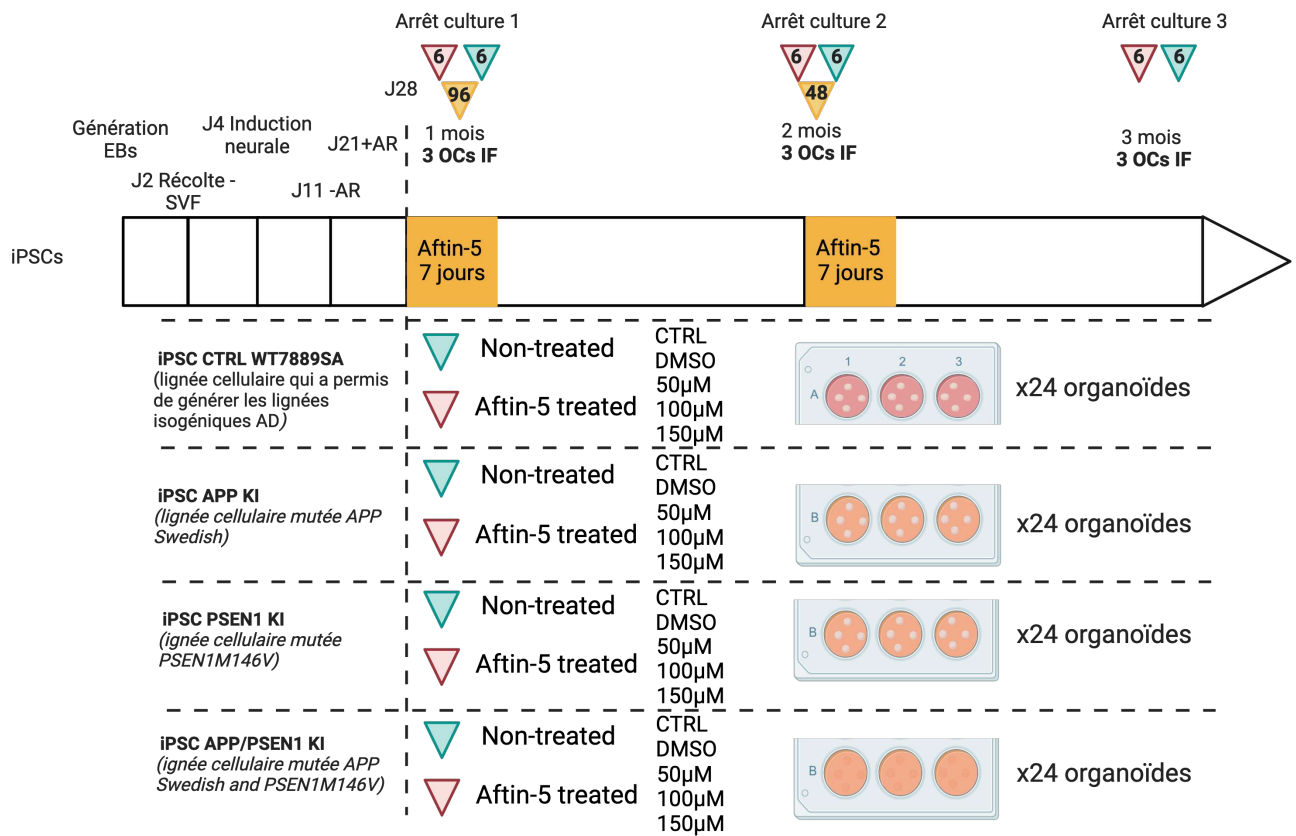


Figure 67 : Plan de manipulation pour la génération d'organoïdes corticaux traités avec de l'Aftin-5

La **Figure 68** présente des images illustratives des résultats obtenus après un premier traitement Aftin-5 d'une semaine, réalisé sur la lignée WT-7889SA et les trois lignées mutées APP Ki, PSEN1 Ki et APP/PSEN1 Ki. Les organites non traités sont présentés en parallèle des organites traités avec 100 μ M d'Aftin-5. Dans les deux conditions présentées, le marquage 6E10 reste assez faible mais augmente dans la condition traitée Aftin-5 par rapport à la condition contrôle.

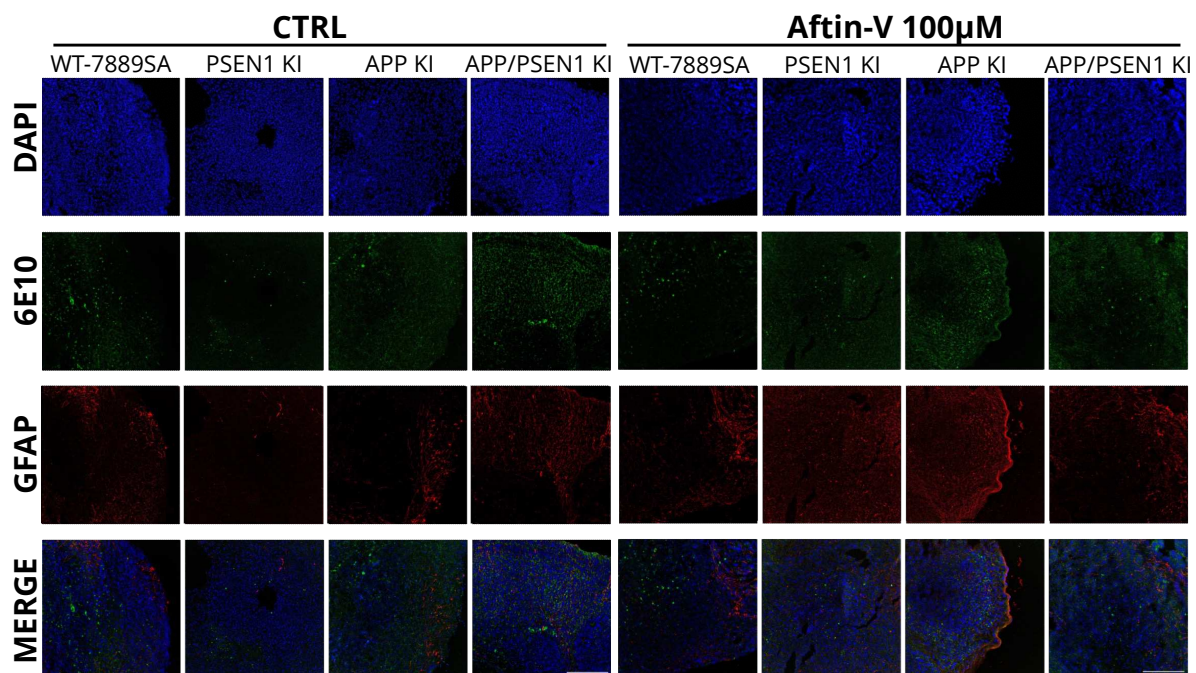


Figure 68 : Images illustratives des marquages 6E10 et GFAP par immunofluorescence sur des organoïdes corticaux WT-7889SA et APP/PSEN1 Ki âgés de 2 mois

La barre d'échelle correspond à 200μm.

Les traitements réalisés sur les différentes productions d'organoïdes corticaux ont montré que les doses croissantes d'Aftin-5 sont délétères sur le long terme. Les organoïdes ont tendance à perdre des cellules et à se désagréger. De plus, la molécule Aftin-5 impacte principalement le développement des astrocytes notamment en termes de quantité mais également au niveau de leur structure. Les neurones, eux, semblent beaucoup moins affectés par le traitement (**Annexe 3**).

Pour avoir une vision globale des résultats de marquage, des représentations graphiques ont été générées et des analyses statistiques réalisées. Ces résultats sont présentés sur les **Figure 70** et **Figure 71**. Les nombres de coupes d'organoïdes, d'organoïdes et de productions utilisées pour générer ces graphiques sont indiqués en-dessous de chacun. Des tests comparatifs ont été menés entre les différents âges d'une même condition en utilisant un test statistique Chi-deux. Ces analyses permettent de déterminer si des différences observées au niveau du marquage 6E10 sont significatives. Les résultats des tests Chi-deux sont ajoutés en dessous de chaque comparaison entre deux graphiques. Pour définir le statut physiopathologique des organoïdes marqués, un seuil a été défini arbitrairement à 5 agrégats par image pour les productions traitées par l'Aftin-5. Si ce seuil est dépassé, le marquage 6E10 de l'image est comptabilisé

comme un marquage positif, dans le cas contraire, comme négatif. Sur les graphiques, un résultat positif est représenté par un remplissage de couleur et un résultat négatif par la couleur blanche. Afin de rendre les résultats le plus compréhensible possible, le nombre de coupes comptabilisé négativement ou positivement a été ramené à un pourcentage de coupes.

La **Figure 69** illustre la technique utilisée pour compter les agrégats amyloïdes béta. Chaque agrégat compté est marqué d'une flèche blanche. Les images (A) et (B) sont des images qui illustrent un nombre d'agrégats inférieur au seuil de 5 agrégats. L'image (C) montre une image sur laquelle le nombre d'agrégats est supérieur au seuil fixé.

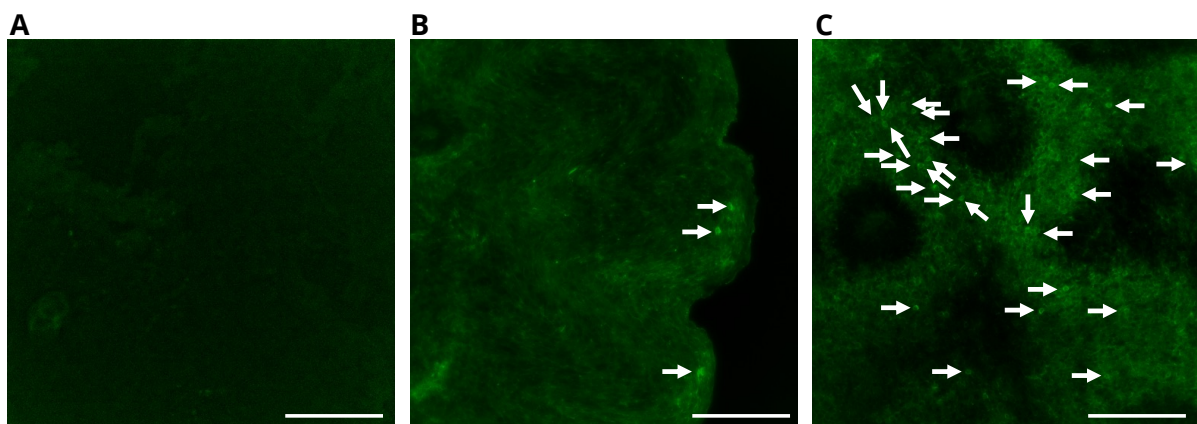


Figure 69 : Images illustratives du comptage des agrégats A β

Les images (A) et (B) montrent des images qui comportent un nombre d'agrégats inférieur à 5. L'image (C) illustre le cas où plus de 5 agrégats A β sont comptés. La barre d'échelle représente 200 μ m.

La **Figure 70** rassemble tous les résultats obtenus sur les productions de 3 mois traitées par l'Aftin-5. Les résultats pour la lignée WT-7889SA sont présentés dans le panel (A), pour la lignée PSEN1 Ki dans le panel (B), pour la lignée APP Ki dans le panel (C) et pour la lignée APP/PSEN1 Ki dans le panel (D). Les profils observés entre les conditions contrôles (CTRL) et DMSO restent similaires dans l'ensemble. Les différences les plus marquantes sont les conditions traitées 100 et 150 μ M d'Aftin-5. A 2 mois pour une concentration de 100 μ M d'Aftin-5, 53% des coupes WT-7889SA, 52% des coupes APP Ki, 70% des coupes PSEN1 Ki et 36% des coupes APP/PSEN1 Ki présentent plus de 5 agrégats. Pour une concentration de 150 μ M d'Aftin-5 à 2 mois, 58% des coupes WT-7889SA, 68% des coupes APP Ki et 100% des coupes APP/PSEN1 Ki présentent plus de 5 agrégats. Pour les résultats à 3 mois à une concentration de 100 μ M d'Aftin-5, 83% des coupes WT-7889SA, 54% des coupes APP Ki, 39% des coupes PSEN1 Ki et 57% des coupes APP/PSEN1 Ki présentent plus de 5 agrégats. Pour une concentration de 150 μ M d'Aftin-5 à 3

mois, 43% des coupes WT-7889SA, 90% des coupes APP Ki et 78% des coupes APP/PSEN1 Ki présentent plus de 5 agrégats.

Les fluctuations du marquage 6E10 entre les différentes conditions restent importantes malgré un nombre de coupes, d'organoïdes et de productions importantes. Augmenter le nombre de répliques en termes de productions, d'organoïdes et de coupes permettrait peut-être de diminuer ces variations.



Figure 70 : Résumé des résultats des immunofluorescences du marquage 6E10 réalisées sur les productions d'organoïdes corticaux WT-7889SA, APPKi, PSEN1 et APP/PSEN1 Ki traitées avec de l'Aftin-5

*Les panels (A), (B), (C) et (D) correspondent aux lignées WT-7889SA, PSEN1 Ki, APP Ki et APP/PSEN1 Ki respectivement. Les diagrammes en secteurs sont séparés en deux parties. La partie colorée correspond au pourcentage du nombre de coupes sur lesquelles un marquage 6E10 supérieur à 5 agrégats a été observé. À l'inverse, la partie blanche sur les diagrammes correspond au pourcentage du nombre de coupes sur lesquelles un marquage 6E10 inférieur à 5 agrégats a été trouvé. Le nombre de coupes est indiqué respectivement par n sous chaque diagramme, le nombre d'organoïdes testés est indiqué par Nb d'OCs et le nombre de production utilisée est indiqué par Nb prod. Les résultats du test Chi-deux compare la fréquence entre les conditions. Pour attester de la significativité des différences observées une barre est présente sous chaque graphique avec : ns : non-significatif | * : p-value<0.05 | ** : p-value<0.01 | *** : p-value<0.001 | **** : p-value<0.0001.*

Les résultats obtenus sont intéressants mais la vision reste complexe et ne permet pas de confirmer la concentration optimale pour le traitement Aftin-5 à ces concentrations. Une comparaison entre les organoïdes générés avec la lignée WT-7889SA et les lignées mutées APP Ki, PSEN1 Ki et APP/PSEN1 KI plus complète serait nécessaire pour pouvoir conclure. Le choix de présenter les résultats de la comparaison entre les organoïdes WT-7889SA et les organoïdes APP/PSEN1 Ki a été fait, car cette lignée comporte le plus de marques susceptibles de produire un phénotype Alzheimer. Cette comparaison est présentée sur la **Figure 71**. Les organoïdes WT-7889SA et APP/PSEN1 Ki ont été comparés à deux et trois mois. À 2 mois pour les organoïdes de la condition contrôle, 25% des coupes chez WT-7889SA présentent plus de 5 agrégats alors qu'il n'y en a pas chez le mutant. Cette différence n'est plus observable sur les organoïdes de 3 mois.

Les principales différences sont observables entre les organoïdes WT-7889SA et APP/PSEN1 Ki pour les conditions de traitement 50 et 150 μ M d'Aftin-5. À partir de 2 mois pour la condition 50 μ M, une augmentation significative du nombre d'agrégats entre les organoïdes WT-7889SA et APP/PSEN1 Ki. Pour la condition 2 mois traitée avec 150 μ M, 100% des coupes observées sur les organoïdes APP/PSEN1 Ki présentent plus de 5 agrégats contre 58% pour les organoïdes WT-7889SA. Enfin, bien que la différence entre les organoïdes WT-7889SA et APP/PSEN1 Ki ne soit pas significative pour la condition de traitement 100 μ M, plus de 50% des coupes présentent plus de 5 agrégats 6E10.

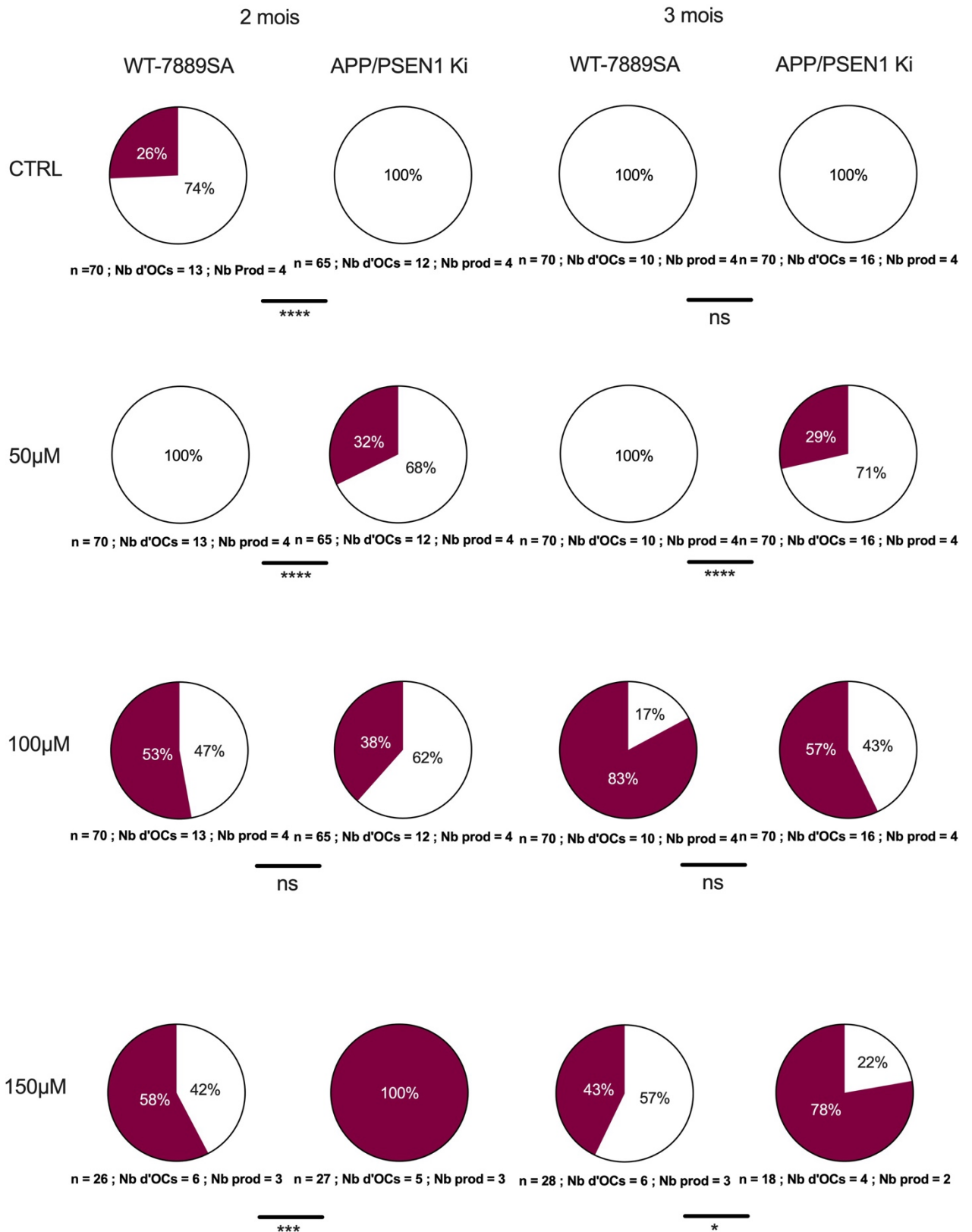


Figure 71 : Comparaison des données obtenues par immunofluorescence du marquage 6E10 entre les productions d'organoïdes corticaux WT-7889SA et APP/PSEN1 KI à 2 et 3 mois de culture

*Les diagrammes en secteurs sont séparés en deux parties. La partie colorée correspond au pourcentage du nombre de coupes sur lesquelles un marquage 6E10 supérieur à 5 agrégats a été observé. A l'inverse, la partie blanche sur les diagrammes correspond au pourcentage du nombre de coupes sur lesquelles un marquage 6E10 inférieur à 5 agrégats a été trouvé. La taille des échantillons est indiquée respectivement par n sous chaque diagramme, le nombre d'organoïdes testés est indiqué par Nb d'OCs et le nombre de production utilisé est indiqué par Nb prod. Les résultats du test Chi-deux compare la fréquence entre les conditions. Pour attester de la significativité des différences observées une barre est présente sous chaque graphique avec : ns : non-significatif | * : p-value<0.05 | ** : p-value<0.01 | *** : p-value<0.001 | **** : p-value<0.0001.*

Les productions d'organoïdes corticaux révèlent des variations significatives dans l'expression de la protéine A β au fil du temps. Dans nos premières cultures, réalisées sur une durée de 6 mois sans traitement à l'Aftin-5, nous avons observé un marquage 6E10, indiquant la présence de peptides amyloïdes, à partir du quatrième mois de culture, avec une intensité accrue à 6 mois. Ces résultats confirment que les organoïdes cultivés sur une période prolongée peuvent développer des caractéristiques associées à la maladie d'Alzheimer, telles que l'accumulation d'A β .

En revanche, dans les cultures d'organoïdes corticaux traitées pendant 3 mois avec différentes concentrations d'Aftin-5, nous avons noté des signes de cytotoxicité dès 100 μ M, ce qui a provoqué une dégradation structurelle des organoïdes, les rendant fragiles et susceptibles de se désagréger. Toutefois, malgré ces effets toxiques, l'Aftin-5 a réussi à induire une augmentation significative du marquage 6E10 au cours du temps, démontrant son efficacité à stimuler l'accumulation d'A β .

Lorsque nous comparons les organoïdes de 6 mois sans traitement avec ceux de 3 mois traités à l'Aftin-5, nous constatons que les premiers présentent une quantité de marquage 6E10 nettement plus importante. Cela suggère que la durée de culture continue de jouer un rôle crucial dans la progression de la pathologie, mais il est essentiel de mener de nouvelles expériences pour évaluer si ces différences sont dues à des variations entre les différentes productions d'organoïdes.

Pour optimiser ce modèle, il sera nécessaire d'ajuster plusieurs paramètres, notamment la durée d'exposition à l'Aftin-5 (par exemple, 48 ou 96 heures), la fréquence des traitements (tous les 15 jours ou tous les mois), et la prolongation du temps de culture de 3 à 4 mois. Ces ajustements devraient permettre d'obtenir un modèle plus robuste et fiable pour modéliser la maladie d'Alzheimer.

2.4.4. Conclusion générale

Le développement d'outils pour permettre une caractérisation phénotypique et fonctionnelle des organoïdes corticaux au cours de l'évolution pathologique de la maladie d'Alzheimer est compliqué par la maturation ralentie des organoïdes obtenus à partir de cellules pluripotentes. Une approche pour moduler la maturation des organoïdes pourrait consister à forcer l'expression de certains gènes impliqués dans le neurodéveloppement ou le vieillissement. Par exemple, le développement du protocole de différenciation de neurones 2D grâce à l'expression de la neurogénine 2 a permis de d'obtenir des neurones matures en seulement 3 semaines en s'affranchissant de l'étape de différenciation iPSCs en NPCs. Les neurones ainsi générés, tout comme les organoïdes corticaux, ont pu être utilisés afin de mettre au point différents tests de fonctionnalité : Fluo-4, infection GcaMP et MEA. L'utilisation de Fluo-4 et de GCaMP pour mesurer l'activité calcique fonctionnelle des neurones a permis de montrer que les organoïdes, à partir de plusieurs mois de culture, atteignent un degré de maturation suffisant pour avoir une activité fonctionnelle mesurable. La prochaine étape consisterait à établir des lignées rapportrices GCaMP qui permettraient de suivre de manière plus fine, et longitudinale au cours de la culture, l'évolution des flux calciques. Les mesures de l'activité électrophysiologique à l'aide du MEA n'ont pas permis d'obtenir des résultats satisfaisants. Les résultats obtenus sur des contrôles (tranches de cerveaux de souris, neurones en 2D, organoïdes corticaux) n'ayant pas donné de résultats positifs, d'autres mises au point et optimisations restent encore à faire pour utiliser le MEA en routine afin de suivre l'évolution de l'activité des organoïdes.

L'adaptation du protocole d'organoïdes permet de réduire l'hétérogénéité en termes de taille et de composition entre les organoïdes et les différentes productions. La mise en place de lignées ayant le même fond génétique permet de réduire le nombre de variables et ainsi se concentrer uniquement sur l'apparition des signes physiopathologiques.

Le protocole d'organoïdes corticaux utilisé dans cette étude a permis de détecter des signes physiopathologiques de la maladie d'Alzheimer à partir de 4 mois sur des lignées portant les mutations familiales PSEN et APP. Dans l'optique de développer un modèle adapté à une utilisation industrielle, il serait souhaitable de réduire le temps de culture des organoïdes tout en maintenant les caractéristiques pathologiques observées. Pour favoriser l'apparition de ces phénotypes sur des périodes de culture plus courtes, l'utilisation de molécules alzheimerogènes, comme l'Aftin-5, a été envisagée, en continuité avec une étude précédente menée par Pavoni et al. au sein du laboratoire.

Nous avons conçu un protocole basé sur un traitement de 3 mois avec l'Aftin-5 à différentes concentrations, dans le but d'accélérer l'apparition des signes physiopathologiques caractéristiques de la maladie. Les traitements à l'Aftin-5 avaient pour objectif de potentialiser les effets des mutations introduites afin de mieux induire la pathologie. Les organoïdes, traités avec cette molécule ont montré une augmentation progressive du marquage 6E10 au cours du temps. L'ajout d'Aftin-5 a effectivement potentialisé ces effets, notamment dans les organoïdes issus de la lignée double mutée, où l'augmentation du marquage a été plus forte. Cependant, des effets cytotoxiques ont été observés à partir d'une concentration de 100 μ M après 7 jours de traitement.

Pour conserver l'effet potentialisateur de l'Aftin-5 tout en réduisant sa cytotoxicité, plusieurs ajustements pourraient être testés. Par exemple, un traitement chronique à faible dose pourrait être appliqué en continu à partir de 1 mois. Une autre possibilité serait de tester certaines doses avec une durée de traitement plus courte, afin de vérifier si l'effet d'augmentation du fragment protéique A β 42 est maintenu tout en minimisant les effets toxiques. Enfin, d'autres molécules, reconnues pour leur potentiel alzheimerogène plus important que l'Aftin-5, pourraient également être évaluées dans ce contexte.

L'utilisation du marquage 6E10 dans cette étude a permis de suivre l'accumulation de la protéine A β , mais ce marqueur pourrait être complété par d'autres marqueurs pathologiques pour obtenir une vision plus complète des processus impliqués dans la maladie d'Alzheimer, tels que les enchevêtrements de la protéine tau hyperphosphorylée ou les marqueurs d'inflammation gliale. Cependant, un travail de cette ampleur, nécessitant l'analyse de multiples paramètres pathologiques, serait relativement lourd : c'est pourquoi l'utilisation de systèmes d'imagerie automatisée serait utile pour mener à bien ces études. Non seulement cela permettrait d'accélérer considérablement le processus d'analyse, mais cela offrirait aussi une précision et une reproductibilité accrues. De plus, l'automatisation de l'imagerie et de l'analyse des organoïdes serait un atout majeur pour l'industrie, facilitant le développement de modèles standardisés pour le criblage à haut débit de nouvelles thérapies.

Discussion

L'objectif de cette thèse a consisté à évaluer la pertinence de l'utilisation d'organoïdes cérébraux pour modéliser à la fois des pathologies neurodéveloppementales et neurodégénératives. Les résultats obtenus pour le syndrome MARCH et la maladie d'Alzheimer montrent que ces modèles reproduisent des phénotypes caractéristiques des deux maladies, confirmant leur utilité pour l'étude des mécanismes pathologiques. Cependant, des limitations subsistent, nécessitant des améliorations pour maximiser leur potentiel en recherche biomédicale.

1. Modélisation d'une pathologie neurodéveloppementale : le syndrome MARCH

Ce travail est le fruit d'une étroite collaboration avec le Dr. Mikaël Boullé (équipe de F. Agou à l'Institut Pasteur). Au début de cette collaboration, les seuls modèles d'étude pour la maladie de MARCH étaient les fibroblastes prélevés sur les patients et les modèles animaux, qui ne récapitulent pas tous les aspects de la pathologie. Ce travail a permis de développer un modèle d'étude unique permettant de modéliser les symptômes atteignant le développement du cerveau. Ce modèle est unique car le premier utilisant des amniocytes de patients atteints du syndrome MARCH reprogrammés à l'aide du virus de Sendai en iPSCs. La génération et la caractérisation de ces deux nouvelles lignées iPSCs ont fait l'objet de deux publications et les cellules ont été mises à disposition dans la banque de cellules de l'Institut Pasteur afin que d'autres équipes puissent les utiliser.

Au début de cette thèse, les modèles existants pour le syndrome MARCH étaient basés sur des cellules primaires de patients et des modèles animaux. Seule une publication avait exploré le potentiel ouvert par les cellules pluripotentes afin d'obtenir des neurones humains *in vitro*, pour étudier les effets de la protéine CEP55 au cours du neurodéveloppement humain (Rashidieh et al., 2021). Dans cet article, des cellules souches embryonnaires humaines (HES3) ont été utilisées pour obtenir des organoïdes corticaux afin d'apporter une compréhension plus importante sur l'implication de la protéine CEP55 au cours de la neurogenèse. L'approche choisie par ces auteurs a consisté à générer des organoïdes cérébraux obtenus à partir de cellules non porteuses de mutation pathologique, dont la fonction pathologique était introduite par une expression transitoire de siRNA ciblant le transcrit de CEP55 à l'aide d'un adénovirus. L'approche de ces auteurs a

permis de confirmer que la protéine CEP55 joue des rôles multiples, que ce soit dans la régulation de la voie PI3K/Akt, le maintien de la pluripotence, la stabilité génomique ou encore la progression dans le cycle cellulaire. Dans cette étude, le protocole utilisé (Rashidieh et al., 2021) pour générer les organoïdes est un protocole de différenciation guidé, destiné à obtenir uniquement du cortex. De plus, le ciblage cellulaire par adénovirus effectué n'est pas homogène puisqu'une partie des cellules continue à exprimer la protéine CEP55, présenté sur la **Figure 72** Panels (A) et (B). Cette étude par knockdown dans les organoïdes cérébraux permet d'observer que la quantité de cellules progénitrices marquées avec l'anticorps PAX6 et neurones marqués avec l'anticorps TUJ1 est considérablement réduite dans les organoïdes KD-CEP55, et une augmentation significative de la mort cellulaire est mesurée (caspase-3 clivée) (Panels C-H, **Figure 72**).

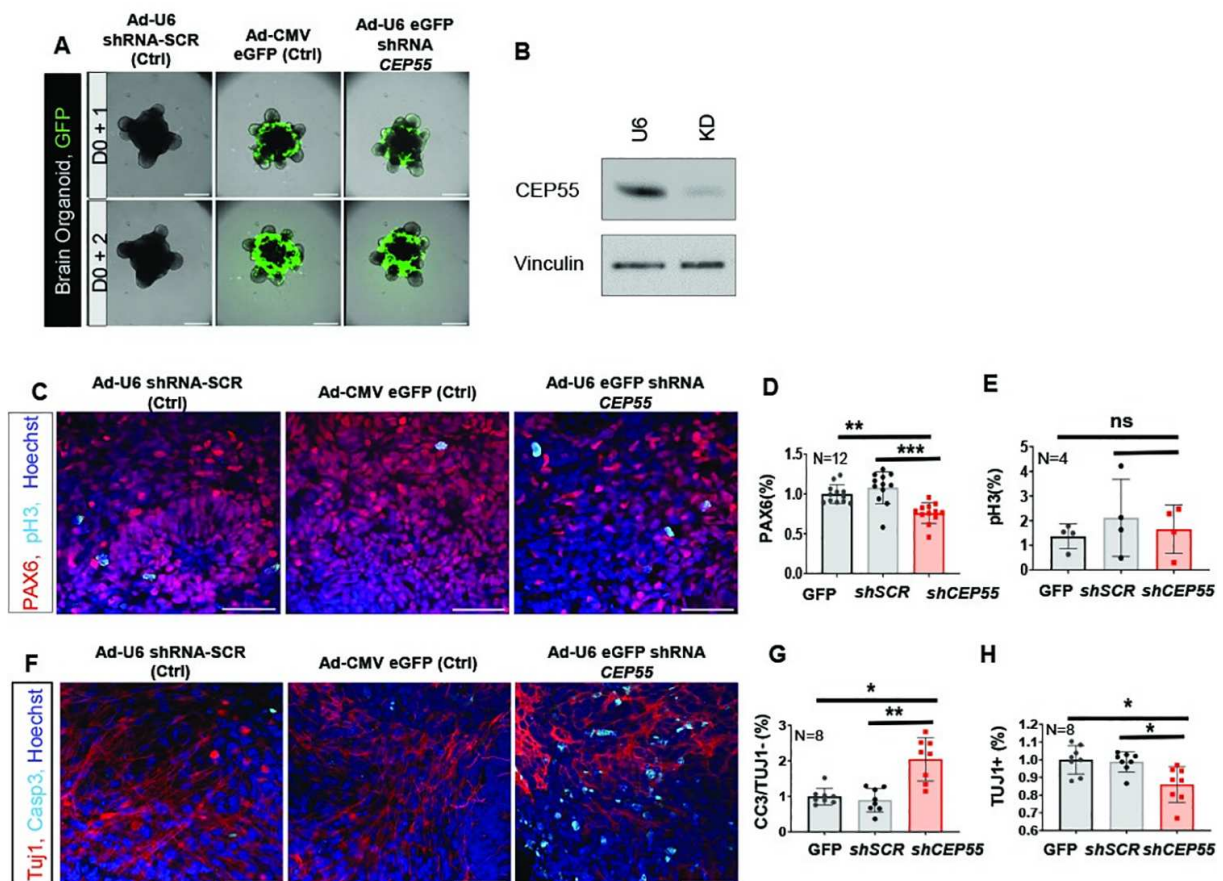


Figure 72 : Le knockdown de la protéine CEP55 induit une mort cellulaire dans les cellules progénitrices neurales au sein des organoïdes corticaux
Organoïdes infectés avec trois adénovirus différents (contrôle, GFP, shRNA CEP55). A 48h post-infection, la quasi-totalité des organoïdes sont infectés par l'adénovirus. Panel B : Western Blot sur les cellules contrôles shRNA CEP55 48h après infection. Figure extraite de (Rashidieh et al., 2021).

Dans le cadre de notre projet, nous avons choisi une approche totalement différente, plus homogène et proche de la physiopathologie humaine. Celle-ci consiste à utiliser des cellules de patients, porteuses d'une mutation causant le syndrome MARCH. Pour cela, des cellules (amniocytes) de fœtus non-viables, possédant la mutation originale ont été reprogrammés, en collaboration avec notre équipe. A l'aide de ce modèle, en contraste avec l'étude de Rashidieh, la totalité des cellules dérivées de ces cellules iPS portent la mutation dans le gène causant la pathologie (CEP55), permettant donc de récapituler ce qui se passe physiologiquement.

Les iPSCs obtenues ont été utilisées pour générer des organoïdes cérébraux suivant le protocole de différenciation « non guidé » de (Lancaster et al., 2013; Lancaster & Knoblich, 2014). Les organoïdes générés ont permis de mesurer une microcéphalie, reproduisant en partie le symptôme d'hydranencéphalie, que ne développaient pas les modèles animaux. Cette étude est la première récapitulant cette pathologie à partir de cellules de patients permettant ainsi d'étudier les mécanismes physiopathologiques de la maladie. De plus, l'obtention d'une lignée contrôle isogénique par « édition génique », à l'aide de l'outil CRISPR-Cas9 a permis de démontrer le rôle de CEP55 dans le développement de la pathologie. L'établissement de cette lignée isogénique a bien permis de prouver la restauration du développement des organoïdes issus de cette lignée.

L'Institut Pasteur continue de conduire sur les organoïdes cérébraux générés une étude fine sur les mécanismes moléculaires en jeu dans les cellules neurales de patients MARCH. De plus, en tirant partie du potentiel, à partir des cellules IPS, de dériver d'autres tissus, nous avons pu débiter la démonstration que la mutation présente dans le gène CEP55 n'affecte pas le développement d'autres tissus. La mise au point d'un protocole de différenciation en cardiomyocytes a été finalisée et de premières mesures fonctionnelles (fréquence de battement) ont été effectuées, mais ces expériences, encore en cours, doivent être complétées par de la caractérisation phénotypique par immunomarquage.

Nos collaborateurs cherchent désormais à comprendre les mécanismes impliqués dans la pathogénèse : notamment, concernant un domaine particulier identifié sur la protéine CEP55 qui pourrait être impliqué directement dans les différents mécanismes de pathogénèse.

2. Modélisation d'une pathologie neurodégénérative : la maladie d'Alzheimer

Depuis plusieurs décennies, de nombreux modèles ont été développés pour tenter de reproduire les différents aspects de la maladie d'Alzheimer. Ces modèles visent à mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la progression de la maladie. En plus de fournir des connaissances approfondies, un modèle pertinent offrirait une plate-forme idéale pour identifier de nouvelles cibles et tester des molécules thérapeutiques.

Pour récapituler les caractéristiques de la maladie d'Alzheimer chez l'animal, telles que l'accumulation de plaques amyloïdes ou les enchevêtrements neurofibrillaires de la protéine tau, des variants génétiques des protéines impliquées dans la pathologie ont été introduits chez la souris. Toutefois, pour obtenir un phénotype proche de la maladie humaine, plusieurs mutations doivent souvent être combinées, car il n'existe pas d'équivalent de la maladie d'Alzheimer chez les animaux, ce qui peut interroger sur la pertinence du modèle. Même dans ces conditions, les modèles animaux ne parviennent pas à récapituler complètement la maladie d'Alzheimer (MA), à en reproduire les caractéristiques complexes, notamment la dégénérescence neuronale progressive, l'inflammation chronique ou le déclin cognitif de manière aussi prononcée que chez les patients humains. De plus, l'absence de la MA naturelle chez les animaux peut créer des biais dans l'étude des mécanismes pathologiques et des réponses aux traitements. Par conséquent, bien que les modèles animaux aient contribué de manière significative à la compréhension de certains aspects de la MA, ils restent insuffisants pour reproduire la totalité des mécanismes impliqués dans la maladie humaine.

Bien que l'origine humaine des modèles d'organoïdes cérébraux constitue un atout majeur par rapport aux modèles animaux, les organoïdes cérébraux restent nettement moins complexes. Cette simplification peut affecter la qualité du modèle en omettant des éléments clés de la pathogénèse, susceptibles d'influencer notre compréhension des mécanismes impliqués dans la maladie.

Dans cette étude, nous nous sommes focalisés sur trois paramètres influençant le développement pathologique de la maladie d'Alzheimer, a) la présence de mutations familiales, b) l'âge et la maturation des organoïdes, ainsi que c) l'effet du traitement par Aftin-5, une molécule favorisant la production de la forme A β 42, un marqueur caractéristique de la maladie.

Nos résultats montrent que l'Aftin-5, à des concentrations de 100 μ M et 150 μ M, induit une augmentation significative des agrégats A β 42 dans les organoïdes, cette réponse variant en fonction des lignées étudiées. Pour la lignée non pathologique WT-7889SA, nous avons observé que 83 % des organoïdes

présentent plus de cinq agrégats 6E10 après 3 mois de traitement à 100 μ M d'Aftin-5, alors que des organoïdes non traités ne possèdent pas d'agrégats à cet âge, les agrégats A β marqués grâce à l'anticorps 6E10 n'apparaissent dans ce modèle qu'à partir de 4-6 mois.

Dans les lignées mutées pour les gènes APP et PSEN1, le traitement par Aftin-5 a un effet plus marqué et semble potentialiser l'effet de la mutation. Par exemple, 90 % des organoïdes APP Ki présentent plus de cinq agrégats à 150 μ M après 3 mois, tandis que cette proportion atteint 100 % dans la lignée double APP/PSEN1 Ki à 2 mois.

L'effet de l'Aftin-5 sur les organoïdes cérébraux peut être comparé à un effet « accélérateur » sur l'apparition des agrégats dans les organoïdes les plus jeunes. Cependant, il est à noter qu'en termes de nombre d'agrégats, le traitement à l'Aftin-5 ne permet pas d'obtenir autant d'agrégats que la culture à long terme en présence de mutations APP ou PSEN1. L'Aftin-5, malgré ce rôle d'accélérateur, ne pourra donc pas, à elle seule, se substituer à d'autres facteurs clefs comme la durée de maturation des organoïdes ou les mutations génétiques dans la modélisation complète de la pathologie.

Il semble nécessaire de combiner ce traitement à d'autres paramètres expérimentaux, tels que des périodes prolongées de culture ou des organoïdes génétiquement modifiés, afin de reproduire de manière plus fidèle les étapes progressives de l'accumulation d'agrégats amyloïdes caractéristiques de la maladie d'Alzheimer.

Ainsi, l'Aftin-5 pourrait être envisagé comme un complément intéressant dans des modèles de neurodégénérescence, notamment pour l'étude des phases précoces de l'agrégation. Cependant, il reste indispensable de considérer d'autres aspects de la physiopathologie de la maladie, notamment les mutations génétiques et les processus de maturation cellulaire, pour mieux appréhender les mécanismes complexes qui sous-tendent la progression de la maladie.

Dans le cadre de cette étude, en plus de l'accumulation d'agrégats amyloïdes, une autre caractéristique clef de la maladie d'Alzheimer est la formation de dégénérescences neurofibrillaires associées à l'agrégation de la protéine tau sous sa forme phosphorylée. Nos résultats préliminaires (non montrés dans ce manuscrit), obtenus à partir de l'utilisation du marqueur de tau phosphorylée AT8, n'ont pas révélé de différences significatives entre les organoïdes normaux et les organoïdes porteurs de mutations APP ou PSEN1.

Cette absence de variation pourrait s'expliquer par le fait que la phosphorylation de tau est souvent associée à des phases de prolifération cellulaire. Dans nos échantillons, les organoïdes étudiés contenaient encore des

populations de cellules prolifératives, ce qui pourrait masquer les effets spécifiques de la mutation sur la phosphorylation de tau. Pour mieux comprendre l'implication de tau dans nos modèles, il serait nécessaire de répéter ces analyses sur des organoïdes plus matures (âgés de plus de six mois), où la prolifération cellulaire est fortement réduite. Cela pourrait permettre de mettre en évidence des altérations plus subtiles de la phosphorylation de tau, potentiellement plus représentatives des stades avancés de la maladie d'Alzheimer.

2.1. Caractérisation fonctionnelle des organoïdes cérébraux

2.1.1. Suivi du flux calcique

La modulation des concentrations de calcium dans les neurones est un processus fondamental qui régule diverses fonctions cellulaires, y compris la neurotransmission, la plasticité synaptique et la survie cellulaire. Dans le contexte de la maladie d'Alzheimer, des altérations dans le métabolisme calcique sont souvent observées, contribuant à la dysfonction neuronale et à la mort cellulaire. L'utilisation de GCaMP (GFP-based Calcium Indicators) dans des modèles d'organoïdes cérébraux permettrait de surveiller ces perturbations calciques de manière dynamique et non invasive, offrant ainsi une fenêtre d'observation sur les événements pathologiques. Alternativement, l'utilisation de Fluo-4, un indicateur calcique fluorescent, constitue une approche complémentaire pour étudier la modulation des concentrations de calcium dans les neurones des organoïdes cérébraux.

Nous avons pu au cours de cette étude confirmer que, malgré l'état immature des cellules composant l'organoïde, le flux calcique était détectable via le Fluo-4.

Dans ces expériences, la sonde Fluo-4 a été incubée pendant 1h pour favoriser la pénétration au sein de l'organoïde alors que la sonde GCaMP a été délivrée au sein des cellules de l'organoïde à l'aide de vecteurs AAV. Les deux types d'administration utilisés pour les sondes restent imparfaits pour être présent dans la totalité des cellules, l'organoïde étant très dense par rapport à un cerveau humain. Les flux calciques ont pu être visualisés grâce à un microscope à disque rotatif (spinning disk), mais nous n'avons pas pu observer de différences entre les organoïdes contrôles et pathologiques.

Devant la difficulté de viser les cellules situées à l'intérieur de la structure en 3D, une stratégie de modification génétique des IPS, intégrant le gène GCaMP dans le génome est envisagée. L'objectif consisterait à le mettre en place sous le contrôle du promoteur de la protéine neuronale synapsine (Syn). Cette protéine, étant exclusivement exprimée dans les neurones, permettrait ainsi de visualiser

les flux calciques émis dans les neurones mais pas dans les autres types cellulaires. En effet, d'autres cellules, comme les astrocytes, sont aussi capables de générer des flux calciques.

Cependant, la taille que peuvent atteindre les organoïdes peut être incompatible avec la profondeur à laquelle le microscope peut pénétrer dans le tissu. D'autres techniques plus adaptées pourraient être utiles pour visualiser au cours de la culture l'expression du rapporteur fluorescent.

2.1.2. Utilisation d'un dispositif MEA pour suivre la maturation des organoïdes cérébraux

Les réseaux de multi électrodes (MEA) permettent de mesurer l'activité électrophysiologique au cours de la culture. Aussi, dans le cadre d'un projet financé par le FRM, nous avons pu avoir accès à un MEA à haute densité (MEA-HD), offrant de nombreuses électrodes réparties sur une surface très condensée. Cependant, les multiples essais réalisés (sur des cerveaux de souris, des organoïdes corticaux et des neurones en culture 2D) ont donné des résultats peu concluants, soulevant des questions sur la sensibilité du système MEA utilisé. Concernant les organoïdes corticaux, l'activité électrique a néanmoins pu être détectée dans un nombre limité d'échantillons. L'appareil MEA-HD a une sensibilité moindre que d'autres systèmes, et sur la base des résultats préliminaires obtenus, l'équipe vise dorénavant l'utilisation d'un MEA à basse densité plus sensible, et plus adapté à nos problématiques, et à travailler sur des méthodes favorisant le contact entre les cellules de l'organoïde et les électrodes.

Plusieurs études ont utilisé des MEA à basse densité pour mesurer l'activité électrique des organoïdes cérébraux. Par exemple, une première étude (Tasnim & Liu, 2021) (**Figure 73**) montre que l'organoïde cérébral émet une activité électrique supérieure aux neurones en 2D à partir de 20 semaines et jusqu'à 40 semaines.

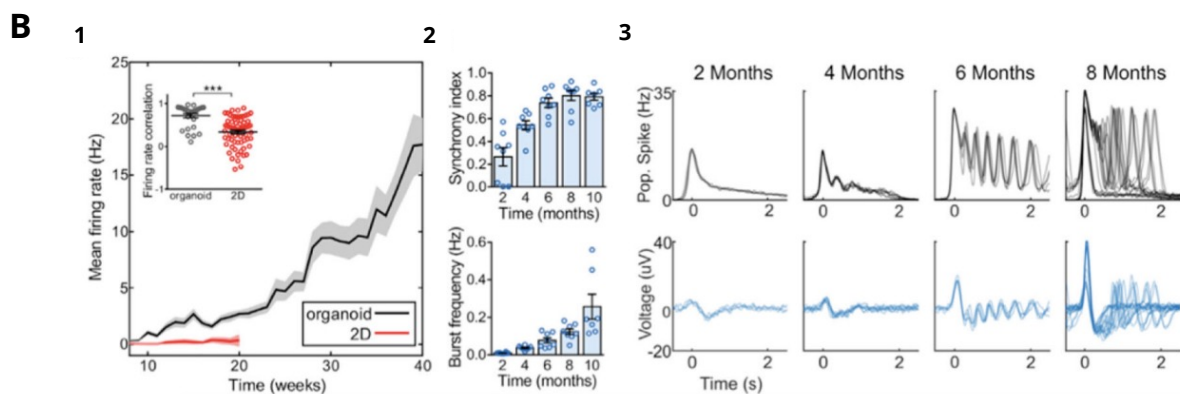
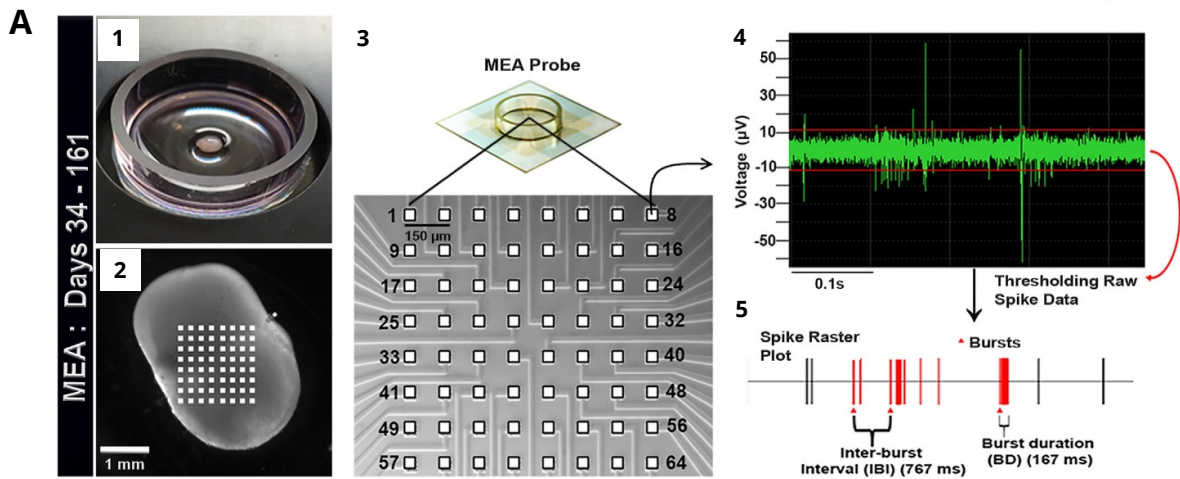


Figure 73 : Résultats obtenus par d'autres équipes d'organoïdes cérébraux sur le MEA

Figures extraites de (Fair et al., 2020; Tasnim & Liu, 2021)

2.2. Limites du modèle organoïde cérébral

L'utilisation des iPSCs pour obtenir de nouveaux modèles d'organoïdes se développe activement. Cependant, certaines limites actuelles du système ne permettent pas d'obtenir des modèles complexes permettant de modéliser fidèlement des pathologies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer. Plusieurs points seront discutés notamment l'utilisation de dispositifs micro-fluidiques afin d'obtenir un modèle plus proche de la réalité, une complexification du modèle avec l'ajout de certains composants vasculaires, microgliaux ou encore le développement d'assembloïdes.

2.2.1. Développement de systèmes micro-fluidiques

Le développement d'un nouveau protocole d'organoïde cortical au sein du laboratoire avait pour objectif d'essayer de réduire l'hétérogénéité observée entre les différents organoïdes. Les résultats obtenus vont dans ce sens. Les organoïdes obtenus à partir du protocole d'organoïde cortical a permis d'obtenir des rosettes

de manière beaucoup plus homogènes au sein des organoïdes comparativement au protocole non guidé utilisé précédemment. Cependant, bien qu'une réduction de l'hétérogénéité au sein des organoïdes ait été observée, de nombreuses variabilités restent encore présentes.

Cette problématique a commencé à émerger depuis plusieurs années et de nouvelles solutions ont été proposées notamment l'utilisation de dispositifs micro-fluidiques. Une étude bibliographique réalisée au sein du laboratoire présente les différents modèles existants sur la **Figure 74** en évaluant deux critères la prédictivité du modèle et le contrôle que l'expérimentateur a sur le modèle (Castiglione et al., 2022).

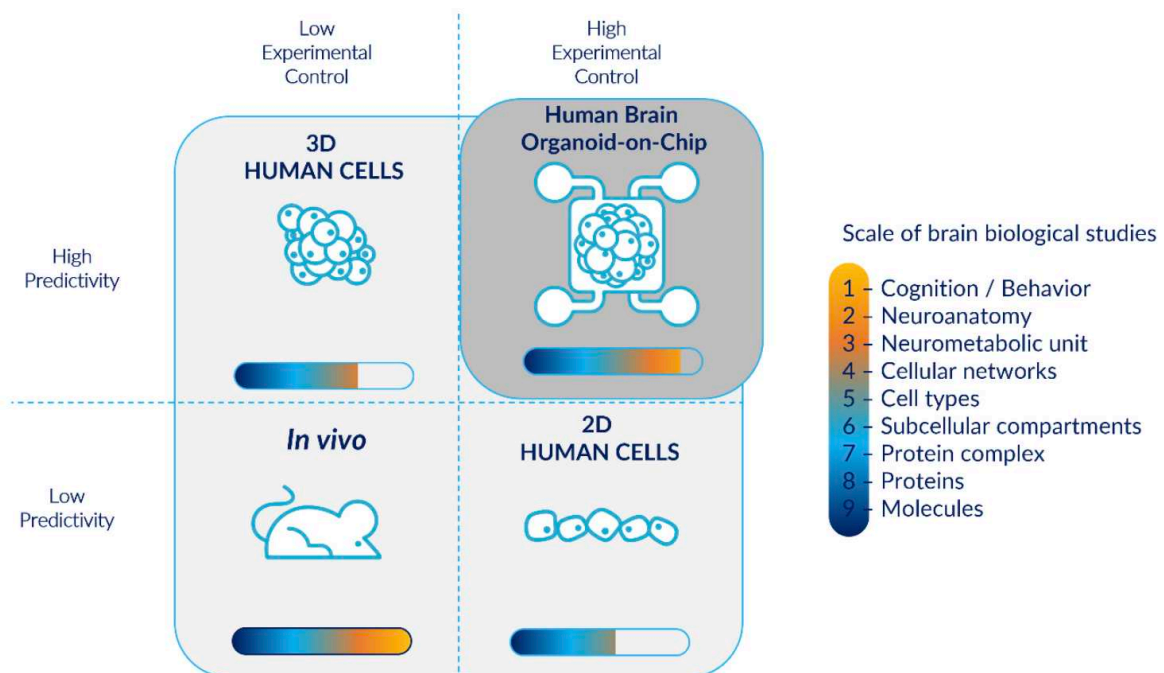


Figure 74 : Représentation graphique des différents modèles existants

Même si les modèles in vivo permettent une plus grande diversité d'études neurologiques, ils sont associés à une faible prédictivité et à un faible contrôle expérimental. Ils sont également considérés comme un modèle de boîte noire : souvent privilégié par les chercheurs malgré la disponibilité d'autres modèles. En revanche, les cellules humaines in vitro en 2D permettent un contrôle expérimental élevé, mais elles ont une faible prédictivité et ne permettent pas d'effectuer des études biologiques sur le cerveau à une échelle plus élevée que le niveau cellulaire. D'autre part, les structures 3D, telles que les organoïdes cérébraux, permettent des études plus complexes avec une prédictivité élevée, mais sont associées à un contrôle expérimental plus faible et à une forte hétérogénéité entre les lots et à l'intérieur des lots. La combinaison des organoïdes cérébraux et de la technologie micro-fluidique fournit un modèle à haute contrôlabilité expérimentale, en particulier pour la modélisation des micro-environnements physiologiques dans une approche minimaliste, tout en garantissant

une prédictivité élevée et en permettant un large éventail d'études biologiques. Figure issue de (Castiglione et al., 2022).

Plusieurs types de dispositifs micro-fluidiques existent pour contrôler l'environnement de culture plus finement (Castiglione et al., 2022). Les deux premiers dispositifs présentés sont des chambres de culture dans lesquelles les organoïdes sont insérés. La première chambre de culture est équipée de canaux micro-fluidiques qui vont permettre de changer le milieu dans la chambre de culture, en réduire le stress de cisaillements, d'augmenter la viabilité cellulaire au sein des organoïdes tout en accroissant leur degré de maturation. La force de cisaillement est une force qui est appliquée perpendiculairement à l'organoïde. Elle n'est pas présente lors du développement cérébral et peut donc influencer le développement de l'organoïde. Le deuxième dispositif est une chambre de culture dans laquelle l'organoïde est placé entre des micro-piliers et comporte des avantages similaires au premier dispositif. Enfin, un dernier dispositif micro-fluidique existe avec une interface air/liquide qui permet d'améliorer la viabilité des organoïdes tout en réduisant l'hypoxie. Ces dispositifs permettent également d'augmenter l'homogénéité du diamètre entre les organoïdes cérébraux (**Figure 75**).

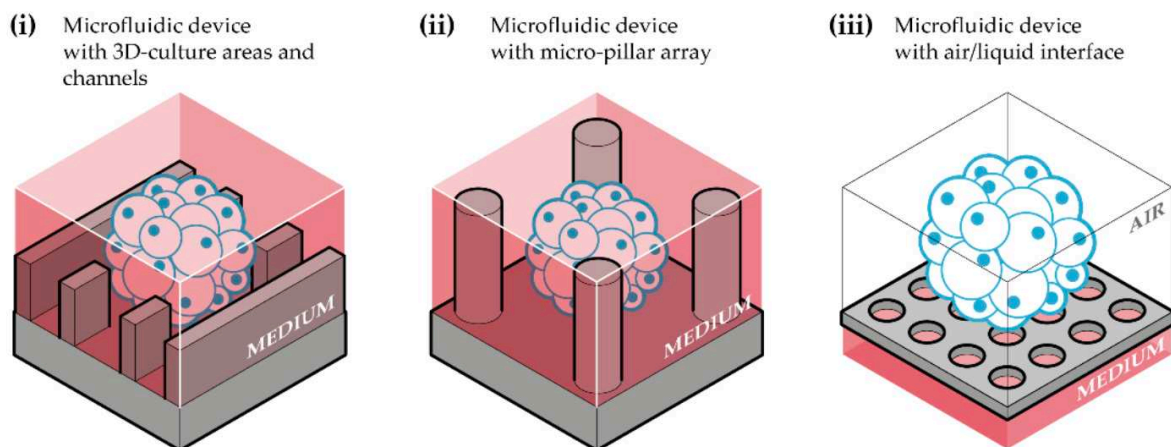


Figure 75: Représentation schématique des différents dispositifs micro-fluidiques existants

(i) Dispositif micro-fluidique avec zones et canaux de culture 3D : dispositif composé d'un compartiment pour la culture d'organoïdes cérébraux, relié à des canaux pour le flux et la perfusion du milieu de culture ; (ii) Dispositif micro-fluidique avec réseau de micro-piliers : dispositif contenant des micro-piliers entre lesquels des organoïdes cérébraux sont générés et cultivés ; (iii) Dispositif micro-fluidique avec interface air/liquide : dispositif adapté à la culture d'organoïdes cérébraux dans une interface air/liquide. Figure issue de (Castiglione et al., 2022).

2.2.2. Complexification du modèle d'organoïde cérébral

Les organoïdes ne récapitulent pas tous les aspects physiologiques du cerveau humain (limites récapitulées dans la **Figure 76.**) Il manque, par exemple, le système immunitaire cérébral, la microglie, une présence en très faible quantité voire une absence d'oligodendrocytes ou encore le manque de vascularisation, qui sont autant d'éléments qui peuvent jouer un rôle important dans la pathogénèse de la maladie.

Limitations	Potential solutions	References
Organoids do not fully resemble brain cytoarchitecture and function	Unguided protocol	Lancaster and Knoblich, 2014
	Assembloids	Sun et al., 2023
Variation among individual organoids or batches	Omitted matrigel embedding	Camp et al., 2015
	Use defined matrices: synthetic hydrogels	Barry et al., 2017
	Guided protocol with defined culture conditions	Renner et al., 2020
	Single rosette organoid	Knight et al., 2018
Unpredictable number of rosettes within each organoid	Single rosette organoid	Knight et al., 2018
		Wang et al., 2022
Necrotic core due to cellular stress	Bioreactor or orbital shaking	Lancaster and Knoblich, 2014
	High O ₂	Kadoshima et al., 2013
	Millifluidic culture	Berger et al., 2018
	Sliced organoids	Qian et al., 2020
	CEPT cocktail	Ryu et al., 2023
	Transplantation	Cao et al., 2023
	Removing cell stress data from RNAseq dataset	Vertesy et al., 2022
Lack of maturation	Long term culture	Gordon et al., 2021
	Volumetric compression	Tang et al., 2023
	Microfluidic device	Cho et al., 2021
	Assembloids	Miura et al., 2022
	Transplantation	Wang et al., 2023

Figure 76 : Limites des protocoles organoïdes actuels

Tableau extrait de (H. H. Zhao & Haddad, 2024)

2.2.2.1. Microglie

La composante microgliale est un élément très important au sein du cerveau. La microglie correspond au système immunitaire cérébral et est issue du mésoderme, un feuillet embryonnaire différent de celui dont sont issus les neurones, les astrocytes ou les oligodendrocytes. C'est la première barrière de protection des cellules cérébrales contre les pathogènes ou éléments toxiques (Ginhoux & Prinz, 2015; Hattori, 2021). Il a été décrit que la microglie pouvait adopter trois phénotypes différents visibles sur la **Figure 77** (Miao et al., 2023). Le phénotype homéostatique est le phénotype microglial dans la situation normale. Avec l'âge ce phénotype va devenir « dystrophique ». Une microglie dystrophique est une microglie qui est devenue moins active et protège moins bien le cerveau. Enfin, le dernier phénotype présenté est le phénotype « pathologique ». Ce dernier phénotype microgliale est le phénotype retrouvé dans la maladie d'Alzheimer. La microglie est activée dès le début de la pathologie et impliquée dans la dégradation des agrégats protéiques. La microglie joue d'autres rôles importants dans la maladie d'Alzheimer détaillés dans la revue (Miao et al., 2023). C'est pourquoi de nombreuses études travaillent à développer cette composante microgliale au sein de l'organoïde. Généralement, ces études consistent à différencier les cellules microgliales avant de les réintroduire dans les organoïdes cérébraux.

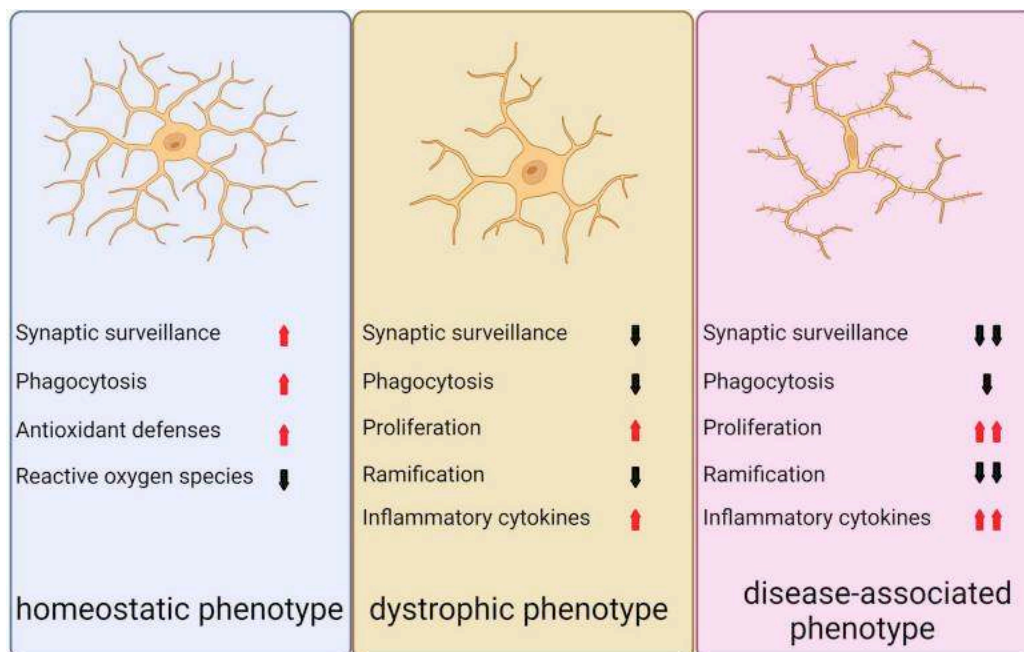


Figure 77 : Représentation des trois phénotypes microgliaux distincts

Le premier, connu sous le nom de phénotype homéostatique, est généralement observé dans le cerveau adulte dans des conditions non pathologiques, non infectées et non vieilles. Le deuxième phénotype, appelé phénotype dystrophique, apparaît au cours du vieillissement normal lorsque les marqueurs homéostatiques diminuent progressivement, entraînant un déclin de diverses fonctions microgliales telles que la prolifération, la phagocytose, la ramification et la sécrétion de cytokines. Le troisième phénotype, connu sous le nom de phénotype associé à la maladie, est lié à la neurodégénérescence et présente une forme exacerbée du phénotype dystrophique, reflétant les divers rôles que la microglie peut assumer dans différents contextes. Figure issue de (Miao et al., 2023)

Plusieurs études ont montré que l'ajout de la microglie contribuait à la maturation des organoïdes en modulant la différenciation des cellules progénitrices neurales, en limitant leur prolifération et en favorisant la croissance axonale (Sabate-Soler et al., 2022; D. S. Park et al., 2023).

2.2.2.2. Vasularisation

Un composant essentiel du cerveau humain absent du modèle organoïde est la présence de vascularisation. A partir d'une certaine taille, un cœur nécrotique apparaît dans l'organoïde, provoqué par le fait que les nutriments et l'oxygène n'arrivent plus à pénétrer au cœur de l'organoïde. Afin de réduire l'apparition de ce cœur nécrotique, et de contribuer à la maturation des cellules, plusieurs stratégies ont été développées afin d'ajouter un réseau vasculaire fonctionnel à l'organoïde.

Un premier protocole développé est l'introduction de cellules endothéliales (HUVEC) avec des organoïdes dans une matrice (Osaki et al., 2018). Le dispositif utilisé est présenté sur la **Figure 78**. L'objectif est de permettre aux HUVECs de former un réseau vasculaire. Cependant, l'ajout de cellules HUVECs ne permet pas actuellement d'obtenir une vascularisation fonctionnelle.

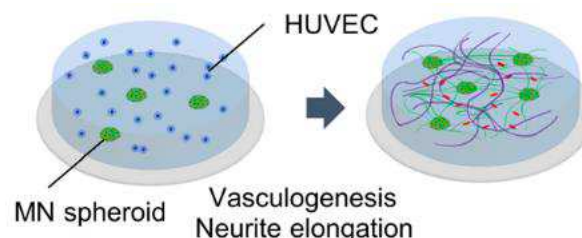


Figure 78 : Approche micro-fluidique pour obtenir un réseau vasculaire
Des sphéroïdes de motoneurones (MN) mis en co-culture avec des cellules endothéliales (HUVEC) sur une matrice micro-fluidique pour le développement d'un réseau vasculaire fonctionnel permettant de créer un apport de nutriments et un développement plus important des structures. Figure extraite de (Osaki et al., 2018).

Un deuxième protocole a été établi afin d'essayer de développer une vascularisation fonctionnelle. Ce deuxième protocole consiste à transplanter l'organoïde cérébral au sein d'un cerveau murin. Les transplantations d'organoïdes cérébraux sont réalisées avec des organoïdes âgés de plus d'un mois. La procédure est présentée sur la **Figure 79**. Dans l'étude réalisée par Daviaud et ses collègues, les organoïdes sont transplantés à 42 jours pendant deux semaines au sein du cerveau de souris. La fonctionnalité du réseau vasculaire ainsi généré a été démontrée, ainsi qu'une maturation plus rapide des organoïdes et une meilleure viabilité cellulaire par rapport aux organoïdes cultivés *in vitro* (Daviaud et al., 2018).

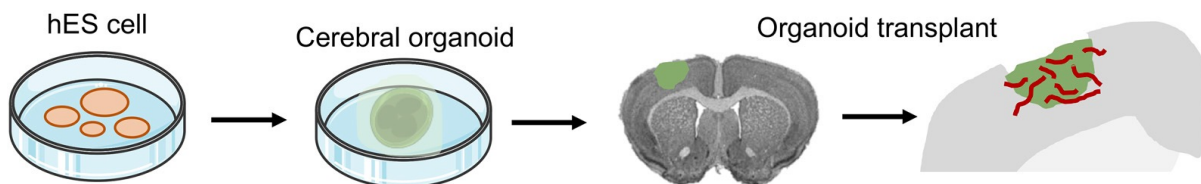


Figure 79 : Schéma représentatif de la greffe d'organoïdes cérébraux au sein d'un cerveau murin

A partir d'ES ou d'iPSCs, des organoïdes cérébraux ont été générés avant d'être greffés au sein d'un cerveau murin pour développer un réseau vasculaire. Figure adaptée de (Daviaud et al., 2018)

Un des principaux défauts de la technique présentée précédemment est le besoin d'utiliser des animaux avec la génération de chimères qui en découlent. L'utilisation de chimères pose de nombreux questionnements éthiques, ce qui peut rendre la mise en place de plans expérimentaux complexe (Johnston et al., 2022). La pluripotence des iPSCs permet d'envisager un réseau vasculaire issu des mêmes iPSCs que l'organoïde. La **Figure 80** montre un protocole issu de (X. Y. Sun et al., 2022) afin de générer des organoïdes cérébraux vascularisés. Ici, des organoïdes cérébraux et des précurseurs vasculaires sont dérivés à partir de la même lignée d'iPSCs et mis en contact après 12 jours de culture. Le réseau vasculaire se développe autour et au sein de l'organoïde. La fonctionnalité a été démontrée en micro-injectant une veine avec un agent de contraste et montre qu'il n'y a pas de fuite dans le réseau.

Une autre étude, assemblant un organoïde cérébral avec des progéniteurs vasculaires, a montré que la vascularisation des organoïdes permet d'induire une maturation plus rapide et importante (Kook et al., 2022).

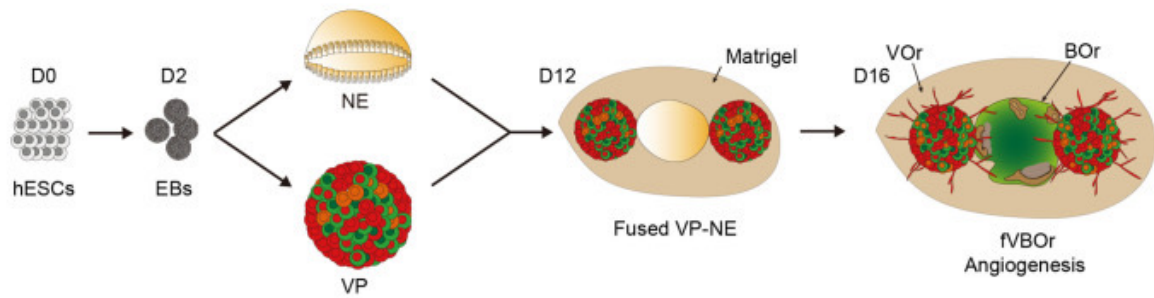


Figure 80 : Génération d'organoïdes de vascularisation et de cerveau fusionnés (fVBORs) avec une structure de barrière hémato-encéphalique (BHE)

Schéma de la méthode de génération de fVBOR. EBs, corps embryonnaires ; NE, neuroépithélium ; VP, progéniteur vasculaire ; VO, organoïde vasculaire ; BO, organoïde cérébral. Figure extraite de (X. Y. Sun et al., 2022).

Ce dernier protocole peut s'apparenter à la génération d'un assemloïde, c'est-à-dire l'assemblage de deux organoïdes différents afin de complexifier le système. Une récente étude est menée sur un assemloïde d'organoïde cortical, d'organoïde vasculaire avec ajout de la microglie. La microglie est activée par infection à l'aide du virus du SARS-CoV-2 dans les assemloïdes. De manière intéressante, d'importants signes pathologiques de la maladie d'Alzheimer étaient présents dans ce modèle (Kong et al., 2023).

2.2.2.3. Assemloïdes

Les organoïdes générés pour la maladie d'Alzheimer au cours de cette thèse sont spécifiques d'une région cérébrale, le cortex. Bien que ces modèles soient pertinents, pour l'étude de certains aspects de la pathologie, ils reposent sur l'auto-organisation des cellules dans des systèmes 3D, ce qui limite le contrôle que nous pouvons exercer sur certains paramètres clés. En effet, malgré les avancées significatives en combinant des approches chimiques et génétiques, la capacité à moduler précisément les interactions entre les différentes structures au sein des organoïdes reste un défi majeur. Ce problème d'auto-organisation est rencontré par de nombreux chercheurs dans le domaine, car il est difficile de contrôler tous les paramètres nécessaires à la modélisation fidèle des processus physiopathologiques complexes.

C'est dans ce contexte que la stratégie des assemloïdes s'avère prometteuse. Contrairement aux organoïdes traditionnels, qui dépendent fortement de leur capacité d'auto-organisation, les assemloïdes permettent d'assembler plusieurs types d'organoïdes spécifiques, générés séparément, pour former des structures multicellulaires plus complexes. Cela ouvre la possibilité de contrôler davantage de paramètres, tels que la composition cellulaire, les interactions entre différentes

régions cérébrales, ou encore la création de connexions spécifiques comme la jonction neuromusculaire. En établissant un contact contrôlé entre les organoïdes, les assemloïdes visent à surmonter les limitations de l'auto-organisation, permettant ainsi de développer des modèles plus élaborés et plus proches de la réalité biologique.

Cette approche offre une nouvelle voie pour résoudre les problèmes liés à l'auto-organisation des systèmes 3D et pourrait être déterminante pour améliorer la modélisation des maladies neurodégénératives.

Un des premiers protocole d'assemloïdes développés est la mise en place d'une jonction neuromusculaire avec le cortex, la moelle épinière et le muscle comme présenté sur la **Figure 81** (Andersen et al., 2020).

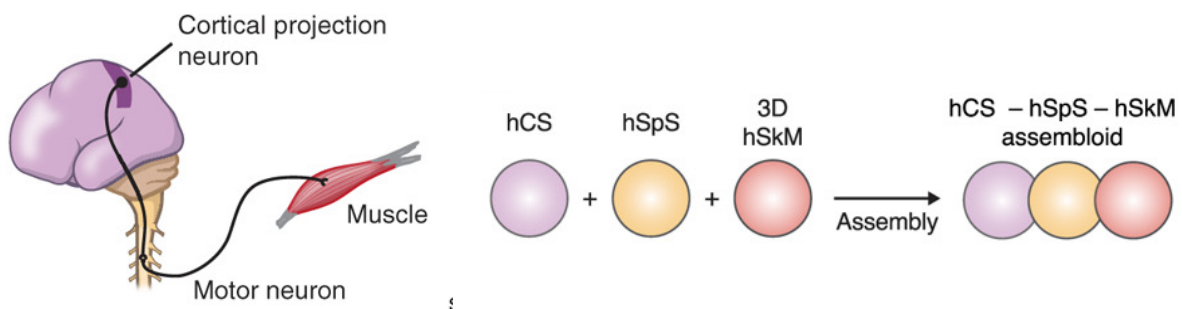


Figure 81 : Schéma représentatif de génération d'un assemloïde pour modéliser la jonction neuro-musculaire

Figure adaptée de (Andersen et al., 2020).

La notion d'assemloïdes est très récente car elle apparaît sur PubMed uniquement en 2018. Aujourd'hui un peu moins de 150 articles contiennent le terme d'assemloïdes. Seules deux études à ce jour utilisent des assemloïdes pour modéliser des pathologies neurodégénératives : l'étude de (X. Sun et al., 2024) s'intéresse aux tauopathies et une autre étude de (S. Wu et al., 2024) qui s'intéresse à l'étude de la maladie de Huntington. Les assemloïdes permettront sans doute d'apporter un degré de complexité supplémentaire pour dépasser les limitations actuelles rencontrées avec les organoïdes.

2.3. La maladie d'Alzheimer : une maladie multifactorielle

La maladie d'Alzheimer est une pathologie complexe dont la compréhension reste aujourd'hui partielle, car elle implique une multitude de facteurs. Réussir à développer un modèle qui regroupe un nombre suffisant de facteurs pour

modéliser fidèlement la pathogénèse est encore un défi. Plusieurs paramètres sont importants à intégrer au modèle comme le fond génétique des lignées utilisées pour générer les modèles, l'exposition à un certain nombre de composés au cours de la vie d'un individu ou encore l'implication du vieillissement et de facteurs épigénétiques.

2.3.1. Implication du fond génétique d'un individu dans la maladie d'Alzheimer

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, le fond génétique d'un individu est important et semble jouer un rôle dans le développement de la pathologie. Dans ce manuscrit, nous avons utilisé des lignées cellulaires ayant le même fond génétique mais dans lesquelles des mutations caractérisées pour déclencher la maladie d'Alzheimer ont été introduites dans les gènes APP et PSEN1. Cependant, la pénétrance des gènes impliqués dans la maladie d'Alzheimer n'est pas complète. Le fond génétique de la lignée de patients est donc un élément essentiel afin de modéliser au mieux la pathologie (Thordardottir et al., 2018; Piaceri et al., 2020). Les résultats que nous avons obtenus sur des organoïdes gardés en culture jusqu'à 6 mois ont pu démontrer le développement de signes pathologiques, notamment l'apparition d'agrégats A β en quantité importante.

Cependant, en plus des gènes identifiés, APP, PSEN1 et PSEN2, comme étant impliqués dans l'apparition et le développement de la pathologie dans les formes précoces, d'autres gènes ont été identifiés comme facteurs pouvant agir favorablement ou défavorablement sur le développement de la maladie.

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, les principaux gènes qui ont été découverts comme pouvant être des facteurs de risques sont les gènes ACE, APOE, FOXO3A, IL-6 et KLOTHO. Dans l'étude que nous avons réalisée, nos quatre lignées cellulaires avaient un phénotype APO ϵ 3, variant du gène APOE qui a tendance à protéger contre le développement de la pathologie. Dans une future étude, il serait donc intéressant de modifier le variant APO ϵ 3 en variant APO ϵ 4 afin de vérifier si les signes pathologiques déjà observés sont potentialisés en favorisant un développement des signes pathologiques plus rapide par exemple. Plusieurs études ont utilisé et testé ces deux variants au sein des organoïdes (J. Zhao et al., 2020; Vanova et al., 2023; Perez-Corredor et al., 2024).

Concernant les autres gènes impliqués, quelques études ont été publiées. Une étude a par exemple montré que le gène KLOTHO protégeait contre la sénescence neuronale (Shaker et al., 2021). Intégrer l'étude de ces gènes de manière plus systématique dans des futures études plus globales de la maladie d'Alzheimer nous permettrait d'avoir une meilleure compréhension du développement de la pathologie.

2.3.2. Utilisation de molécules pour induire la maladie d'Alzheimer

La notion d'exposome humain a été évoquée en introduction. Pour rappel, un individu au cours de sa vie est susceptible d'être exposé à environ 80,000 substances différentes. Suite à une précédente étude menée au sein du laboratoire, la molécule d'Aftin-5, caractérisée comme une molécule alzheimerogène, a été utilisée pour induire une augmentation de la production du fragment A β -42 et induire ainsi un phénotype pathologique (Pavoni et al., 2018). Au cours de cette thèse, nous avons pris la suite de cette étude en utilisant de l'Aftin-5 mais sur des lignées ayant des mutations induisant la maladie d'Alzheimer. Les résultats obtenus dans cette étude montrent effectivement que l'utilisation de l'Aftin-5 induit bien une augmentation de l'agrégation A β -42 dans tous les organoïdes générés, même si elle est plus importante dans les organoïdes mutants. Cependant à haute dose, il s'avère que la molécule Aftin-5 est cytotoxique.

Suite à la définition de l'exposome humain, des banques de molécules ont été générées contenant des substances herbicides, pesticides et insecticides principalement. Des molécules ont été testées afin de déterminer leur pouvoir alzheimerogène et sont présentées sur la **Figure 82**, issues de l'étude de Cam et de ses collaborateurs (Cam et al., 2018). L'Aftin-5 est aujourd'hui la molécule de référence utilisée pour induire une augmentation de la sécrétion A β -42 (**Figure 82**) (Cam et al., 2018).

Il serait donc intéressant de tester le pouvoir alzheimerogène de ces molécules ainsi que leurs effets cytotoxiques et de les comparer à ceux de l'Aftin-5.

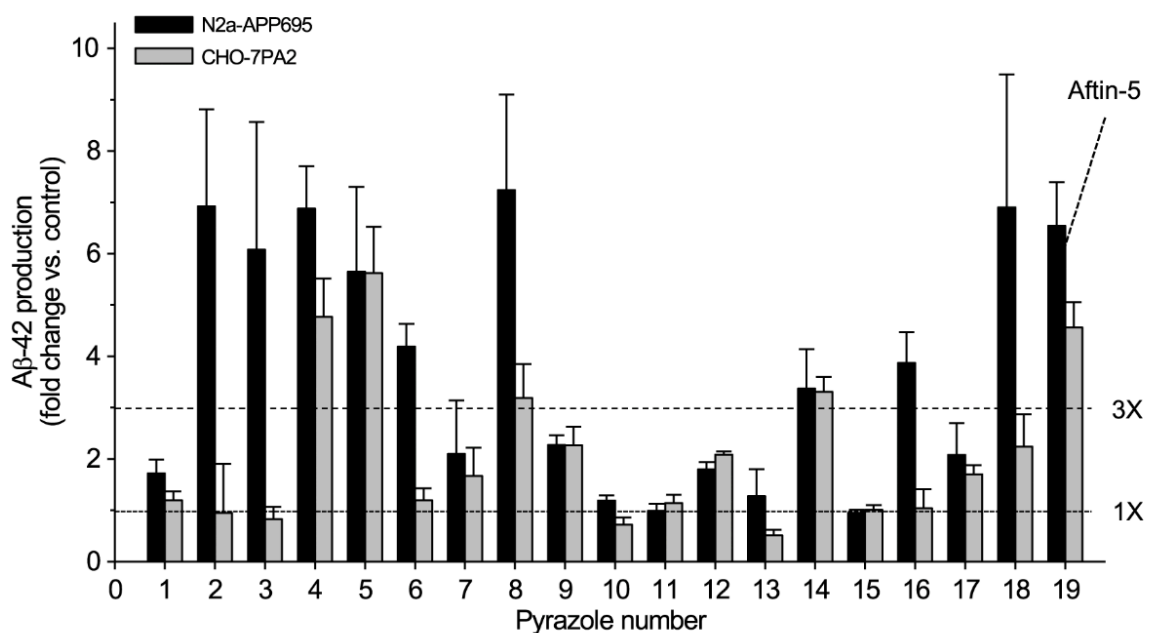


Figure 82 : Graphique représentant l'augmentation de la production en fragment protéique A β -42 en fonction des différents composés pyrazole utilisés

Effet de 18 pyrazoles sur la production extracellulaire d'amyloïde A β 42 par les cellules N2a-APP695 et CHO-7PA2-APPsw. Les cellules ont été traitées avec 100 μ M de chaque composé pendant 18 h et les surnageants cellulaires ont été collectés pour mesurer les niveaux d'A β 42 extracellulaire par un test ELISA. L'Aftin-5 a été utilisé comme contrôle positif et le volume correspondant de véhicule (DMSO) a été utilisé comme contrôle négatif. Les niveaux exprimés sont normalisés en fonction du contrôle et sont exprimés en quantité supérieure trouvée par rapport au contrôle, \pm SE, des niveaux de A β 42 par rapport au niveau de A β 42 des cellules de contrôle, traitées par le véhicule. Moyenne de cinq expériences réalisées en trois exemplaires. Les lignes horizontales en pointillé indiquent les niveaux pour les augmentations de 1 et 3 fois de la concentration d'A β 42. Figure extraite de (Cam et al., 2018).

Aucune autre étude utilisant de l'Aftin-5 pour induire des phénotypes de la maladie d'Alzheimer sur des organoïdes n'a été réalisée. Cependant, d'autres substances ont été utilisées comme du sérum de veau foetal (X. Chen et al., 2021) ou des molécules comme la roténone (Cam et al., 2018).

2.3.3. L'implication du vieillissement dans le développement de la maladie d'Alzheimer

Dans l'introduction, nous avons mentionné que les organoïdes générés à partir de cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) conservent un profil épigénétique foetal, tout comme pour les iPSCs. Malgré ce profil peu mature, les organoïdes corticaux produits au cours de cette thèse ont montré des signes physiopathologiques de la maladie d'Alzheimer (augmentation du marquage 6E10), suggérant que certains aspects de la pathologie peuvent se développer en l'absence de caractéristiques liées au vieillissement. Toutefois, la question de la maturation des organoïdes in vitro reste cruciale, notamment pour les maladies neurodégénératives comme Alzheimer, qui se développent tardivement.

Une étude menée par (Gordon et al., 2021) a montré qu'après 9 mois de culture, les organoïdes corticaux atteignaient un degré de maturation comparable à celui d'un nouveau-né. Cela met en lumière l'un des défis majeurs de la modélisation de maladies liées à l'âge : la plupart des organoïdes cultivés sur des périodes plus courtes ne parviennent pas à reproduire un profil épigénétique et cellulaire adulte et/ou vieillissant. Or, la maturation neuronale et la sénescence cellulaire sont des éléments clés dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques des maladies comme Alzheimer.

Pour contourner ce problème, certaines études ont tenté d'améliorer la maturation des organoïdes en augmentant la complexité du modèle, par exemple en incluant d'autres types cellulaires comme les astrocytes, la composante microgliale ou en intégrant des cellules vasculaires. Cependant, aucune approche n'a encore permis de reproduire fidèlement un profil de maturation et de vieillissement comparable à celui observé *in vivo* chez l'adulte ou la personne âgée. Cette limite constitue un obstacle majeur pour l'étude des pathologies liées à l'âge, car de nombreux mécanismes pathologiques associés au vieillissement, comme la dérégulation des voies métaboliques et les modifications épigénétiques liées au stress oxydatif, sont absents ou mal représentés dans les modèles actuels d'organoïdes.

La poursuite des travaux visant à moduler la maturation des organoïdes *in vitro*, notamment par l'activation de voies de signalisation spécifiques au vieillissement, par l'expression de gènes ou par des interventions pharmacologiques, pourraient permettre d'améliorer la pertinence des modèles. En parallèle, l'utilisation de techniques avancées, comme l'imagerie automatisée pour suivre ces processus de maturation sur le long terme, serait indispensable pour rendre ces approches compatibles avec les exigences des industries pharmaceutiques et biotechnologiques.

2.4. L'identification de mécanismes générant la pathologie

L'établissement d'un modèle fiable et représentatif de la réalité physiologique et pathologique du cerveau humain reste un défi. La création de tels modèles vise principalement deux objectifs complémentaires : d'une part, la compréhension des mécanismes pathologiques sous-jacents aux maladies neurodégénératives, et d'autre part, la possibilité de découvrir de nouvelles cibles ou de tester des composés thérapeutiques dans un environnement qui imite la biologie humaine.

Comme mentionné dans l'introduction, une théorie émergente postule que les neurones pourraient réintégrer le cycle cellulaire, un phénomène qui pourrait contribuer à la mort progressive de ces cellules et contribuer à la maladie d'Alzheimer. Ce concept mérite une exploration approfondie, notamment lorsqu'un modèle organoïde suffisamment complet aura été établi. En effet, l'étude de cette ré-entrée dans le cycle cellulaire pourrait offrir des perspectives nouvelles sur la manière dont les neurones gèrent leur survie et leur fonction au cours de la progression des maladies neurodégénératives.

Un intérêt particulier devrait par exemple être porté à certaines protéines régulatrices du cycle cellulaire, notamment celles impliquées dans le mécanisme de contrôle au niveau des points de contrôle, plus particulièrement le passage G2/M, ainsi que leurs cyclines associées. Ces molécules jouent un rôle crucial dans la régulation de la progression du cycle cellulaire et pourraient s'avérer être des

cibles thérapeutiques intéressantes. En étudiant les variations d'expression et les modifications post-traductionnelles de ces protéines dans le contexte des organoïdes cérébraux, il serait possible de mieux comprendre les interactions complexes entre la prolifération cellulaire et la mort neuronale, ouvrant ainsi de nouvelles voies pour le développement de stratégies thérapeutiques ciblées dans les maladies neurodégénératives.

Conclusion et perspectives

Comparaison de l'utilisation des organoïdes cérébraux pour modéliser des maladies neurodéveloppementales et des maladies neurodégénératives

Au cours de cette thèse nous avons développé deux modèles pathologiques : un pour le syndrome neurodéveloppemental MARCH et un autre pour la maladie neurodégénérative Alzheimer.

Dans le **Tableau 16**, les principales caractéristiques fonctionnelles et phénotypiques étudiées sont reprises pour chacune des deux pathologies. Pour chacun des points évoqués, les informations apportées ainsi que le niveau d'avancement sont notés.

Nom de la pathologie	Caractérisation pathologique	
Syndrome MARCH	<p>Microcéphalie → Suivi de croissance <i>(l'hydranencéphalie est complexe à modéliser in vitro car les organoïdes sont cultivés en milieu liquide)</i> → Présence d'une ciliopathie</p> <p>Affection d'autres tissus Cardiomyocytes → Différenciation en cardiomyocytes / fréquence des battements</p>	<p>Développement cérébral affecté → Immunofluorescence : marquage de gènes intervenant dans le développement.</p> <p>Cytocinèse → La protéine CEP55 a pu être retrouvée aux sites cellulaires attendus</p>
Maladie d'Alzheimer	<p>Flux calcique → Validé (Fluo4 et GCaMP), pas de différences observables entre contrôles et AD</p> <p>Electrophysiologie → Instrument MEA utilisé trop peu sensible.</p>	<p>Accumulation de fragment protéique Aβ-42 → Immunofluorescence : Marquage 6E10 (accumulation du fragment protéique Aβ-42 après plusieurs mois de culture ou après</p>

		traitement avec de l'Aftin-5) Effets sur le neurodéveloppement → Suivi de croissance : Les lignées mutées forment des organoïdes plus petits que les contrôles
--	--	--

Tableau 16 : Tableau comparatif des caractéristiques physiopathologiques recherchées dans la modélisation du syndrome MARCH et la maladie d'Alzheimer

Le modèle d'organoïde généré a permis de récapituler les différents signes physiopathologiques du syndrome MARCH provoqué par l'apparition d'un codon stop prématuré. Ces signes sont la microcéphalie (hydranencéphalie), des problèmes neurodéveloppementaux ainsi que des problèmes au niveau des cils primaires. Le modèle établi est donc totalement pertinent pour l'étude de cette pathologie. Les mécanismes associés à la pathogénèse sont en cours d'identification par l'équipe collaboratrice. Les principaux avantages du modèle organoïde sont l'origine humaine des cellules, ainsi que le temps d'obtention du modèle qui n'est que de 3 à 4 semaines.

En ce qui concerne la modélisation de la maladie d'Alzheimer, le travail précédent de notre équipe, mené par (Pavoni et al., 2018), avait établi les bases de l'utilisation de l'induction chimique avec l'Aftin-5 pour détecter des signes physiopathologiques de la maladie d'Alzheimer dans les organoïdes. De même, l'étude de (Nassor et al., 2020) avait montré que l'expression d'une forme mutée de la protéine tau adulte permettait de modéliser les caractéristiques principales des tissus cérébraux atteints de démence fronto-temporale. Ces études préliminaires ont ouvert la voie à l'approche proposée durant cette thèse, combinant induction chimique et modélisation génétique pour étudier les maladies neurodégénératives dans des modèles *in vitro*.

Dans ce travail, nous avons poursuivi cette approche en associant des méthodes génétiques, en utilisant des modèles contenant les mutations observées chez des patients atteints de formes génétiques précoces d'Alzheimer, tout en y ajoutant l'induction chimique avec l'Aftin-5. Cette stratégie nous a permis

d'observer l'apparition de phénotypes physiopathologiques clefs, notamment le marquage 6E10 de la protéine APP, qui indique l'accumulation d'amyloïde- β ($A\beta$), un marqueur essentiel de la maladie d'Alzheimer.

Dans cette étude, nous avons ainsi pu vérifier l'effet de plusieurs paramètres qui peuvent influencer le développement pathologique d'Alzheimer : l'âge et la maturation des organoïdes (sur une période de 3 à 6 mois de culture), la présence de mutations familiales, et le traitement par Aftin-5, une molécule favorisant la production de la forme $A\beta_{42}$, caractéristique du développement de la maladie.

L'un des principaux défis actuels dans la recherche sur Alzheimer est l'absence de modèles humains fiables et adaptables. Ce manque contraint l'industrie à réduire ses efforts dans la recherche de nouvelles thérapies pour freiner l'apparition des symptômes liés à cette pathologie. Les approches traditionnelles utilisées dans l'industrie de criblage à haut débit (high throughput screening) ont montré leurs limites, et aucune nouvelle molécule thérapeutique n'a émergé de ces stratégies au cours des dernières années, comme le souligne (Yao et al., 2023). Les récentes tentatives, telles que le ciblage des agrégats protéiques avec des anticorps recombinants, bien qu'innovantes, n'ont pas encore montré de résultats cliniques convaincants (Ebell et al., 2024).

Notre approche a été quantitative, basée sur le comptage du nombre d'agrégats présents dans les coupes d'organoïdes en immunofluorescence. Cette méthode, couteuse en temps et en moyens humains nous a permis de démontrer que le marquage 6E10 est adapté pour mesurer et quantifier la formation des agrégats amyloïdes au fil du développement des organoïdes et en fonction des traitements. Cependant, bien que cette approche soit pertinente dans le contexte de la recherche, elle n'est pas encore adaptée aux systèmes de criblage industriel, car la préparation et l'analyse des coupes sont trop chronophages. Cela souligne la nécessité d'une automatisation accrue, en particulier pour l'analyse de grandes séries d'organoïdes.

Les techniques d'analyses fonctionnelles longitudinales (MEA) ou des stratégies basées sur des rapporteurs d'expression pourraient représenter des solutions viables pour accélérer ces analyses et améliorer la robustesse des modèles d'organoïdes.

Malgré les avancées réalisées, le manque de maturité des organoïdes reste cependant une problématique centrale. Cette limite est bien connue et constitue un obstacle majeur à l'application industrielle des modèles d'organoïdes. Sur la base de nos résultats, notre équipe va désormais concentrer ses efforts sur

l'évaluation et la modulation de la maturité des organoïdes. Les premiers résultats fonctionnels obtenus lors de cette thèse, notamment par l'utilisation du GCaMP et de l'électrophysiologie (MEA), représentent une base solide pour cette future direction. De plus, l'exploration des mécanismes épigénétiques, en collaboration avec le Genoscope, sera essentielle pour suivre et moduler l'état de maturation des cellules dérivées d'iPSCs, qui conservent des marques épigénétiques caractéristiques des états embryonnaires ou fœtaux.

Ainsi, ce travail ouvre de nouvelles perspectives pour le développement de modèles plus matures et fonctionnels, indispensables à la recherche de thérapies efficaces contre les maladies neurodégénératives comme Alzheimer.

Bibliographie

- Al Abbar, A., Ngai, S. C., Nogales, N., Alhaji, S. Y., & Abdullah, S. (2020). Induced Pluripotent Stem Cells: Reprogramming Platforms and Applications in Cell Replacement Therapy. *BioResearch Open Access*, 9(1), 121. <https://doi.org/10.1089/BIORES.2019.0046>
- Allegri, R. F. (2020). Moving from neurodegenerative dementias, to cognitive proteinopathies, replacing “where” by “what”.... *Dementia & Neuropsychologia*, 14(3), 237. <https://doi.org/10.1590/1980-57642020DN14-030005>
- Andersen, J., Revah, O., Miura, Y., Thom, N., Amin, N. D., Kelley, K. W., Singh, M., Chen, X., Thete, M. V., Walczak, E. M., Vogel, H., Fan, H. C., & Paşca, S. P. (2020). Generation of Functional Human 3D Cortico-Motor Assembloids. *Cell*, 183(7), 1913-1929.e26. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.11.017/ATTACHMENT/72DEDD15-0BA9-4B55-849B-810C5B85C0E1/MMC1.XLSX>
- Andreadis, A. (2005). Tau gene alternative splicing: expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1739(2-3), 91-103. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2004.08.010>
- Andrews, P. W. (2024). The origins of human pluripotent stem cells: the road from a cancer to regenerative medicine. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, 60(5), 514. <https://doi.org/10.1007/S11626-024-00865-8>
- Angulo Salavarría, M. M., Dell’Amico, C., D’Agostino, A., Conti, L., & Onorati, M. (2023). Cortico-thalamic development and disease: From cells, to circuits, to schizophrenia. *Frontiers in Neuroanatomy*, 17, 1130797. <https://doi.org/10.3389/FNANA.2023.1130797/BIBTEX>
- Anton, D., Burckel, H., Josset, E., & Noel, G. (2015). Three-Dimensional Cell Culture: A Breakthrough in Vivo. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(3), 5517. <https://doi.org/10.3390/IJMS16035517>
- Arendt, T. (1993). Neuronal dedifferentiation and degeneration in Alzheimer’s disease. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 911-912.
- Arendt, T. (2012). Cell Cycle Activation and Aneuploid Neurons in Alzheimer’s Disease. *Molecular Neurobiology* 2012 46:1, 46(1), 125-135. <https://doi.org/10.1007/S12035-012-8262-0>
- Arendt, T., Brückner, M. K., Gertz, H. J., & Marcova, L. (1998). Cortical distribution of neurofibrillary tangles in Alzheimer’s disease matches the pattern of neurons that retain their capacity of plastic remodelling in the adult brain.

- Neuroscience*, 83(4), 991–1002. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(97\)00509-5](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(97)00509-5)
- Aznauryan, E., Yermanos, A., Kinzina, E., Devaux, A., Kapetanovic, E., Milanova, D., Church, G. M., & Reddy, S. T. (2022). Discovery and validation of human genomic safe harbor sites for gene and cell therapies. *Cell Reports Methods*, 2(1), 100154. <https://doi.org/10.1016/J.CRMETH.2021.100154>
- Bagaria, J., Bagyinszky, E., & An, S. S. A. (2022). Genetics, Functions, and Clinical Impact of Presenilin-1 (PSEN1) Gene. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18), 10970. <https://doi.org/10.3390/IJMS231810970/S1>
- Bagley, J. A., Reumann, D., Bian, S., Lévi-Strauss, J., & Knoblich, J. A. (2017). Fused cerebral organoids model interactions between brain regions. *Nature Methods*, 14(7), 743–751. <https://doi.org/10.1038/NMETH.4304>
- Baker, H. F., Ridley, R. M., Duchen, L. W., Crow, T. J., & Bruton, C. J. (1994). Induction of beta (A4)-amyloid in primates by injection of Alzheimer's disease brain homogenate. Comparison with transmission of spongiform encephalopathy. *Molecular Neurobiology*, 8(1), 25–39. <https://doi.org/10.1007/BF02778005>
- Bakota, L., & Brandt, R. (2016). Tau Biology and Tau-Directed Therapies for Alzheimer's Disease. *Drugs*, 76(3), 301–313. <https://doi.org/10.1007/S40265-015-0529-0>
- Baliou, S., Adamaki, M., Kyriakopoulos, A. M., Spandidos, D. A., Panayiotidis, M., Christodoulou, I., & Zoumpourlis, V. (2018). CRISPR therapeutic tools for complex genetic disorders and cancer (Review). *International Journal of Oncology*, 53(2), 443. <https://doi.org/10.3892/IJO.2018.4434>
- Banerjee, G., Farmer, S. F., Hyare, H., Jaunmuktane, Z., Mead, S., Ryan, N. S., Schott, J. M., Werring, D. J., Rudge, P., & Collinge, J. (2024). Iatrogenic Alzheimer's disease in recipients of cadaveric pituitary-derived growth hormone. *Nature Medicine*, 30(2), 394–402. <https://doi.org/10.1038/s41591-023-02729-2>
- Battaglia, F., Quartarone, A., Rizzo, V., Ghilardi, M. F., Di Rocco, A., Tortorella, G., & Girlanda, P. (2008). Early impairment of synaptic plasticity in patients with Down's syndrome. *Neurobiology of Aging*, 29(8), 1272–1275. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2007.02.025>
- Bellenguez, C., Küçükali, F., Jansen, I. E., Kleindam, L., Moreno-Grau, S., Amin, N., Naj, A. C., Campos-Martin, R., Grenier-Boley, B., Andrade, V., Holmans, P. A., Boland, A., Damotte, V., van der Lee, S. J., Costa, M. R., Kuulasmaa, T., Yang, Q., de Rojas, I., Bis, J. C., ... Lambert, J. C. (2022). New insights into the genetic etiology of Alzheimer's disease and related dementias. *Nature Genetics* 2022 54:4, 54(4), 412–436. <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01024-z>
- Bhutta, M. S., McInerney, C. J., & Gould, G. W. (2014). ESCRT Function in Cytokinesis: Location, Dynamics and Regulation by Mitotic Kinases. *International Journal of Molecular Sciences* 2014, Vol. 15, Pages 21723-21739, 15(12), 21723–21739. <https://doi.org/10.3390/IJMS151221723>

- Bin-Jumah, M. N., Nadeem, M. S., Gilani, S. J., Al-Abbasi, F. A., Ullah, I., Alzarea, S. I., Ghoneim, M. M., Alshehri, S., Uddin, A., Murtaza, B. N., & Kazmi, I. (2022). Genes and Longevity of Lifespan. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1499. <https://doi.org/10.3390/IJMS23031499>
- Birey, F., Andersen, J., Makinson, C. D., Islam, S., Wei, W., Huber, N., Fan, H. C., Metzler, K. R. C., Panagiotakos, G., Thom, N., O'Rourke, N. A., Steinmetz, L. M., Bernstein, J. A., Hallmayer, J., Huguenard, J. R., & Pasca, S. P. (2017). Assembly of functionally integrated human forebrain spheroids. *Nature*, 545(7652), 54–59. <https://doi.org/10.1038/NATURE22330>
- Bolduc, D. M., Montagna, D. R., Seghers, M. C., Wolfe, M. S., & Selkoe, D. J. (2016). The amyloid-beta forming tripeptide cleavage mechanism of γ -secretase. *ELife*, 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.17578>
- Bonda, D. J., Bajić, V. P., Spremo-Potparevic, B., Casadesus, G., Zhu, X., Smith, M. A., & Lee, H. G. (2010). Review: Cell cycle aberrations and neurodegeneration. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 36(2), 157. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2010.01064.x>
- Bourdenx, M., Koulakiotis, N. S., Sanoudou, D., Bezard, E., Dehay, B., & Tsarboboulos, A. (2017). Protein aggregation and neurodegeneration in prototypical neurodegenerative diseases: Examples of amyloidopathies, tauopathies and synucleinopathies. *Progress in Neurobiology*, 155, 171–193. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.07.003>
- Braak, H., & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica*, 82(4), 239–259. <https://doi.org/10.1007/BF00308809>
- Breijyeh, Z., & Karaman, R. (2020). Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules*, 25(24). <https://doi.org/10.3390/molecules25245789>
- Brookhouser, N., Raman, S., Potts, C., & Brafman, D. A. (2017). May I Cut in? Gene Editing Approaches in Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cells*, 6(1). <https://doi.org/10.3390/cells6010005>
- Brundin, P., Melki, R., & Kopito, R. (2010). Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(4), 301–307. <https://doi.org/10.1038/nrm2873>
- Caiazzo, M., Giannelli, S., Valente, P., Lignani, G., Carissimo, A., Sessa, A., Colasante, G., Bartolomeo, R., Massimino, L., Ferroni, S., Settembre, C., Benfenati, F., & Broccoli, V. (2015). Direct Conversion of Fibroblasts into Functional Astrocytes by Defined Transcription Factors. *Stem Cell Reports*, 4(1), 25. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.12.002>
- Cam, M., Durieu, E., Bodin, M., Manousopoulou, A., Koslowski, S., Vasylieva, N., Barnych, B., Hammock, B. D., Bohl, B., Koch, P., Omori, C., Yamamoto, K., Hata, S., Suzuki, T., Karg, F., Gizzi, P., Haber, V. E., Bencetic Mihaljevic, V., Tavcar, B.,

- ... Meijer, L. (2018). Induction of Amyloid- β 42 Production by Fipronil and Other Pyrazole Insecticides HHS Public Access. *J Alzheimers Dis*, 62(4), 1663–1681. <https://doi.org/10.3233/JAD-170875>
- Caruso, C., Ligotti, M. E., Accardi, G., Aiello, A., Duro, G., Galimberti, D., & Candore, G. (2022). How Important Are Genes to Achieve Longevity? *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10). <https://doi.org/10.3390/IJMS23105635>
- Castiglione, H., Vigneron, P. A., Baquerre, C., Yates, F., Rontard, J., & Honegger, T. (2022). Human Brain Organoids-on-Chip: Advances, Challenges, and Perspectives for Preclinical Applications. *Pharmaceutics* 2022, Vol. 14, Page 2301, 14(11), 2301. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS14112301>
- Centeno, E. G. Z., Cimarosti, H., & Bithell, A. (2018). 2D versus 3D human induced pluripotent stem cell-derived cultures for neurodegenerative disease modelling. *Molecular Neurodegeneration*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/S13024-018-0258-4>
- Chanoumidou, K., Hernández-Rodríguez, B., Windener, F., Thomas, C., Stehling, M., Mozafari, S., Albrecht, S., Ottoboni, L., Antel, J., Kim, K. P., Velychko, S., Cui, Q. L., Xu, Y. K. T., Martino, G., Winkler, J., Schöler, H. R., Baron-Van Evercooren, A., Boespflug-Tanguy, O., Vaquerizas, J. M., ... Kuhlmann, T. (2021). One-step Reprogramming of Human Fibroblasts into Oligodendrocyte-like Cells by SOX10, OLIG2, and NKX6.2. *Stem Cell Reports*, 16(4), 771–783. <https://doi.org/10.1016/J.STEMCR.2021.03.001>
- Chen, G.-F., Xu, T.-H., Yan, Y., Zhou, Y.-R., Jiang, Y., Melcher, K., & Xu, E. (2017). Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development. *Nature Publishing Group*, 38, 1205–1235. <https://doi.org/10.1038/aps.2017.28>
- Chen, X., Sun, G., Tian, E., Zhang, M., Davtyan, H., Beach, T. G., Reiman, E. M., Blurton-Jones, M., Holtzman, D. M., & Shi, Y. (2021). Modeling Sporadic Alzheimer's Disease in Human Brain Organoids under Serum Exposure. *Advanced Science*, 8(18), 2101462. <https://doi.org/10.1002/ADVS.202101462>
- Chen, Y., McPhie, D. L., Hirschberg, J., & Neve, R. L. (2000). The Amyloid Precursor Protein-binding Protein APP-BP1 Drives the Cell Cycle through the S-M Checkpoint and Causes Apoptosis in Neurons. *Journal of Biological Chemistry*, 275(12), 8929–8935. <https://doi.org/10.1074/JBC.275.12.8929>
- Colombo, A., Bastone, A., Ploia, C., Scip, A., Salmona, M., Forloni, G., & Borsello, T. (2009). JNK regulates APP cleavage and degradation in a model of Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease*, 33(3), 518–525. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2008.12.014>
- Conde, C., & Cáceres, A. (2009). Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nature Reviews. Neuroscience*, 10(5), 319–332. <https://doi.org/10.1038/NRN2631>

- Contestabile, A., Fila, T., Ceccarelli, C., Bonasoni, P., Bonapace, L., Santini, D., Bartesaghi, R., & Ciani, E. (2007). Cell cycle alteration and decreased cell proliferation in the hippocampal dentate gyrus and in the neocortical germinal matrix of fetuses with Down syndrome and in Ts65Dn mice. *Hippocampus*, *17*(8), 665–678. <https://doi.org/10.1002/HIPO.20308>
- Crowell, E. F., Gaffuri, A. L., Gayraud-Morel, B., Tajbakhsh, S., & Echard, A. (2014). Engulfment of the midbody remnant after cytokinesis in mammalian cells. *Journal of Cell Science*, *127*(Pt 17), 3840–3851. <https://doi.org/10.1242/JCS.154732>
- Currais, A., Hortobágyi, T., & Soriano, S. (2009). The neuronal cell cycle as a mechanism of pathogenesis in Alzheimer's disease. *Aging*, *1*(4), 363. <https://doi.org/10.18632/AGING.100045>
- Damjanov, I., & Andrews, P. W. (2007). The terminology of teratocarcinomas and teratomas. *Nature Biotechnology* 2007 *25:11*, *25*(11), 1212–1212. <https://doi.org/10.1038/nbt1107-1212a>
- Daviaud, N., Friedel, R. H., & Zou, H. (2018). Vascularization and Engraftment of Transplanted Human Cerebral Organoids in Mouse Cortex. *ENeuro*, *5*(6), ENEURO.0219-18.2018. <https://doi.org/10.1523/ENeuro.0219-18.2018>
- Davis, R. P., Nemes, C., Varga, E., Freund, C., Kosmidis, G., Gkatzis, K., de Jong, D., Szuhai, K., Dinnyés, A., & Mummery, C. L. (2013). Generation of induced pluripotent stem cells from human foetal fibroblasts using the Sleeping Beauty transposon gene delivery system. *Differentiation*, *86*(1–2), 30–37. <https://doi.org/10.1016/j.DIFF.2013.06.002>
- Dehay, C., & Kennedy, H. (2007). Cell-cycle control and cortical development. *Nature Reviews. Neuroscience*, *8*(6), 438–450. <https://doi.org/10.1038/NRN2097>
- Dranovsky, A., Oxberry, W., Lyubsky, S., & Goldgaber, D. (1996). APP is associated with mitotic centrosomes and a distinct cytoplasmic network which colocalizes with depolymerized tubulin. *Neurobiology of Aging*, *17*, S196. <https://www.infona.pl//resource/bwmeta1.element.elsevier-1c63ce03-1c12-317d-adbc-dbacbcad2f12>
- Dubreuil, V., Marzesco, A. M., Corbeil, D., Huttner, W. B., & Wilsch-Bräuninger, M. (2007). Midbody and primary cilium of neural progenitors release extracellular membrane particles enriched in the stem cell marker prominin-1. *The Journal of Cell Biology*, *176*(4), 483–495. <https://doi.org/10.1083/JCB.200608137>
- Dyer, S. M., Harrison, S. L., Laver, K., Whitehead, C., & Crotty, M. (2018). An overview of systematic reviews of pharmacological and non-pharmacological interventions for the treatment of behavioral and psychological symptoms of dementia. *International Psychogeriatrics*, *30*(3), 295–309. <https://doi.org/10.1017/S1041610217002344>
- Ebell, M. H., Barry, H. C., Baduni, K., & Grasso, G. (2024). Clinically Important Benefits and Harms of Monoclonal Antibodies Targeting Amyloid for the

- Treatment of Alzheimer Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Annals of Family Medicine*, 22(1), 50–62. <https://doi.org/10.1370/AFM.3050/-/DC1>
- Ehrlich, M., Mozafari, S., Glatza, M., Starost, L., Velychko, S., Hallmann, A. L., Cui, Q. L., Schambach, A., Kim, K. P., Bachelin, C., Marteyn, A., Hargus, G., Johnson, R. M., Antel, J., Sternecker, J., Zaehres, H., Schöler, H. R., Baron-Van Evercooren, A., & Kuhlmann, T. (2017). Rapid and efficient generation of oligodendrocytes from human induced pluripotent stem cells using transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(11), E2243–E2252. https://doi.org/10.1073/PNAS.1614412114/SUPPL_FILE/PNAS.201614412SI.PDF
- Eiraku, M., Watanabe, K., Matsuo-Takasaki, M., Kawada, M., Yonemura, S., Matsumura, M., Wataya, T., Nishiyama, A., Muguruma, K., & Sasai, Y. (2008). Self-Organized Formation of Polarized Cortical Tissues from ESCs and Its Active Manipulation by Extrinsic Signals. *Cell Stem Cell*, 3(5), 519–532. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.09.002>
- Eisele, Y. S., Bolmont, T., Heikenwalder, M., Langer, F., Jacobson, L. H., Yan, Z. X., Roth, K., Aguzzi, A., Staufenbiel, M., Walker, L. C., & Jucker, M. (2009). Induction of cerebral β -amyloidosis: Intracerebral versus systemic A β inoculation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(31), 12926–12931. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0903200106/ASSET/0650CB9C-9622-4E8E-BC49-C1A3F15805E4/ASSETS/GRAPHIC/ZPQ9990987990002.JPEG>
- Elia, N., Fabrikant, G., Kozlov, M. M., & Lippincott-Schwartz, J. (2012). Computational Model of Cytokinetic Abscission Driven by ESCRT-III Polymerization and Remodeling. *Biophysical Journal*, 102(10), 2309. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.04.007>
- Esquerda-Canals, G., Montoliu-Gaya, L., Güell-Bosch, J., & Villegas, S. (2017). Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD*, 57(4), 1171–1183. <https://doi.org/10.3233/JAD-170045>
- Ettinger, A. W., Wilsch-Bräuninger, M., Marzesco, A. M., Bickle, M., Lohmann, A., Maliga, Z., Karbanová, J., Corbeil, D., Hyman, A. A., & Huttner, W. B. (2011). Proliferating versus differentiating stem and cancer cells exhibit distinct midbody-release behaviour. *Nature Communications*, 2(1). <https://doi.org/10.1038/NCOMMS1511>
- Evans, M. J., & Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819), 154–156. <https://doi.org/10.1038/292154a0>
- Fabbro, M., Zhou, B. B., Takahashi, M., Sarcevic, B., Lal, P., Graham, M. E., Gabrielli, B. G., Robinson, P. J., Nigg, E. A., Ono, Y., & Khanna, K. K. (2005). Cdk1/Erk2-

- and Plk1-dependent phosphorylation of a centrosome protein, Cep55, is required for its recruitment to midbody and cytokinesis. *Developmental Cell*, 9(4), 477–488. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2005.09.003>
- Fair, S. R., Julian, D., Hartlaub, A. M., Pusuluri, S. T., Malik, G., Summerfield, T. L., Zhao, G., Hester, A. B., Ackerman, W. E., Hollingsworth, E. W., Ali, M., McElroy, C. A., Buhimschi, I. A., Imitola, J., Maitre, N. L., Bedrosian, T. A., & Hester, M. E. (2020). Electrophysiological Maturation of Cerebral Organoids Correlates with Dynamic Morphological and Cellular Development. *Stem Cell Reports*, 15(4), 855. <https://doi.org/10.1016/J.STEMCR.2020.08.017>
- Feigin, V. L., Vos, T., Nichols, E., Owolabi, M. O., Carroll, W. M., Dichgans, M., Deuschl, G., Parmar, P., Brainin, M., & Murray, C. (2020). The global burden of neurological disorders: translating evidence into policy. *The Lancet. Neurology*, 19(3), 255. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30411-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30411-9)
- Flemming, W., & Flemming, W. (1882). Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung. In *Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung* /. F.C.W. Vogel. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.168645>
- Fligor, C. M., Lavekar, S. S., Harkin, J., Shields, P. K., VanderWall, K. B., Huang, K. C., Gomes, C., & Meyer, J. S. (2021). Extension of retinofugal projections in an assembled model of human pluripotent stem cell-derived organoids. *Stem Cell Reports*, 16(9), 2228–2241. <https://doi.org/10.1016/J.STEMCR.2021.05.009>
- Frisoni, G. B., Altomare, D., Thal, D. R., Ribaldi, F., van der Kant, R., Ossenkoppele, R., Blennow, K., Cummings, J., van Duijn, C., Nilsson, P. M., Dietrich, P. Y., Scheltens, P., & Dubois, B. (2022). The probabilistic model of Alzheimer disease: the amyloid hypothesis revised. *Nature Reviews. Neuroscience*, 23(1), 53. <https://doi.org/10.1038/S41583-021-00533-W>
- Frosk, P., Arts, H. H., Philippe, J., Gunn, C. S., Brown, E. L., Chodirker, B., Simard, L., Majewski, J., Fahiminiya, S., Russell, C., Liu, Y. P., Hegele, R., Katsanis, N., Goerz, C., Del Bigio, M. R., & Davis, E. E. (2017). A truncating mutation in CEP55 is the likely cause of MARCH, a novel syndrome affecting neuronal mitosis. *Journal of Medical Genetics*, 54(7), 490–501. <https://doi.org/10.1136/JMEDGENET-2016-104296>
- Fu, L., Yamamoto, Y., Seyama, R., Matsuzawa, N., Nagaoka, M., Yao, T., Hamada, K., Ogata, K., Suzuki, T., Tsuchida, N., Uchiyama, Y., Koshimizu, E., Misawa, K., Miyatake, S., Mizuguchi, T., Fujita, A., Itakura, A., & Matsumoto, N. (2024). Biallelic missense CEP55 variants cause prenatal MARCH syndrome. *Journal of Human Genetics*. <https://doi.org/10.1038/S10038-024-01298-7>
- Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., & Hasegawa, M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 85(8), 348. <https://doi.org/10.2183/PJAB.85.348>

- Gale, S. A., Acar, D., & Daffner, K. R. (2018). Dementia. *American Journal of Medicine*, 131(10), 1161–1169. <https://doi.org/10.1016/J.AMJMED.2018.01.022/ASSET/7C07D07D-755F-4273-8899-65623B5A3472/MAIN.ASSETS/GR3.SML>
- Galli, C., Piccini, A., Ciotti, M. T., Castellani, L., Calissano, P., Zaccheo, D., & Tabaton, M. (1998). Increased amyloidogenic secretion in cerebellar granule cells undergoing apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(3), 1247. <https://doi.org/10.1073/PNAS.95.3.1247>
- Gao, Q. S., Memmott, J., Lafyatis, R., Stamm, S., Sreaton, G., & Andreadis, A. (2000). Complex Regulation of Tau Exon 10, Whose Missplicing Causes Frontotemporal Dementia. *Journal of Neurochemistry*, 74(2), 490–500. <https://doi.org/10.1046/J.1471-4159.2000.740490.X>
- Gary, C., Lam, S., Hérard, A. S., Koch, J. E., Petit, F., Gipchtein, P., Sawiak, S. J., Caillierez, R., Eddarkaoui, S., Colin, M., Aujard, F., Deslys, J. P., Brouillet, E., Buée, L., Comoy, E. E., Pifferi, F., Picq, J. L., & Dhenain, M. (2019). Encephalopathy induced by Alzheimer brain inoculation in a non-human primate. *Acta Neuropathologica Communications*, 7(1), 126. <https://doi.org/10.1186/S40478-019-0771-X/FIGURES/7>
- Gibieža, P., & Petrikaitė, V. (2021). The regulation of actin dynamics during cell division and malignancy. *American Journal of Cancer Research*, 11(9), 4050. [/pmc/articles/PMC8493394/](https://doi.org/10.1186/S40478-019-0771-X/FIGURES/7)
- Ginhoux, F., & Prinz, M. (2015). Origin of Microglia: Current Concepts and Past Controversies. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(8), a020537. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A020537>
- Goedert, M., Spillantini, M. G., Jakes, R., Rutherford, D., & Crowther, R. A. (1989). Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron*, 3(4), 519–526. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(89\)90210-9](https://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90210-9)
- Gonzalez, C. ;, Armijo, E. ;, Bravo-Alegria, J. ;, Becerra-Calixto, A. ;, Mays, C. E. ;, & Soto, C. ; (2018). Modeling amyloid beta and tau pathology in human cerebral organoids. *Molecular Psychiatry*, 176(5), 139–148. <https://doi.org/10.1038/s41380-018-0229-8.Modeling>
- Gordon, A., Yoon, S. J., Tran, S. S., Makinson, C. D., Park, J. Y., Andersen, J., Valencia, A. M., Horvath, S., Xiao, X., Huguenard, J. R., Pasca, S. P., & Geschwind, D. H. (2021). Long-term maturation of human cortical organoids matches key early postnatal transitions. *Nature Neuroscience*, 24(3), 331–342. <https://doi.org/10.1038/s41593-021-00802-y>
- Gosselet, F. (2012). Apolipoprotéine E et intégrité de la barrière hémato-encéphalique. *Médecine/Sciences*, 28(11), 920–923. <https://doi.org/10.1051/MEDSCI/20122811006>

- Grabundzija, I., Wang, J., Sebe, A., Erdei, Z., Kajdi, R., Devaraj, A., Steinemann, D., Szuhai, K., Stein, U., Cantz, T., Schambach, A., Baum, C., Izsvák, Z., Sarkadi, B., & Ivics, Z. (2013). Sleeping Beauty transposon-based system for cellular reprogramming and targeted gene insertion in induced pluripotent stem cells. *Nucleic Acids Research*, *41*(3), 1829. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKS1305>
- Haass, C., Kaether, C., Thinakaran, G., & Sisodia, S. (2012). Trafficking and Proteolytic Processing of APP. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *2*(5), a006270. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A006270>
- Halliwel, J. A., Frith, T. J. R., Laing, O., Price, C. J., Bower, O. J., Stavish, D., Gokhale, P. J., Hewitt, Z., El-Khamisy, S. F., Barbaric, I., & Andrews, P. W. (2020). Nucleosides Rescue Replication-Mediated Genome Instability of Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*, *14*(6), 1009–1017. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.04.004>
- Halliwel, J., Barbaric, I., & Andrews, P. W. (2020). Acquired genetic changes in human pluripotent stem cells: origins and consequences. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *21*(12), 715–728. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00292-z>
- Hamaguchi, T., Eisele, Y. S., Varvel, N. H., Lamb, B. T., Walker, L. C., & Jucker, M. (2012). The presence of A β seeds, and not age per se, is critical to the initiation of A β deposition in the brain. *Acta Neuropathologica*, *123*(1), 31–37. <https://doi.org/10.1007/S00401-011-0912-1>
- Hamaguchi, T., Taniguchi, Y., Sakai, K., Kitamoto, T., Takao, M., Murayama, S., Iwasaki, Y., Yoshida, M., Shimizu, H., Kakita, A., Takahashi, H., Suzuki, H., Naiki, H., Sanjo, N., Mizusawa, H., & Yamada, M. (2016). Significant association of cadaveric dura mater grafting with subpial A β deposition and meningeal amyloid angiopathy. *Acta Neuropathologica*, *132*(2), 313–315. <https://doi.org/10.1007/S00401-016-1588-3>
- Hanger, D. P., Anderton, B. H., & Noble, W. (2009). Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends in Molecular Medicine*, *15*(3), 112–119. <https://doi.org/10.1016/J.MOLMED.2009.01.003>
- Hardy, J. A., & Higgins, G. A. (1992). Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis. *Science*, *256*(5054), 184–185. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1566067/ASSET/74A758CB-215F-4A8E-9AAA-05F4D89DA62A/ASSETS/SCIENCE.1566067.FP.PNG>
- Harrison, R. G., Greenman, M. J., Mall, F. P., & Jackson, C. M. (1907). Observations of the living developing nerve fiber. *The Anatomical Record*, *1*(5), 116–128. <https://doi.org/10.1002/AR.1090010503>
- Hattori, Y. (2021). The behavior and functions of embryonic microglia. *Anatomical Science International*, *97*(1), 1. <https://doi.org/10.1007/S12565-021-00631-W>

- Hazel, T., & Müller, T. (1997). Culture of Neuroepithelial Stem Cells. *Current Protocols in Neuroscience*, 00(1), 3.1.1-3.1.6. <https://doi.org/10.1002/0471142301.NS0301S00>
- Hefter, D., Ludewig, S., Draguhn, A., & Korte, M. (2020). Amyloid, APP, and Electrical Activity of the Brain. *The Neuroscientist*, 26(3), 231–251. <https://doi.org/10.1177/1073858419882619>
- Heintz, N. (1993). Cell death and the cell cycle: a relationship between transformation and neurodegeneration? *Trends in Biochemical Sciences*, 18(5), 157–159. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(93\)90103-T](https://doi.org/10.1016/0968-0004(93)90103-T)
- Heng, Y. W., & Koh, C. G. (2010). Actin cytoskeleton dynamics and the cell division cycle. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(10), 1622–1633. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCEL.2010.04.007>
- Hernández, F., Gómez De Barreda, E., Fuster-Matanzo, A., Lucas, J. J., & Avila, J. (2009). *GSK3: A possible link between beta amyloid peptide and tau protein*. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.09.011>
- Hirano, A., & Kurimura, T. (1974). Virally transformed cells and cytochalasin B: I. The effect of cytochalasin B on cytokinesis, karyokinesis and DNA synthesis in cells. *Experimental Cell Research*, 89(1), 111–120. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(74\)90193-1](https://doi.org/10.1016/0014-4827(74)90193-1)
- Hochard, A., Oumata, N., Bettayeb, K., Gloulou, O., Fant, X., Durieu, E., Buron, N., Porceddu, M., Borgne-Sanchez, A., Galons, H., Flajolet, M., & Meijer, L. (2013). Aftins Increase Amyloid- β 42 , Lower Amyloid- β 38 , and Do Not Alter Amyloid- β 40 Extracellular Production in vitro: Toward a Chemical Model of Alzheimer's Disease? HHS Public Access. *J Alzheimers Dis*, 35(1), 107–120. <https://doi.org/10.3233/JAD-121777>
- Hohmann, T., & Dehghani, F. (2019). The Cytoskeleton-A Complex Interacting Meshwork. *Cells*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/CELLS8040362>
- Honda, T., Nihonmatsu, N., Yasutake, K., Ohtake, A., Sato, K., Tanaka, S., Murayama, O., Murayama, M., & Takashima, A. (2000). Familial Alzheimer's disease-associated mutations block translocation of full-length presenilin 1 to the nuclear envelope. *Neuroscience Research*, 37(2), 101–111. [https://doi.org/10.1016/S0168-0102\(00\)00106-1](https://doi.org/10.1016/S0168-0102(00)00106-1)
- Hopkins, A. M., De Laporte, L., Tortelli, F., Spedden, E., Staii, C., Atherton, T. J., Hubbell, J. A., & Kaplan, D. L. (2013). Silk Hydrogels as Soft Substrates for Neural Tissue Engineering. *Advanced Functional Materials*, 23(41), 5140–5149. <https://doi.org/10.1002/ADFM.201300435>
- Hopkins, A. M., DeSimone, E., Chwalek, K., & Kaplan, D. L. (2015). 3D in vitro modeling of the central nervous system. *Progress in Neurobiology*, 0, 1. <https://doi.org/10.1016/J.PNEUROBIO.2014.11.003>

- Hsu, P. D., Lander, E. S., & Zhang, F. (2014). Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell*, 157(6), 1262–1278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>
- Huang, Y., & Mahley, R. W. (2014). Apolipoprotein E: Structure and Function in Lipid Metabolism, Neurobiology, and Alzheimer's Diseases. *Neurobiology of Disease*, 72PA(Part A), 3. <https://doi.org/10.1016/J.NBD.2014.08.025>
- Iourov, I. Y., Liehr, T., Vorsanova, S. G., Kolotii, A. D., & Yurov, Y. B. (2006). Visualization of interphase chromosomes in postmitotic cells of the human brain by multicolour banding (MCB). *Chromosome Research: An International Journal on the Molecular, Supramolecular and Evolutionary Aspects of Chromosome Biology*, 14(3), 223–229. <https://doi.org/10.1007/S10577-006-1037-6>
- Iqbal, K., Wiśniewski, H. M., Shelanski, M. L., Brostoff, S., Liwnicz, B. H., & Terry, R. D. (1974). Protein changes in senile dementia. *Brain Research*, 77(2), 337–343. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(74\)90798-7](https://doi.org/10.1016/0006-8993(74)90798-7)
- Ishikawa, M., & Hasebe, M. (2015). Cell cycle reentry from the late S phase: implications from stem cell formation in the moss *Physcomitrella patens*. *Journal of Plant Research*, 128(3), 399–405. <https://doi.org/10.1007/S10265-015-0713-Z>
- Itchimouh, S., Khabtou, K., Mahdaoui, S., Boufettal, H., & Samouh, N. (2016). Syndrome de Meckel Gruber: à propos d'un cas rare. *The Pan African Medical Journal*, 25, 1937–8688. <https://doi.org/10.11604/PAMJ.2016.25.43.9696>
- Iwasaki, Y., Imamura, K., Iwai, K., Kobayashi, Y., Akagi, A., Mimuro, M., Miyahara, H., Kitamoto, T., & Yoshida, M. (2018). Autopsied case of non-plaque-type dura mater graft-associated Creutzfeldt-Jakob disease presenting with extensive amyloid- β deposition. *Neuropathology*, 38(5), 549–556. <https://doi.org/10.1111/NEUP.12503>
- Janicki, S. M., & Monteiro, M. J. (1999). Presenilin overexpression arrests cells in the G1 phase of the cell cycle. Arrest potentiated by the Alzheimer's disease PS2(N141I)mutant. *The American Journal of Pathology*, 155(1), 135–144. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65108-5](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65108-5)
- Jaunmuktane, Z., Mead, S., Ellis, M., Wadsworth, J. D. F., Nicoll, A. J., Kenny, J., Launchbury, F., Linehan, J., Richard-Loendt, A., Walker, A. S., Rudge, P., Collinge, J., & Brandner, S. (2015). Evidence for human transmission of amyloid- β pathology and cerebral amyloid angiopathy. *Nature*, 525(7568), 247–250. <https://doi.org/10.1038/NATURE15369>
- Jeffery, J., Neyt, C., Moore, W., Paterson, S., Bower, N. I., Chenevix-Trench, G., Verkade, H., Hogan, B. M., & Khanna, K. K. (2015). Cep55 regulates embryonic growth and development by promoting Akt stability in zebrafish. *FASEB Journal*, 29(5), 1999–2009. <https://doi.org/10.1096/FJ.14-265090>

- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*, 337(6096), 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Johnsingh, A. A., Johnston, J. M., Merz, G., Xu, J., Kotula, L., Jacobsen, J. S., & Tezapsidis, N. (2000). Altered binding of mutated presenilin with cytoskeleton-interacting proteins. *FEBS Letters*, 465(1), 53–58. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01664-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01664-6)
- Kabadi, S. V., & Faden, A. I. (2014). Selective CDK inhibitors: promising candidates for future clinical traumatic brain injury trials. *Neural Regeneration Research*, 9(17), 1578. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.141779>
- Kamishibahara, Y., Kawaguchi, H., & Shimizu, N. (2016). Rho kinase inhibitor Y-27632 promotes neuronal differentiation in mouse embryonic stem cells via phosphatidylinositol 3-kinase. *Neuroscience Letters*, 615, 44–49. <https://doi.org/10.1016/J.NEULET.2016.01.022>
- Kane, M. D., Lipinski, W. J., Callahan, M. J., Bian, F., Durham, R. A., Schwarz, R. D., Roher, A. E., & Walker, L. C. (2000). Evidence for Seeding of β -Amyloid by Intracerebral Infusion of Alzheimer Brain Extracts in β -Amyloid Precursor Protein-Transgenic Mice. *The Journal of Neuroscience*, 20(10), 3606. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-10-03606.2000>
- Karvelis, T., Gasiunas, G., Young, J., Bigelyte, G., Silanskas, A., Cigan, M., & Siksnys, V. (2015). Rapid characterization of CRISPR-Cas9 protospacer adjacent motif sequence elements. *Genome Biology*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/S13059-015-0818-7>
- Kasai, T., Suga, H., Sakakibara, M., Ozone, C., Matsumoto, R., Kano, M., Mitsumoto, K., Ogawa, K., Kodani, Y., Nagasaki, H., Inoshita, N., Sugiyama, M., Onoue, T., Tsunekawa, T., Ito, Y., Takagi, H., Hagiwara, D., Iwama, S., Goto, M., ... Arima, H. (2020). Hypothalamic Contribution to Pituitary Functions Is Recapitulated In Vitro Using 3D-Cultured Human iPS Cells. *Cell Reports*, 30(1), 18-24.e5. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2019.12.009>
- Katzman, R. (1976). The Prevalence and Malignancy of Alzheimer Disease: A Major Killer. *Archives of Neurology*, 33(4), 217–218. <https://doi.org/10.1001/ARCHNEUR.1976.00500040001001>
- Kim, C. K., Lee, Y. R., Ong, L., Gold, M., Kalali, A., & Sarkar, J. (2022). Alzheimer's Disease: Key Insights from Two Decades of Clinical Trial Failures. *Journal of Alzheimer's Disease*, 87(1), 83. <https://doi.org/10.3233/JAD-215699>
- Kim, H. Y., Lee, D. K., Chung, B. R., Kim, H. V., & Kim, Y. (2016). Intracerebroventricular Injection of Amyloid- β Peptides in Normal Mice to Acutely Induce Alzheimer-like Cognitive Deficits. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, 2016(109), 53308. <https://doi.org/10.3791/53308>

- Kleinsmith, L. J., & Pierce, G. B. (1964). MULTIPOTENTIALITY OF SINGLE EMBRYONAL CARCINOMA CELLS. *Cancer Research*, 24, 1544–1551. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14234000>
- Kong, D., Park, K. H., Kim, D. H., Kim, N. G., Lee, S. E., Shin, N., Kook, M. G., Kim, Y. B., & Kang, K. S. (2023). Cortical-blood vessel assembloids exhibit Alzheimer's disease phenotypes by activating glia after SARS-CoV-2 infection. *Cell Death Discovery* 2023 9:1, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41420-022-01288-8>
- Kook, M. G., Lee, S.-E., Shin, N., Kong, D., Kim, D.-H., Kim, M.-S., Kang, H. K., Choi, S. W., & Kang, K.-S. (2022). Generation of Cortical Brain Organoid with Vascularization by Assembling with Vascular Spheroid. *International Journal of Stem Cells*, 15(1), 85–94. <https://doi.org/10.15283/ijsc21157>
- Kovacs, G. G., Lutz, M. I., Ricken, G., Ströbel, T., Höftberger, R., Preusser, M., Regelsberger, G., Hönigschnabl, S., Reiner, A., Fischer, P., Budka, H., & Hainfellner, J. A. (2016). Dura mater is a potential source of A β seeds. *Acta Neuropathologica*, 131(6), 911–923. <https://doi.org/10.1007/S00401-016-1565-X>
- Kudryashov, D. S., & Reisler, E. (2013). ATP and ADP actin states. *Biopolymers*, 99(4), 245–256. <https://doi.org/10.1002/BIP.22155>
- Kun, A., González-Camacho, F., Hernández, S., Moreno-García, A., Calero, O., & Calero, M. (2018). Characterization of amyloid- β plaques and autofluorescent lipofuscin aggregates in alzheimer's disease brain: A confocal microscopy approach. *Methods in Molecular Biology*, 1779, 497–512. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7816-8_31
- Kuo, T. C., Chen, C. T., Baron, D., Onder, T. T., Loewer, S., Almeida, S., Weismann, C. M., Xu, P., Houghton, J. M., Gao, F. B., Daley, G. Q., & Doxsey, S. (2011). Midbody accumulation through evasion of autophagy contributes to cellular reprogramming and tumorigenicity. *Nature Cell Biology*, 13(10), 1214–1223. <https://doi.org/10.1038/NCB2332>
- Lacroix, B., & Maddox, A. S. (2012). Cytokinesis, ploidy and aneuploidy. *The Journal of Pathology*, 226(2), 338–351. <https://doi.org/10.1002/PATH.3013>
- Lafaurie-Janvore, J., & Piel, M. (2013). Mécanique et division cellulaire - Contrôle temporel de l'abscission. *Médecine/Sciences*, 29(12), 1089–1091. <https://doi.org/10.1051/MEDSCI/20132912009>
- Lancaster, M. A., & Knoblich, J. A. (2014). Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells. *Nature Protocols*, 9(10), 2329–2340. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.158>
- Lancaster, M. A., Renner, M., Martin, C. A., Wenzel, D., Bicknell, L. S., Hurles, M. E., Homfray, T., Penninger, J. M., Jackson, A. P., & Knoblich, J. A. (2013). Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature*, 501(7467), 373–379. <https://doi.org/10.1038/nature12517>

- Laszczyk, A. M., Fox-Quick, S., Vo, H. T., Nettles, D., Pugh, P. C., Overstreet-Wadiche, L., & King, G. D. (2017). Klotho regulates postnatal neurogenesis and protects against age-related spatial memory loss. *Neurobiology of Aging*, *59*, 41–54. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2017.07.008>
- Lee, C. S., Bishop, E. S., Zhang, R., Yu, X., Farina, E. M., Yan, S., Zhao, C., Zeng, Z., Shu, Y., Wu, X., Lei, J., Li, Y., Zhang, W., Yang, C., Wu, K., Wu, Y., Ho, S., Athiviraham, A., Lee, M. J., ... He, T. C. (2017). Adenovirus-mediated gene delivery: Potential applications for gene and cell-based therapies in the new era of personalized medicine. *Genes & Diseases*, *4*(2), 43. <https://doi.org/10.1016/J.GENDIS.2017.04.001>
- Lee, M. S., Kao, S. C., Lemere, C. A., Xia, W., Tseng, H. C., Zhou, Y., Neve, R., Ahlijanian, M. K., & Tsai, L. H. (2003). APP processing is regulated by cytoplasmic phosphorylation. *The Journal of Cell Biology*, *163*(1), 83. <https://doi.org/10.1083/JCB.200301115>
- Lemieux, M. R., Freigassner, B., Thathey, Z., Opp, M. R., Hoeffler, C. A., & Link, C. D. (2024). Multielectrode array characterization of human induced pluripotent stem cell derived neurons in co-culture with primary human astrocytes. *BioRxiv*, 2024.03.04.583341. <https://doi.org/10.1101/2024.03.04.583341>
- Lew, D. J. (2003). The morphogenesis checkpoint: how yeast cells watch their figures. *Current Opinion in Cell Biology*, *15*(6), 648–653. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2003.09.001>
- Li, J., Xu, M., Zhou, H., Ma, J., & Potter, H. (1997). Alzheimer presenilins in the nuclear membrane, interphase kinetochores, and centrosomes suggest a role in chromosome segregation. *Cell*, *90*(5), 917–927. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80356-6/ASSET/B7891AB6-DAB8-4826-A68E-4430166C4B74/MAIN.ASSETS/GR8.JPG](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80356-6/ASSET/B7891AB6-DAB8-4826-A68E-4430166C4B74/MAIN.ASSETS/GR8.JPG)
- Li, K., Rashid, T., Li, J., Honnorat, N., Nirmala, A. B., Fadaee, E., Wang, D., Charisis, S., Liu, H., Franklin, C., Maybrier, M., Katragadda, H., Abazid, L., Ganapathy, V., Valaparla, V. L., Bagudu, P., Vasquez, E., Solano, L., Clarke, G., ... Habes, M. (2023). Postmortem Brain Imaging in Alzheimer's Disease and Related Dementias: The South Texas Alzheimer's Disease Research Center Repository. *Journal of Alzheimer's Disease*, *96*(3), 1267. <https://doi.org/10.3233/JAD-230389>
- Li, L., & Murakami, S. (2023). Artificial Intelligence-Assisted Meta-Analysis of the Frequency of ACE I/D Polymorphisms in Centenarians and Other Long-Lived Individuals. *International Journal of Molecular Sciences*, *24*(4). <https://doi.org/10.3390/IJMS24043411>
- Li, X., Tao, Y., Bradley, R., Du, Z., Tao, Y., Kong, L., Dong, Y., Jones, J., Yan, Y., Harder, C. R. K., Friedman, L. M., Bilal, M., Hoffmann, B., & Zhang, S. C. (2018). Fast Generation of Functional Subtype Astrocytes from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*, *11*(4), 998–1008. <https://doi.org/10.1016/J.STEMCR.2018.08.019>

- Liao, J., Wu, Z., Wang, Y., Cheng, L., Cui, C., Gao, Y., Chen, T., Rao, L., Chen, S., Jia, N., Dai, H., Xin, S., Kang, J., Pei, G., & Xiao, L. (2008). Enhanced efficiency of generating induced pluripotent stem (iPS) cells from human somatic cells by a combination of six transcription factors. *Cell Research* 2008 18:5, 18(5), 600–603. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.51>
- Lim, G. P., Chu, T., Yang, F., Beech, W., Frautschy, S. A., & Cole, G. M. (2001). The Curry Spice Curcumin Reduces Oxidative Damage and Amyloid Pathology in an Alzheimer Transgenic Mouse. *The Journal of Neuroscience*, 21(21), 8370. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-21-08370.2001>
- Little, J. N., & Dwyer, N. D. (2021). Cep55: abscission boss or assistant? *Trends in Cell Biology*, 31(10), 789. <https://doi.org/10.1016/j.TCB.2021.07.006>
- Loh, Y. H., Wu, Q., Chew, J. L., Vega, V. B., Zhang, W., Chen, X., Bourque, G., George, J., Leong, B., Liu, J., Wong, K. Y., Sung, K. W., Lee, C. W. H., Zhao, X. D., Chiu, K. P., Lipovich, L., Kuznetsov, V. A., Robson, P., Stanton, L. W., ... Ng, H. H. (2006). The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nature Genetics* 2006 38:4, 38(4), 431–440. <https://doi.org/10.1038/ng1760>
- López-Rivera, J. A., Pérez-Palma, E., Symonds, J., Lindy, A. S., McKnight, D. A., Leu, C., Zuberi, S., Brunklaus, A., Møller, R. S., & Lal, D. (2020). A catalogue of new incidence estimates of monogenic neurodevelopmental disorders caused by de novo variants. *Brain*, 143(4), 1099. <https://doi.org/10.1093/BRAIN/AWAA051>
- Lucas, J. J., Hernández, F., Gómez-Ramos, P., Morán, M. A., Hen, R., & Avila, J. (2001). Decreased nuclear beta-catenin, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration in GSK-3beta conditional transgenic mice. *The EMBO Journal*, 20(1–2), 27–39. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/20.1.27>
- MacArthur, C. C., Fontes, A., Ravinder, N., Kuninger, D., Kaur, J., Bailey, M., Taliana, A., Vemuri, M. C., & Lieu, P. T. (2012). Generation of Human-Induced Pluripotent Stem Cells by a Nonintegrating RNA Sendai Virus Vector in Feeder-Free or Xeno-Free Conditions. *Stem Cells International*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/564612>
- Mandal, P. K., & Rossi, D. J. (2013). Reprogramming human fibroblasts to pluripotency using modified mRNA. *Nature Protocols* 2013 8:3, 8(3), 568–582. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.019>
- Mangeot, P. E., Risson, V., Fusil, F., Marnef, A., Laurent, E., Blin, J., Mournetas, V., Massouridès, E., Sohier, T. J. M., Corbin, A., Aubé, F., Teixeira, M., Pinset, C., Schaeffer, L., Legube, G., Cosset, F. L., Verhoeyen, E., Ohlmann, T., & Ricci, E. P. (2019). Genome editing in primary cells and in vivo using viral-derived Nanoblades loaded with Cas9-sgRNA ribonucleoproteins. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07845-z>

- Maresova, P., Hruska, J., Klimova, B., Barakovic, S., & Krejcar, O. (2020). *Clinical Interventions in Aging Activities of Daily Living and Associated Costs in the Most Widespread Neurodegenerative Diseases: A Systematic Review*. *Activities of Daily Living and Associated Costs in the Most Widespread Neurodegenerative Diseases: A Systematic Review*. <https://doi.org/10.2147/CIA.S264688>
- Marthiens, V., & Basto, R. (2014). Des centrosomes à la microcéphalie : suivez le lien. *Médecine/Sciences*, 30(02), 133–136. <https://doi.org/10.1051/MEDSCI/20143002006>
- 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*, 78(12), 7634–7638. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.12.7634>
- Marzesco, A. M., Janich, P., Wilsch-Bräuninger, M., Dubreuil, V., Langenfeld, K., Corbeil, D., & Huttner, W. B. (2005). Release of extracellular membrane particles carrying the stem cell marker prominin-1 (CD133) from neural progenitors and other epithelial cells. *Journal of Cell Science*, 118(Pt 13), 2849–2858. <https://doi.org/10.1242/JCS.02439>
- McMillan, J. N., Sia, R. A. L., & Lew, D. J. (1998). A Morphogenesis Checkpoint Monitors the Actin Cytoskeleton in Yeast. *The Journal of Cell Biology*, 142(6), 1487. <https://doi.org/10.1083/JCB.142.6.1487>
- McPhie, D. L., Coopersmith, R., Hines-Peralta, A., Chen, Y., Ivins, K. J., Manly, S. P., Kozlowski, M. R., Neve, K. A., & Neve, R. L. (2003). DNA Synthesis and Neuronal Apoptosis Caused by Familial Alzheimer Disease Mutants of the Amyloid Precursor Protein Are Mediated by the p21 Activated Kinase PAK3. *The Journal of Neuroscience*, 23(17), 6914. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-17-06914.2003>
- McRae, J. F., Clayton, S., Fitzgerald, T. W., Kaplanis, J., Prigmore, E., Rajan, D., Sifrim, A., Aitken, S., Akawi, N., Alvi, M., Ambridge, K., Barrett, D. M., Bayzatinova, T., Jones, P., Jones, W. D., King, D., Krishnappa, N., Mason, L. E., Singh, T., ... Hurles, M. E. (2017). Prevalence and architecture of de novo mutations in developmental disorders. *Nature*, 542(7642), 433–438. <https://doi.org/10.1038/NATURE21062>
- McShea, A., Lee, H. gon, Petersen, R. B., Casadesus, G., Vincent, I., Linford, N. J., Funk, J. O., Shapiro, R. A., & Smith, M. A. (2007). Neuronal cell cycle re-entry mediates Alzheimer disease-type changes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1772(4), 467–472. <https://doi.org/10.1016/J.BBADIS.2006.09.010>
- Meijer, L. (2006). Le cycle de division cellulaire et sa régulation. *Bulletin Du Cancer*, 93(4), 41–53. https://www.jle.com/fr/revues/bdc/e-docs/le_cycle_de_division_cellulaire_et_sa_regulation_268510/article.phtml?tab=texte

- Meunier, J., Borjini, N., Gillis, C., Villard, V., & Maurice, T. (2015). Brain Toxicity and Inflammation Induced In Vivo in Mice by the Amyloid- β Forty-Two Inducer Aftin-4, a Roscovitine Derivative. *Journal of Alzheimer's Disease*, *44*(2), 507–524. <https://doi.org/10.3233/JAD-140711>
- Miao, J., Ma, H., Yang, Y., Liao, Y., Lin, C., Zheng, J., Yu, M., & Lan, J. (2023). Microglia in Alzheimer's disease: pathogenesis, mechanisms, and therapeutic potentials. *Frontiers in Aging Neuroscience*, *15*, 1201982. <https://doi.org/10.3389/FNAGI.2023.1201982>
- Misra, B. B. (2020). The Chemical Exposome of Human Aging. *Frontiers in Genetics*, *11*, 574936. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2020.574936/BIBTEX>
- Miura, Y., Li, M. Y., Birey, F., Ikeda, K., Revah, O., Thete, M. V., Park, J. Y., Puno, A., Lee, S. H., Porteus, M. H., & Paşca, S. P. (2020). Generation of human striatal organoids and cortico-striatal assembloids from human pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*, *38*(12), 1421–1430. <https://doi.org/10.1038/S41587-020-00763-W>
- Miura, Y., Li, M. Y., Revah, O., Yoon, S. J., Narazaki, G., & Paşca, S. P. (2022). Engineering brain assembloids to interrogate human neural circuits. *Nature Protocols*, *17*(1), 15–35. <https://doi.org/10.1038/S41596-021-00632-Z>
- Moh, C., Kubiak, J. Z., Bajic, V. P., Zhu, X., Smith, M. A., & Lee, H. G. (2011). Cell Cycle Deregulation in the Neurons of Alzheimer's Disease. *Results and Problems in Cell Differentiation*, *53*, 565. https://doi.org/10.1007/978-3-642-19065-0_23
- Morales, R., Bravo-Alegria, J., Moreno-Gonzalez, I., Duran-Aniotz, C., Gamez, N., Edwards, G., & Soto, C. (2021). Transmission of cerebral amyloid pathology by peripheral administration of misfolded A β aggregates. *Molecular Psychiatry*, *26*(10), 5690. <https://doi.org/10.1038/S41380-021-01150-W>
- Morsch, R., Simon, W., & Coleman, P. D. (1999). Neurons may live for decades with neurofibrillary tangles. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, *58*(2), 188–197. <https://doi.org/10.1097/00005072-199902000-00008>
- Mosch, B., Morawski, M., Mittag, A., Lenz, D., Tarnok, A., & Arendt, T. (2007). Aneuploidy and DNA Replication in the Normal Human Brain and Alzheimer's Disease. *Journal of Neuroscience*, *27*(26), 6859–6867. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0379-07.2007>
- Mostofi, F. K., & Price, E. B. Jr. (1973). *Tumors of the Male Genital System: Atlas of Tumor Pathology*. Second Series Armed Forces Institute of Pathology Washington. <https://archive.org/details/tumorsofmalegeni0000most/mode/2up>
- Mullins, J. M., & Biesele, J. J. (1977). Terminal phase of cytokinesis in D-98s cells. *The Journal of Cell Biology*, *73*(3), 672–684. <https://doi.org/10.1083/JCB.73.3.672>
- Murray, A. W. (2004). Recycling the Cell Cycle: Cyclins Revisited. *Cell*, *116*(2), 221–234. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)01080-8/ASSET/053204A2-548D-4E67-B8E8-A60D27AC9635/MAIN.ASSETS/GR6.JPG](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)01080-8/ASSET/053204A2-548D-4E67-B8E8-A60D27AC9635/MAIN.ASSETS/GR6.JPG)

- Nagy, Z. (2007). The dysregulation of the cell cycle and the diagnosis of Alzheimer's disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1772(4), 402–408. <https://doi.org/10.1016/j.BBADIS.2006.11.001>
- Nakatake, Y., Fukui, N., Iwamatsu, Y., Masui, S., Takahashi, K., Yagi, R., Yagi, K., Miyazaki, J., Matoba, R., Ko, M. S. H., & Niwa, H. (2006). Klf4 Cooperates with Oct3/4 and Sox2 To Activate the Lefty1 Core Promoter in Embryonic Stem Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 26(20), 7772. <https://doi.org/10.1128/MCB.00468-06>
- Nandakumar, S., Rozich, E., & Buttitta, L. (2021). Cell Cycle Re-entry in the Nervous System: From Polyploidy to Neurodegeneration. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 698661. <https://doi.org/10.3389/FCCELL.2021.698661/BIBTEX>
- Narasimha, A. M., Kaulich, M., Shapiro, G. S., Choi, Y. J., Sicinski, P., & Dowdy, S. F. (2014). Cyclin D activates the Rb tumor suppressor by mono-phosphorylation. *ELife*, 3. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.02872>
- Nassor, F., Jarray, R., Biard, D. S. F., Maïza, A., Papy-Garcia, D., Pavoni, S., Deslys, J. P., & Yates, F. (2020). Long Term Gene Expression in Human Induced Pluripotent Stem Cells and Cerebral Organoids to Model a Neurodegenerative Disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2020.00014>
- Nemudryi, A. A., Valetdinova, K. R., Medvedev, S. P., & Zakian, S. M. (2014). TALEN and CRISPR/Cas Genome Editing Systems: Tools of Discovery. *Acta Naturae*, 6(3), 19. <https://doi.org/10.32607/20758251-2014-6-3-19-40>
- Nishiyama, A., Sharov, A. A., Piao, Y., Amano, M., Amano, T., Hoang, H. G., Binder, B. Y., Tapnio, R., Basse, U., Malinou, J. N., Correa-Cerro, L. S., Yu, H., Xin, L., Meyers, E., Zalzman, M., Nakatake, Y., Stagg, C., Sharova, L., Qian, Y., ... Ko, M. S. H. (2013). Systematic repression of transcription factors reveals limited patterns of gene expression changes in ES cells. *Scientific Reports* 2013 3:1, 3(1), 1–6. <https://doi.org/10.1038/srep01390>
- Noor, A., Saima Zafar, ·, Shafiq, M., Younas, N., Siegert, A., Mann, F. A., Kruss, S., Schmitz, M., Dihazi, H., Ferrer, I., Zerr, I., & Zafar, S. (2021). *Molecular Profiles of Amyloid-β Proteoforms in Typical and Rapidly Progressive Alzheimer's Disease*. 1, 3. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02566-9>
- Oceguera-Yanez, F., Kim, S. Il, Matsumoto, T., Tan, G. W., Xiang, L., Hatani, T., Kondo, T., Ikeya, M., Yoshida, Y., Inoue, H., & Woltjen, K. (2016). Engineering the AAVS1 locus for consistent and scalable transgene expression in human iPSCs and their differentiated derivatives. *Methods*, 101, 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.12.012>
- Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., & Yamanaka, S. (2008). Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors.

- Science*, 322(5903), 949–953.
https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1164270/SUPPL_FILE/OKITA.SOM.PDF
- Osaki, T., Sivathanu, V., & Kamm, R. D. (2018). Engineered 3D vascular and neuronal networks in a microfluidic platform. *Scientific Reports* 2018 8:1, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23512-1>
- Park, D. S., Kozaki, T., Tiwari, S. K., Moreira, M., Khalilnezhad, A., Torta, F., Olivié, N., Thiam, C. H., Liani, O., Silvin, A., Phoo, W. W., Gao, L., Triebel, A., Tham, W. K., Gonçalves, L., Kong, W. T., Raman, S., Zhang, X. M., Dunsmore, G., ... Ginhoux, F. (2023). iPS-cell-derived microglia promote brain organoid maturation via cholesterol transfer. *Nature* 2023 623:7986, 623(7986), 397–405. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06713-1>
- Park, I. H., Zhao, R., West, J. A., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T. A., Lerou, P. H., Lensch, M. W., & Daley, G. Q. (2007). Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 2007 451:7175, 451(7175), 141–146. <https://doi.org/10.1038/nature06534>
- Pavoni, S., Jarray, R., Nassor, F., Guyot, A.-C., Cottin, S., Rontard, J., Mikol, J., Mabondzo, A., Deslys, J.-P., & Yates, F. (2018). Small-molecule induction of A β -42 peptide production in human cerebral organoids to model Alzheimer's disease associated phenotypes. *PLOS ONE*, 13(12), e0209150. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209150>
- Perez-Corredor, P., Vanderleest, T. E., Vacano, G. N., Sanchez, J. S., Villalba-Moreno, N. D., Marino, C., Krasemann, S., Mendivil-Perez, M. A., Aguillón, D., Jiménez-Del-Río, M., Baena, A., Sepulveda-Falla, D., Lopera, F., Quiroz, Y. T., Arboleda-Velasquez, J. F., & Mazzarino, R. C. (2024). APOE3 Christchurch modulates β -catenin/Wnt signaling in iPS cell-derived cerebral organoids from Alzheimer's cases. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 17. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2024.1373568>
- Petronis, A. (1999). Alzheimer's disease and down syndrome: from meiosis to dementia. *Experimental Neurology*, 158(2), 403–413. <https://doi.org/10.1006/EXNR.1999.7128>
- Piaceri, I., Chiari, A., Galli, C., Bagnoli, S., Ferrari, C., Saavedra, S. T., Molinari, M. A., Vinceti, G., Sorbi, S., & Nacmias, B. (2020). Incomplete penetrance in familial Alzheimer's disease with PSEN1 Ala260Gly mutation. *Neurological Sciences: Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, 41(8), 2263–2266. <https://doi.org/10.1007/S10072-020-04421-6>
- Plath, K., & Lowry, W. E. (2011). Progress in understanding reprogramming to the induced pluripotent state. *Nature Reviews. Genetics*, 12(4), 253. <https://doi.org/10.1038/NRG2955>
- Pohl, C. (2009). Dual control of cytokinesis by the ubiquitin and autophagy pathways. *Autophagy*, 5(4), 561–562. <https://doi.org/10.4161/AUTO.5.4.8109>

- Pohl, C., & Jentsch, S. (2009). Midbody ring disposal by autophagy is a post-abscission event of cytokinesis. *Nature Cell Biology*, 11(1), 65–70. <https://doi.org/10.1038/NCB1813>
- Potter, H. (1991). Review and hypothesis: Alzheimer disease and Down syndrome-chromosome 21 nondisjunction may underlie both disorders. *American Journal of Human Genetics*, 48(6), 1192–1200. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1827946>
- Potter, H. (2005). Cell Cycle and Chromosome Segregation Defects in Alzheimer's Disease. *Cell-Cycle Mechanisms and Neuronal Cell Death*, 55–78. https://doi.org/10.1007/0-387-29390-6_5
- Prusiner, S. B. (1982). Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science (New York, N.Y.)*, 216(4542), 136–144. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.6801762>
- Purro, S. A., Farrow, M. A., Linehan, J., Nazari, T., Thomas, D. X., Chen, Z., Mengel, D., Saito, T., Saido, T., Rudge, P., Brandner, S., Walsh, D. M., & Collinge, J. (2018). Transmission of amyloid- β protein pathology from cadaveric pituitary growth hormone. *Nature*, 564(7736), 415–419. <https://doi.org/10.1038/S41586-018-0790-Y>
- Quist, E., Trovato, F., Avaliani, N., Zetterdahl, O. G., Gonzalez-Ramos, A., Hansen, M. G., Kokaia, M., Canals, I., & Ahlenius, H. (2022). Transcription factor-based direct conversion of human fibroblasts to functional astrocytes. *Stem Cell Reports*, 17(7), 1620. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2022.05.015>
- Raina, A. K., Monteiro, M. J., Mcshea, A., & Smith, M. A. (1999). The role of cell cycle-mediated events in Alzheimer's disease. *International Journal of Experimental Pathology*, 80(2), 71. <https://doi.org/10.1046/J.1365-2613.1999.00106.X>
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., & Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 8(11), 2281. <https://doi.org/10.1038/NPROT.2013.143>
- Rashidieh, B., Shohayeb, B., Bain, A. L., Fortuna, P. R. J., Sinha, D., Burgess, A., Mills, R., Adams, R. C., Lopez, J. A., Blumbergs, P., Finnie, J., Kalimutho, M., Piper, M., Hudson, J. E., Ng, D. C. H., & Khanna, K. K. (2021). Cep55 regulation of PI3K/Akt signaling is required for neocortical development and ciliogenesis. *PLoS Genetics*, 17(10), e1009334. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009334>
- Rath, O., & Kozielski, F. (2012). Kinesins and cancer. *Nature Reviews Cancer* 2012 12:8, 12(8), 527–539. <https://doi.org/10.1038/nrc3310>
- Rawlins, L. E., Jones, H., Wenger, O., Aye, M., Fasham, J., Harlalka, G. V., Chioza, B. A., Miron, A., Ellard, S., Wakeling, M., Crosby, A. H., & Baple, E. L. (2019). An Amish founder variant consolidates disruption of CEP55 as a cause of hydranencephaly and renal dysplasia. *European Journal of Human Genetics*, 27(4), 657. <https://doi.org/10.1038/S41431-018-0306-0>

- Reddy, P. H. (2011). Abnormal tau, mitochondrial dysfunction, impaired axonal transport of mitochondria, and synaptic deprivation in Alzheimer's disease. *Brain Research*, *1415*, 136–148. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2011.07.052>
- Revelas, M., Thalamuthu, A., Oldmeadow, C., Evans, T. J., Armstrong, N. J., Kwok, J. B., Brodaty, H., Schofield, P. R., Scott, R. J., Sachdev, P. S., Attia, J. R., & Mather, K. A. (2018). Review and meta-analysis of genetic polymorphisms associated with exceptional human longevity. *Mechanisms of Ageing and Development*, *175*, 24–34. <https://doi.org/10.1016/J.MAD.2018.06.002>
- Rosenblatt, J., Cramer, L. P., Baum, B., & McGee, K. M. (2004). Myosin II-dependent cortical movement is required for centrosome separation and positioning during mitotic spindle assembly. *Cell*, *117*(3), 361–372. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00341-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00341-1)
- Sabate-Soler, S., Nickels, S. L., Saraiva, C., Berger, E., Dubonyte, U., Barmapa, K., Lan, Y. J., Kouno, T., Jarazo, J., Robertson, G., Sharif, J., Koseki, H., Thome, C., Shin, J. W., Cowley, S. A., & Schwamborn, J. C. (2022). Microglia integration into human midbrain organoids leads to increased neuronal maturation and functionality. *Glia*, *70*(7), 1267–1288. <https://doi.org/10.1002/glia.24167>
- Said Halidi, K. N., Fontan, E., Boucharlat, A., Davignon, L., Charpentier, M., Boullé, M., Weil, R., Israël, A., Laplantine, E., & Agou, F. (2019). Two NEMO-like Ubiquitin-Binding Domains in CEP55 Differently Regulate Cytokinesis. *IScience*, *20*, 292–309. <https://doi.org/10.1016/J.ISCI.2019.08.042>
- SALLAM, H., JIMENEZ, P., SONG, H., VITA, M., CEDAZOMINGUEZ, A., & HASSAN, M. (2008). Age-dependent pharmacokinetics and effect of roscovitine on Cdk5 and Erk1/2 in the rat brain. *Pharmacological Research*, *58*(1), 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2008.05.010>
- Satyanarayana, A., & Kaldis, P. (2009). Mammalian cell-cycle regulation: several Cdks, numerous cyclins and diverse compensatory mechanisms. *Oncogene* *2009* *28*:33, *28*(33), 2925–2939. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.170>
- Schiel, J. A., Simon, G. C., Zaharris, C., Weisz, J., Castle, D., Wu, C. C., & Prekeris, R. (2012). FIP3-endosome-dependent formation of the secondary ingression mediates ESCRT-III recruitment during cytokinesis. *Nature Cell Biology*, *14*(10), 1068–1078. <https://doi.org/10.1038/NCB2577>
- Schindowski, K., Belarbi, K., Bretteville, A., Ando, K., & Buée, L. (2008). Neurogenesis and cell cycle-reactivated neuronal death during pathogenic tau aggregation. *Genes, Brain, and Behavior*, *7* Suppl 1(1), 92–100. <https://doi.org/10.1111/J.1601-183X.2007.00377.X>
- Scully, R. E. (1979). *Tumors of the ovary and maldeveloped gonads*. Second Series Armed Forces Institute of Pathology. https://esploro.libs.uga.edu/discovery/fulldisplay?docid=alma9921766723902959&context=L&vid=01GALI_UGA:UGA&lang=en&search_scope=MyInstituti

- on&adaptor=Local%20Search%20Engine&tab=LibraryCatalog&query=sub,exact,Ovarian%20Neoplasms%20--%20pathology&offset=0
- Shaker, M. R., Aguado, J., Chaggar, H. K., & Wolvetang, E. J. (2021). Klotho inhibits neuronal senescence in human brain organoids. *Npj Aging and Mechanisms of Disease*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41514-021-00070-x>
- Shin, J. H. (2022). Dementia Epidemiology Fact Sheet 2022. *Annals of Rehabilitation Medicine*, 46(2), 53. <https://doi.org/10.5535/ARM.22027>
- Shitamukai, A., & Matsuzaki, F. (2012). Control of asymmetric cell division of mammalian neural progenitors. *Development, Growth & Differentiation*, 54(3), 277–286. <https://doi.org/10.1111/J.1440-169X.2012.01345.X>
- Sloan, S. A., Andersen, J., Paşca, A. M., Birey, F., & Paşca, S. P. (2018). Generation and Assembly of Human Brain Region-Specific Three-Dimensional Cultures. *Nature Protocols*, 13(9), 2062. <https://doi.org/10.1038/S41596-018-0032-7>
- Sokol, D. K., & Lahiri, D. K. (2023). Neurodevelopmental disorders and microcephaly: how apoptosis, the cell cycle, tau and amyloid- β precursor protein APPLy. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 16, 1201723. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2023.1201723/BIBTEX>
- Soufi, A., Donahue, G., & Zaret, K. S. (2012). Facilitators and Impediments of the Pluripotency Reprogramming Factors' Initial Engagement with the Genome. *Cell*, 151(5), 994. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2012.09.045>
- Spengler, B. A., Biedler, J. L., & Ross, R. A. (2002). A corrected karyotype for the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 138(2), 177–178. [https://doi.org/10.1016/S0165-4608\(02\)00523-X](https://doi.org/10.1016/S0165-4608(02)00523-X)
- Spremo-Potparević, B., Živković, L., Djelić, N., Plećaš-Solarović, B., Smith, M. A., & Bajić, V. (2008). Premature centromere division of the X chromosome in neurons in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 106(5), 2218. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2008.05555.X>
- Stadtfield, M., & Hochedlinger, K. (2010). Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes & Development*, 24(20), 2239. <https://doi.org/10.1101/GAD.1963910>
- Stanton, L. R., & Coetsee, R. H. (2004). Down's syndrome and dementia. *Advances in Psychiatric Treatment*, 10(1), 50–58. <https://doi.org/10.1192/APT.10.1.50>
- Staropoli, J. F., & Abeliovich, A. (2005). The ubiquitin-proteasome pathway is necessary for maintenance of the postmitotic status of neurons. *Journal of Molecular Neuroscience: MN*, 27(2), 175–183. <https://doi.org/10.1385/JMN:27:2:175>
- Steinmetz, J. D., Seeher, K. M., Schiess, N., Nichols, E., Cao, B., Servili, C., Cavallera, V., Cousin, E., Hagins, H., Moberg, M. E., Mehlman, M. L., Abate, Y. H., Abbas, J., Abbasi, M. A., Abbasian, M., Abbastabar, H., Abdelmasseh, M., Abdollahi, M., Abdollahi, M., ... Dua, T. (2024). Global, regional, and national burden of disorders affecting the nervous system, 1990–2021: a systematic analysis for

- the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet Neurology*, 23(4), 344–381. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(24\)00038-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(24)00038-3)
- Stelzmann, R. A., Norman Schnitzlein, H., & Reed Murtagh, F. (1995). An english translation of alzheimer's 1907 paper, "über eine eigenartige erkankung der hirnrinde." *Clinical Anatomy*, 8(6), 429–431. <https://doi.org/10.1002/CA.980080612>
- Sultan, A., Nessler, F., Violet, M., Bégard, S., Loyens, A., Talahari, S., Mansuroglu, Z., Marzin, D., Sergeant, N., Humez, S., Colin, M., Bonnefoy, E., Buée, L., & Galas, M. C. (2011). Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(6), 4566–4575. <https://doi.org/10.1074/JBC.M110.199976>
- Sun, X., Kofman, S., Ogbolu, V. C., Karch, C. M., Ibric, L., & Qiang, L. (2024). Vascularized Brain Assembloids With Enhanced Cellular Complexity Provide Insights Into the Cellular Deficits of Tauopathy. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 42(2), 107–115. <https://doi.org/10.1093/STMCLS/SXAD086>
- Sun, X. Y., Ju, X. C., Li, Y., Zeng, P. M., Wu, J., Zhou, Y. Y., Shen, L. B., Dong, J., Chen, Y. J., & Luo, Z. G. (2022). Generation of vascularized brain organoids to study neurovascular interactions. *ELife*, 11, e76707. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.76707>
- Suzuki, T., Oishi, M., Marshak, D. R., Czernik, A. J., Nairn, A. C., & Greengard, P. (1994). Cell cycle-dependent regulation of the phosphorylation and metabolism of the Alzheimer amyloid precursor protein. *The EMBO Journal*, 13(5), 1114. <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1994.TB06360.X>
- Svitkina, T. (2018). The Actin Cytoskeleton and Actin-Based Motility. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(1). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A018267>
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131(5), 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2016). A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2016 17:3, 17(3), 183–193. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.8>
- Takuma, H., Arawaka, S., & Mori, H. (2003). Isoforms changes of tau protein during development in various species. *Developmental Brain Research*, 142(2), 121–127. [https://doi.org/10.1016/S0165-3806\(03\)00056-7](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(03)00056-7)

- Tasnim, K., & Liu, J. (2021). Emerging bioelectronics for brain organoid electrophysiology. *Journal of Molecular Biology*, 434(3), 167165. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167165>
- Tedeschi, A., Almagro, J., Renshaw, M. J., Messal, H. A., Behrens, A., & Petronczki, M. (2020a). Cep55 promotes cytokinesis of neural progenitors but is dispensable for most mammalian cell divisions. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-020-15359-W>
- Tedeschi, A., Almagro, J., Renshaw, M. J., Messal, H. A., Behrens, A., & Petronczki, M. (2020b). Cep55 promotes cytokinesis of neural progenitors but is dispensable for most mammalian cell divisions. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-020-15359-W>
- Teller, J. K., Russo, C., DeBusk, L. M., Angelini, G., Zaccheo, D., Dagna-Bricarelli, F., Scartezzini, P., Bertolini, S., Mann, D. M. A., Tabaton, M., & Gambetti, P. (1996). Presence of soluble amyloid β -peptide precedes amyloid plaque formation in Down's syndrome. *Nature Medicine*, 2(1), 93–95. <https://doi.org/10.1038/NM0196-93>
- Thakur, A., Siedlak, S. L., James, S. L., Bonda, D. J., Rao, A., Webber, K. M., Camins, A., Pallàs, M., Casadesus, G., Lee, H., Bowser, R., Raina, A. K., Perry, G., Smith, M. A., & Zhu, X. (2008). Retinoblastoma Protein Phosphorylation at Multiple Sites is Associated with Neurofibrillary Pathology in Alzheimer Disease. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 1(2), 134. [/pmc/articles/PMC2480556/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/162480556/)
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., & Jones, J. M. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*, 282(5391), 1145–1147. <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>
- Thomson, J. A., Kalishman, J., Golos, T. G., Durning, M., Harris, C. P., Becker, R. A., & Hearn, J. P. (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. <https://doi.org/10.1073/PNAS.92.17.7844>
- Thomson, J. A., Kalishman, J., Golos, T. G., Durning, M., Harris, C. P., & Hearn, J. P. (1996). Pluripotent Cell Lines Derived from Common Marmoset (*Callithrix jacchus*) Blastocysts. *Biology of Reproduction*, 55(2), 254–259. <https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD55.2.254>
- Thordardottir, S., Rodriguez-Vieitez, E., Almkvist, O., Ferreira, D., Saint-Aubert, L., Kinhult-Ståhlbom, A., Thonberg, H., Schöll, M., Westman, E., Wall, A., Eriksdotter, M., Zetterberg, H., Blennow, K., Nordberg, A., & Graff, C. (2018). Reduced penetrance of the PSEN1 H163Y autosomal dominant Alzheimer mutation: a 22-year follow-up study. *Alzheimer's Research & Therapy*, 10(1), 45. <https://doi.org/10.1186/S13195-018-0374-Y>

- Uzbekov, R., Kireyev, I., & Prigent, C. (2002). Centrosome separation: respective role of microtubules and actin filaments. *Biology of the Cell*, *94*(4–5), 275–288. [https://doi.org/10.1016/S0248-4900\(02\)01202-9](https://doi.org/10.1016/S0248-4900(02)01202-9)
- Uzbekov, R., & Prigent, C. (2022). A Journey through Time on the Discovery of Cell Cycle Regulation. *Cells*, *11*(4). <https://doi.org/10.3390/CELLS11040704>
- Vanova, T., Sedmik, J., Raska, J., Amruz Cerna, K., Taus, P., Pospisilova, V., Nezvedova, M., Fedorova, V., Kadakova, S., Klimova, H., Capandova, M., Orviska, P., Fojtik, P., Bartova, S., Plevova, K., Spacil, Z., Hribkova, H., & Bohaciakova, D. (2023). Cerebral organoids derived from patients with Alzheimer’s disease with PSEN1/2 mutations have defective tissue patterning and altered development. *Cell Reports*, *42*(11), 113310. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2023.113310>
- Vermeulen, R., Schymanski, E. L., Barabási, A. L., & Miller, G. W. (2020). The exposome and health: Where chemistry meets biology. *Science (New York, N.Y.)*, *367*(6476), 392–396. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAY3164>
- Vo, H. T., Laszczyk, A. M., & King, G. D. (2018). Klotho, the Key to Healthy Brain Aging? *Brain Plasticity*, *3*(2), 183–194. <https://doi.org/10.3233/bpl-170057>
- Wang, W., Chen, L., Ding, Y., Jin, J., & Liao, K. (2008). Centrosome separation driven by actin-microfilaments during mitosis is mediated by centrosome-associated tyrosine-phosphorylated cortactin. *Journal of Cell Science*, *121*(Pt 8), 1334–1343. <https://doi.org/10.1242/JCS.018176>
- Warren, L., Manos, P. D., Ahfeldt, T., Loh, Y. H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P. K., Smith, Z. D., Meissner, A., Daley, G. Q., Brack, A. S., Collins, J. J., Cowan, C., Schlaeger, T. M., & Rossi, D. J. (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells using synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*, *7*(5), 618. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2010.08.012>
- Wei, M. L., & Andreadis, A. (1998). Splicing of a regulated exon reveals additional complexity in the axonal microtubule-associated protein Tau. *Journal of Neurochemistry*, *70*(4), 1346–1356. <https://doi.org/10.1046/J.1471-4159.1998.70041346.X>
- Weihl, C. C., Miller, R. J., & Roos, R. P. (1999). The role of beta-catenin stability in mutant PS1-associated apoptosis. *Neuroreport*, *10*(12), 2527–2532. <https://doi.org/10.1097/00001756-199908200-00017>
- Wells, C., Brennan, S. E., Keon, M., & Saksena, N. K. (2019). Prionoid Proteins in the Pathogenesis of Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *12*, 492523. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2019.00271/BIBTEX>
- Wild, C. P. (2005). Complementing the genome with an “exposome”: the outstanding challenge of environmental exposure measurement in molecular epidemiology. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American*

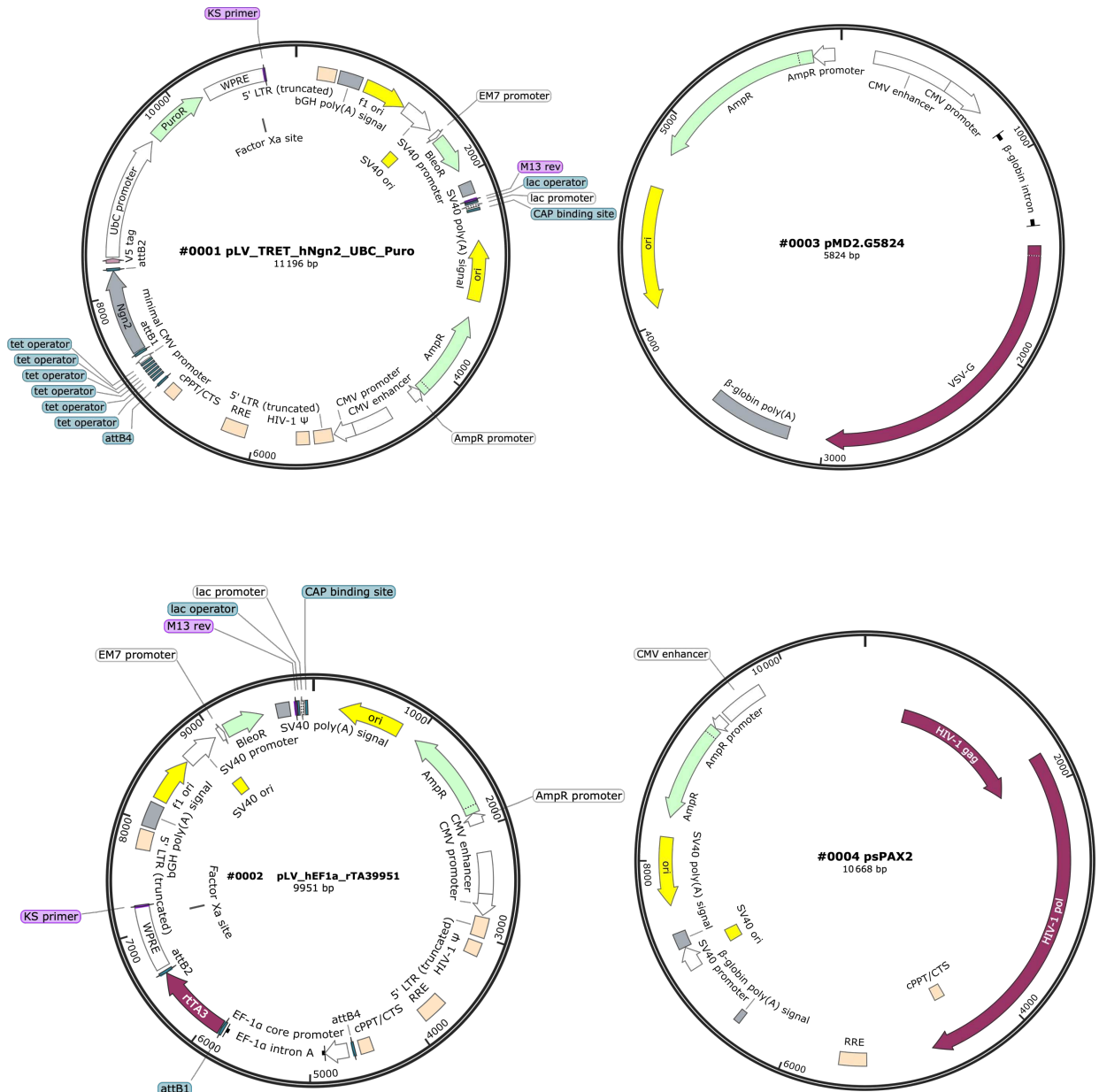
- Society of Preventive Oncology*, 14(8), 1847–1850. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-05-0456>
- Wilfert, A. B., Sulovari, A., Turner, T. N., Coe, B. P., & Eichler, E. E. (2017). Recurrent de novo mutations in neurodevelopmental disorders: properties and clinical implications. *Genome Medicine*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/S13073-017-0498-X>
- Winkler, T., Cantilena, A., Métais, J. Y., Xu, X., Nguyen, A. D., Borate, B., Antosiewicz-Bourget, J. E., Wolfsberg, T. G., Thomson, J. A., & Dunbar, C. E. (2010). No evidence for clonal selection due to lentiviral integration sites in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 28(4), 687. <https://doi.org/10.1002/STEM.322>
- Wisniewski, K. E., Wisniewski, H. M., & Wen, G. Y. (1985). Occurrence of neuropathological changes and dementia of Alzheimer's disease in Down's syndrome. *Annals of Neurology*, 17(3), 278–282. <https://doi.org/10.1002/ANA.410170310>
- Woolley, J. D., Khan, B. K., Murthy, N. K., Miller, B. L., & Rankin, K. P. (2011). The diagnostic challenge of psychiatric symptoms in neurodegenerative disease; rates of and risk factors for prior psychiatric diagnosis in patients with early neurodegenerative disease. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 72(2), 126. <https://doi.org/10.4088/JCP.10M06382OLI>
- Woolner, S., O'Brien, L. L., Wiese, C., & Bement, W. M. (2008). Myosin-10 and actin filaments are essential for mitotic spindle function. *The Journal of Cell Biology*, 182(1), 77–88. <https://doi.org/10.1083/JCB.200804062>
- Wu, L., Wang, Z., Lad, S., Gilyazova, N., Dougharty, D. T., Marcus, M., Henderson, F., Ray, W. K., Siedlak, S., Li, J., Helm, R. F., Zhu, X., Bloom, G. S., Wang, S.-H. J., Zou, W.-Q., & Xu, B. (2022). Selective Detection of Misfolded Tau From Postmortem Alzheimer's Disease Brains. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2022.945875>
- Wu, S., Hong, Y., Chu, C., Gan, Y., Li, X., Tao, M., Wang, D., Hu, H., Zheng, Z., Zhu, Q., Han, X., Zhu, W., Xu, M., Dong, Y., Liu, Y., & Guo, X. (2024). Construction of human 3D striato-nigral assembloids to recapitulate medium spiny neuronal projection defects in Huntington's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 121(22). <https://doi.org/10.1073/PNAS.2316176121>
- Xiang, Y., Cakir, B., & Park, I. H. (2020). Generation of Regionally Specified Human Brain Organoids Resembling Thalamus Development. *STAR Protocols*, 1(1), 100001. <https://doi.org/10.1016/J.XPRO.2019.100001>
- Xiang, Y., Tanaka, Y., Cakir, B., Patterson, B., Kim, K.-Y., Sun, P., Kang, Y.-J., Zhong, M., Liu, X., Patra, P., Lee, S.-H., Weissman, S. M., & Park, I.-H. (2019). hESC-Derived Thalamic Organoids Form Reciprocal Projections When Fused with

- Cortical Organoids. *Cell Stem Cell*, 24(3), 487-497.e7. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.12.015>
- Xiang, Y., Tanaka, Y., Patterson, B., Kang, Y.-J., Govindaiah, G., Roselaar, N., Cakir, B., Kim, K.-Y., Lombroso, A. P., Hwang, S.-M., Zhong, M., Stanley, E. G., Elefanty, A. G., Naegele, J. R., Lee, S.-H., Weissman, S. M., & Park, I.-H. (2017). Fusion of Regionally Specified hPSC-Derived Organoids Models Human Brain Development and Interneuron Migration. *Cell Stem Cell*, 21(3), 383-398.e7. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.07.007>
- Xu, C. L., Ruan, M. Z. C., Mahajan, V. B., & Tsang, S. H. (2019). Viral Delivery Systems for CRISPR. *Viruses*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/V11010028>
- Xu, H., Sweeney, D., Greengard, P., & Gandy, S. (1996). Metabolism of Alzheimer beta-amyloid precursor protein: regulation by protein kinase A in intact cells and in a cell-free system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(9), 4081. <https://doi.org/10.1073/PNAS.93.9.4081>
- Xu, J., Yang, Z., Wang, R., He, F., Yan, R., Zhang, Y., Yu, L., Deng, W., & Nie, Y. (2022). Rapid differentiation of hiPSCs into functional oligodendrocytes using an OLIG2 synthetic modified messenger RNA. *Communications Biology* 2022 5:1, 5(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-04043-y>
- Yamanaka, S. (2009). A Fresh Look at iPS Cells. *Cell*, 137(1), 13–17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.03.034>
- Yanagi, K., Sone, R., Ohga, R., & Kawahara, A. (2019). Involvement of the centrosomal protein 55 (cep55) gene in zebrafish head formation. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 24(10), 642–649. <https://doi.org/10.1111/GTC.12715>
- Yang, Y., & Herrup, K. (2007). Cell division in the CNS: protective response or lethal event in post-mitotic neurons? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1772(4), 457. <https://doi.org/10.1016/j.BBADIS.2006.10.002>
- Yao, X., Kang, J. H., Kim, K. P., Shin, H., Jin, Z. L., Guo, H., Xu, Y. N., Li, Y. H., Hali, S., Kwon, J., La, H., Park, C., Kim, Y. J., Wang, L., Hong, K., Cao, Q., Cho, I. J., Kim, N. H., & Han, D. W. (2023). Production of Highly Uniform Midbrain Organoids from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells International*, 2023. <https://doi.org/10.1155/2023/3320211>
- Yaqoubi, H. N. Al, & Fatema, N. (2018). Meckel Gruber syndrome associated with anencephaly—an unusual reported case. *Oxford Medical Case Reports*, 2018(2), 45–47. <https://doi.org/10.1093/OMCR/OMX092>
- Yokoyama, M., Kobayashi, H., Tatsumi, L., & Tomita, T. (2022). Mouse Models of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 15, 912995. <https://doi.org/10.3389/FNMOL.2022.912995/BIBTEX>
- Young, R. A. (2011). Control of the Embryonic Stem Cell State. *Cell*, 144(6), 940–954. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.01.032>

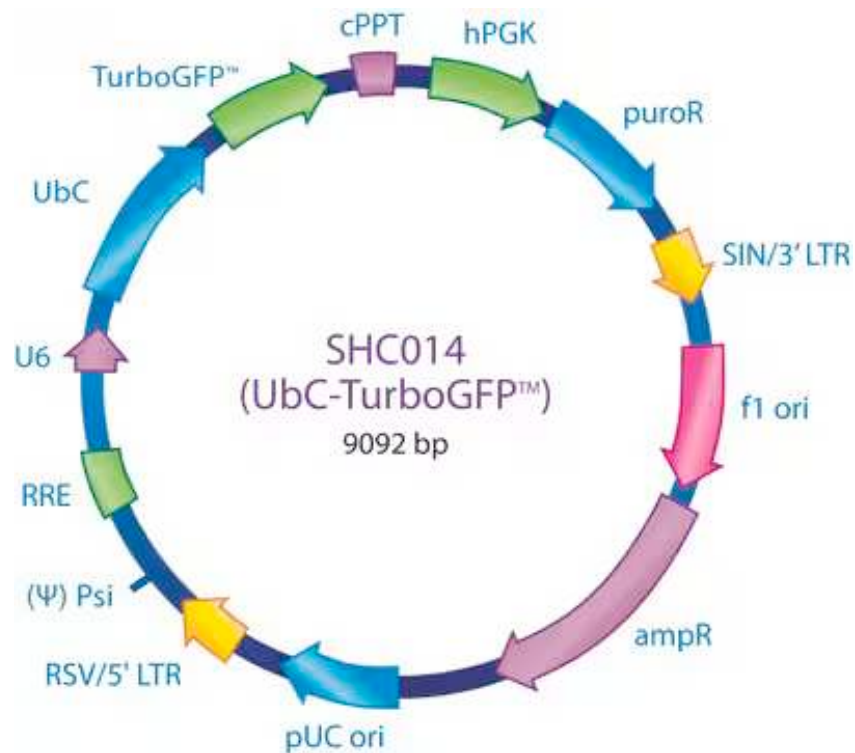
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I. I., & Thomson, J. A. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318(5858), 1917–1920. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1151526/SUPPL_FILE/YU.SOM.REVISION.1.PDF
- Zekanowski, C., & Wojda, U. (2009). Aneuploidy, chromosomal missegregation, and cell cycle reentry in Alzheimer's disease. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 69(2), 232–253. <https://doi.org/10.55782/ANE-2009-1748>
- Zhang, J., Zhang, Y., Wang, J., Xia, Y., Zhang, J., & Chen, L. (2024). Recent advances in Alzheimer's disease: mechanisms, clinical trials and new drug development strategies. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 2024 9:1, 9(1), 1–35. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01911-3>
- Zhang, T., Chen, D., & Lee, T. H. (2020). Phosphorylation Signaling in APP Processing in Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1). <https://doi.org/10.3390/IJMS21010209>
- Zhang, Y. C., Bai, Y. F., Yuan, J. F., Shen, X. L., Xu, Y. L., Jian, X. X., Li, S., Song, Z. Q., Hu, H. Bin, Li, P. Y., Tu, H. Q., Han, Q. Y., Wang, N., Li, A. L., Zhang, X. M., Wu, M., Zhou, T., & Li, H. Y. (2021). CEP55 promotes cilia disassembly through stabilizing Aurora A kinase. *The Journal of Cell Biology*, 220(2). <https://doi.org/10.1083/JCB.202003149>
- Zhang, Y., Pak, C., Han, Y., Ahlenius, H., Zhang, Z., Chanda, S., Marro, S., Patzke, C., Acuna, C., Covy, J., Xu, W., Yang, N., Danko, T., Chen, L., Wernig, M., & Südhof, T. C. (2013). Rapid Single-Step Induction of Functional Neurons from Human Pluripotent Stem Cells. *Neuron*, 78(5), 785–798. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.05.029>
- Zhang, Y., Rózsa, M., Liang, Y., Bushey, D., Wei, Z., Zheng, J., Reep, D., Broussard, G. J., Tsang, A., Tsegaye, G., Narayan, S., Obara, C. J., Lim, J. X., Patel, R., Zhang, R., Ahrens, M. B., Turner, G. C., Wang, S. S. H., Korff, W. L., ... Looger, L. L. (2023). Fast and sensitive GCaMP calcium indicators for imaging neural populations. *Nature* 2023 615:7954, 615(7954), 884–891. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-05828-9>
- Zhang, Z., Hartmann, H., Do, V. M., Abramowski, D., Sturchler-Pierrat, C., Staufenbiel, M., Sommer, B., Van De Wetering, M., Clevers, H., Saftig, P., De Strooper, B., He, X., & Yankner, B. A. (1998). Destabilization of beta-catenin by mutations in presenilin-1 potentiates neuronal apoptosis. *Nature*, 395(6703), 698–702. <https://doi.org/10.1038/27208>
- Zhao, H. H., & Haddad, G. (2024). Brain organoid protocols and limitations. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 18, 1351734. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2024.1351734/BIBTEX>

- Zhao, J., Fu, Y., Yamazaki, Y., Ren, Y., Davis, M. D., Liu, C.-C., Lu, W., Wang, X., Chen, K., Cherukuri, Y., Jia, L., Martens, Y. A., Job, L., Shue, F., Nguyen, T. T., Younkin, S. G., Graff-Radford, N. R., Wszolek, Z. K., Brafman, D. A., ... Bu, G. (2020). APOE4 exacerbates synapse loss and neurodegeneration in Alzheimer's disease patient iPSC-derived cerebral organoids. *Nature Communications*, *11*(1), 5540. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19264-0>
- Zhao, W. M., Seki, A., & Fang, G. (2006). Cep55, a microtubule-bundling protein, associates with centralspindlin to control the midbody integrity and cell abscission during cytokinesis. *Molecular Biology of the Cell*, *17*(9), 3881–3896. https://doi.org/10.1091/MBC.E06-01-0015/SUPPL_FILE/MOVIE2.MOV
- Zheng, H., & Koo, E. H. (2011). Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein. *Molecular Neurodegeneration*, *6*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-6-27/FIGURES/2>
- Zhou, T., Benda, C., Dunzinger, S., Huang, Y., Ho, J. C., Yang, J., Wang, Y., Zhang, Y., Zhuang, Q., Li, Y., Bao, X., Tse, H. F., Grillari, J., Grillari-Voglauer, R., Pei, D., & Esteban, M. A. (2012). Generation of human induced pluripotent stem cells from urine samples. *Nature Protocols* *2012* 7:12, *7*(12), 2080–2089. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.115>
- Zhou, Y., Bennett, T. M., & Shiels, A. (2019). A charged multivesicular body protein (CHMP4B) is required for lens growth and differentiation. *Differentiation; Research in Biological Diversity*, *109*, 16–27. <https://doi.org/10.1016/J.DIFF.2019.07.003>
- Zijdeman, R., & Ribeira da Silva, F. (2023). *Life Expectancy at Birth (Total)*. <https://datasets.iisg.amsterdam/dataset.xhtml?persistentId=hdl:10622/LKYT53>

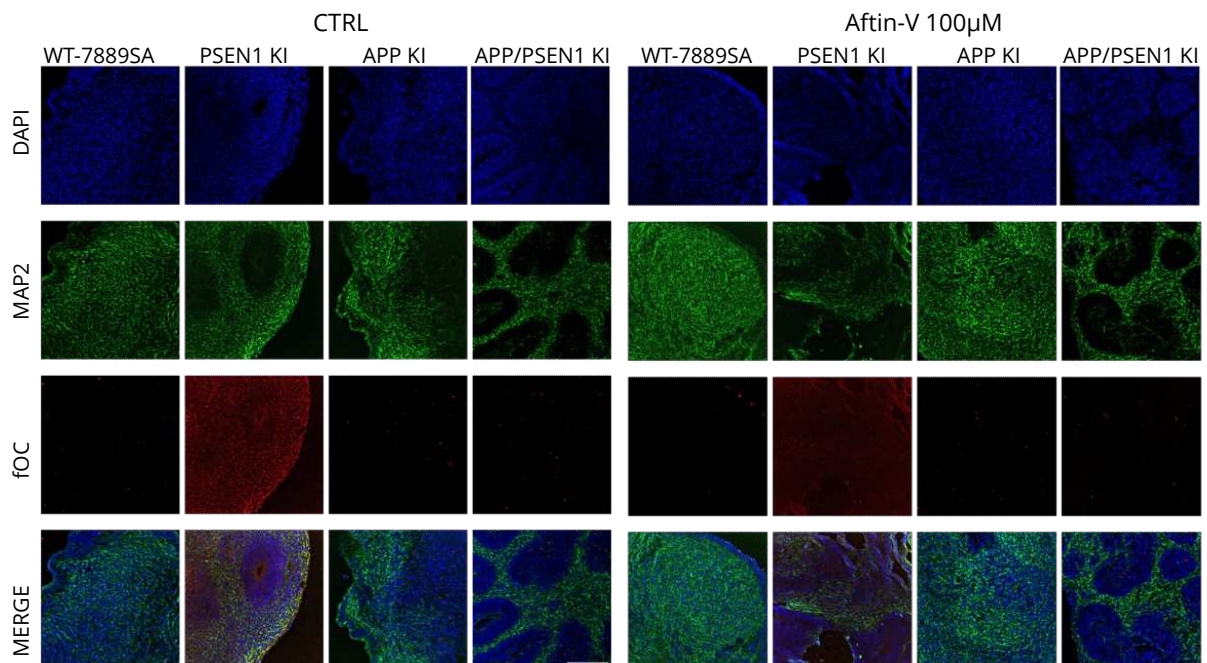
Annexe



Annexe 1 : Cartes plasmidiques des différents plasmides nécessaire pour construire les vecteurs lentivirus neurogénine 2.



Annexe 2 : Carte plasmidique du plasmide pLKO.1-puro-CMV-TurboGFP



Annexe 3 : Images illustratives des marquages d'immunofluorescences MAP2 et foci sur des organoïdes corticaux WT-7889SA et APP/PSEN1 Ki âgés de 2 mois

PMID	Date Pu	First author	Title	Status iPSC	Type of Insertion	Reporters	Edi tion technique u insertion detail	Integration site	Database name	Identifier unmodified	Identifier modified cell li	
25241738	2014	Gotoh S. <i>et al.</i>	Generation of Alveolar Epithelial Spheroids via Isolated Progenitor Cells from Human Pluripotent Stem Cells	Healthy	Fusion	pSFTPC 5'arm - ATG - GFP - polyA - LoxP - pPGK - NeoR - polyA - LoxP - 3'arm exon1	Bacterial artificial dN-ter	SFTPC	hPSCreg	KUFMS004-C	(20187)	
26707206	2016	Oceguera-Yanez <i>et al.</i>	transgene expression in human iPSCs and their differentiated derivatives	Healthy	2A	AAVS1 5'arm - SA - TZA - PuroR - PolyA - pCAG - GFP - PolyA - 3'arm	TALENs CRISPR/Cas9	C-ter	AAVS1-PPP1R12C			
26295203	2016	Zhang P.-W. <i>et al.</i>	Generation and validation of PAX7 reporter lines from human adult fibroblast-derived IPS cells using zinc-finger nuclease technology	Healthy ALS SOD1AAV patient line ALS C9orf72 patient line	AAVS1	AAVS1 5'arm - SA - PuroR - PcZFN		N/A	AAVS1-PPP1R12C			
26826926	2016	Wu J. <i>et al.</i>	Generation and validation of PAX7 reporter lines from human IPS cells using CRISPR/Cas9 technology	Healthy	2A	PAX7 5'arm - 2A - GFP - LoxP - pEF1a - RFP - 2A - PuroR - LoxP - 3'arm	CRISPR/Cas9n	C-ter exon8	PAX7	Cellosaurus	CVCL_4T32 IPS-DI-19-3	
27148368	2016	Smith B. W. <i>et al.</i>	Map AHR Expression throughout Human Development	Healthy	IRES	CYP1A1 5'arm - eGFP - IRES - Luciferase - LoxP - pPGK - NeoR - LoxP - 3'arm	CRISPR/Cas9	?	CYP1A1 locus	N/A	N/A	
28026072	2017	Yang C.-T. <i>et al.</i>	Activation of KLF1 Enhances the Differentiation and Maturation of Red Blood Cells from Human Pluripotent Stem Cells	Healthy	AAVS1	AAVS1 5'arm - pCAG - HA - KLF1 - ERT2 - PolyA - 3'arm	ZFN	AAVS1	AAVS1-PPP1R12C hPSCreg	ED020-A	(SFC151)	
28107504	2017	Horikiri T. <i>et al.</i>	SOX10-Nano-Lantern Reporter Human IPS Cells; A Versatile Tool for Neural Crest Research	N/A	2A	SOX10 5'arm - 2A - Nano-lantern (NL) - LoxP-pPGK - NeoR - LoxP - 3'arm	CRISPR/Cas9	C-ter exon4	hSOX10			
28364766	2017	Jacob A. <i>et al.</i>	Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells Into Functional Lung Alveolar Epithelial Cells	Neonatal respiratory distress syndrome : SP212	Fusion	SFTPCR 5'arm ATG - tGTomato - PolyA - LoxP - PolyA - PuroR - pPGK - LoxP - 3'arm	TALENs	N-ter exon1	SFTPC locus	Cellosaurus	CVCL_WN80 SP212	
28463226	2017	Hawkins F. <i>et al.</i>	Prospective isolation of NKO2-1-expressing human lung progenitors derived from pluripotent stem cells	Healthy ; BU3 Cystic fibrosis : C17	2A	exon3-2A-GFP - LoxP-flanked PGK-puroaTK - PolyA - LoxP - 3'arm	TALENs CRISPR/Cas9	Between exon 2 and 3	NKO2-1	Cellosaurus	CVCL_IW26 CREMDD3L-BU3C2 t4Tomato CVCL_D3D6 C17-NKO2-1-GFP t4Tomato	
28814507	2017	Roberts B. <i>et al.</i>	Systematic gene tagging using CRISPR/Cas9 in human stem cells to illuminate cell organization	N/A	Fusion	Exon1 5'arm - EGFP - linker - 3'arm	CRISPR/Cas9	N-ter exon1	PKN TUBA1B DSP LMNB1 TOMM20 ACTB SEC1B FBL MYH10 TIP1	hPSCreg	UCSF001-A WTC	N/A
28925359	2017	Balboa D. <i>et al.</i>	Generation of an OCT4 reporter human induced pluripotent stem cell line using CRISPR/SpCas9	Healthy	2A	OCT4 5'arm - TZA - NLS - EmGFP - PZA - PuroR - 3'arm	CRISPR/Cas9	C-ter stop codon	OCT4	hPSCreg	UHI006-A HEL24_3 HEL24_3-OCT4-eEmGFP-A-G3	
28622076	2017	Kurokawa Y. K. <i>et al.</i>	Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Endothelial Cells for Three-Dimensional Microphysiologic al Systems	Healthy Parkinson disease like	Fusion	pCDH5 5'arm - mCherry - PolyA - 3'arm	CRISPR/Cas9	C-ter stop codon	CDH5	hPSCreg Cellosaurus	UCSF001-A WTC CVCL_D081 IPS_C23	
28522326	2017	Yumlu S. <i>et al.</i>	Gene editing and clonal isolation of human induced pluripotent stem cells using CRISPR/Cas9	Healthy	2A	5'arm - SA - 2A - PuroR - Tright - Cas9 - 3'arm 5'arm - SA - 2A - NeoR - pCAG - rrtA3 - PolyA - 3'arm	CRISPR/Cas9	AAVS1	AAVS1-PPP1R12C	hPSCreg Cellosaurus	WTSI018-B HPS0114:kolif_2 BIH001A BCB1A CVCL_U173 MIR171-rnND2-0	

26729410	2017 Wu J. et al.	Generation and Characterisation of a MYF5 Reporter Human iPS Cell Line Using CRISPR/Cas9 Mediated Homologous Recombination	Healthy	2A	MYF5 5'arm - 2A - GFP - LoxP - pEF1a - RFP - 2A - PuroR - 3'arm	CRISPR/Cas9n	C-ter exon3	MYF5	Cellosaurus	CVCL_4792 IPS-DF19-9	
27422057	2017 Li M. et al.	Establishment of Reporter Lines for Detecting Fragile X Mental Retardation (FMR1) Gene Reactivation in Human Neural Cells	Healthy	2A	FMR1 5'arm - 2A - Nluc - 3'arm	CRISPR/Cas9	C-ter	FMR1	WiCell	WC05LFX11-7 FX11-7 W401 H1 ESC	
29786554	2018 Lopez-Yrigoyen M. et al.	A human iPSC line capable of differentiating into functional macrophages expressing ZsGreen: a tool for the study and in vivo tracking of therapeutic cells	Healthy	AAVS1	AAVS1 5'arm - pCAG - ZsGreen1 - polyA - polyA - PuroR - 2A - 3'arm	ZFN		AAVS1	AAVS1-PPP1R12C	ED020-A hESC151	CVCL_U148 hESC15-2562
29852468	2018 Malysheva S. V. et al.	Generation of a human CDX2 knock-in reporter iPSC line (MHH007-A-1) to model human trophoblast differentiation	Healthy	2A	CDX2 5'arm - P2A - Venusuciemem - T2A - NeoR - FRT - pPGK - PuroR - FRT - 3'arm	TALENs	C-ter exon3	caudal type homeobox 2 (CDX2)/13q12.2	hPSCreg	MHH007-A hESC_F1488 SeV IP52	MHH007-A-1 1 CDX2-C23
29734117	2018 Gupta S. K. et al.	NKX6.1 induced pluripotent stem cell reporter lines for isolation and analysis of functionally relevant neuronal and pancreas populations	Healthy	Fusion	NKX6.1 5'arm - GFP - LoxP - pPGK - PuroR - LoxP - 3'arm	CRISPR/Cas9	C-ter stop codon	NKX6.1 locus	hPSCreg	STBC1322-A SBAD03-01	STBC1322-A-1 NKX6.1-GFP reporter line
29247812	2018 Kim H. et al.	Generation of a PXR reporter human induced pluripotent stem cell line (PXR-mCherry hiPSC) using the CRISPR/Cas9 system	Healthy	Fusion	PXR 5'arm - mCherry - pPGK - NeoR - 3'arm	CRISPR/Cas9	C-ter stop codon	PXR (NR112)/3q13.33	Cellosaurus	CVCL_VE24 KIT001-A	CVCL_VE25 KIT001-A-35
30340091	2018 Anderson R. et al.	Generation of a CLTA reporter human induced pluripotent stem cell line (CRM001-A-1) using the CRISPR/Cas9 system to monitor endogenous clathrin trafficking	Healthy	Fusion 2A	CLTA 5'arm - Tq2 - P2A - PuroR - 3'arm	CRISPR/Cas9	C-ter stop codon	exCLTA/9p13.3	hPSCreg	CRM001-A NCRM-5	CRM001-A-1
29657097	2018 McCasley K. B. et al.	Single-Cell Transcriptomic Profiling of Pluripotent Stem Cell-Derived SCGB3A2+ Airway Epithelium	Healthy	2A	SCGB3A2 5'arm - P2A - mCherry/Picker - LoxP - pPGK - NeoR - LoxP - 3'arm	CRISPR/Cas9	C-ter stop codon	exSCGB3A2 locus	hPSCreg	RUE5e002-A RUE52	RUE52-SCGB3A2CherryP
30108108	2018 Vanuytselk. et al.	Induced pluripotent stem cell-based mapping of β -globin expression throughout human erythropoietic development	Healthy	Fusion	LCR 5'arm - eGFP - pPGK - PuroR - 3'arm	TALENs	C-ter	LCR locus		BU6 BS31 [BR-SP-31-1]	
31299562	2019 Olmer R. et al.	Generation of a NKX2.1 knock-in reporter cell line from human induced pluripotent stem cells (MHH006-A-2)	Healthy	2A	NKX2.1 5'arm - P2A - eGFP - FRT - pPGK - hygROR - FRT - 3'arm	TALENs	C-ter stop codon	NKX2.1 (TF-1), 1-hPSCreg		MHH006-A HSC1285_T-IP52	MHH006-A-2 HSC1285_T IP52/NKx2.1eGFP
31683099	2019 Youngsun Lee et al.	Generation of a PDX1-EGFP reporter human induced pluripotent stem cell line, KSCB005-A-3, using the CRISPR/Cas9 system	Healthy	Fusion	PDX1 5'arm - EGFP - pPGK - PuroR - BGH PolyA - 3'arm	CRISPR/Cas9	C-ter stop codon	PDX1/13q12.2	hPSCreg	KSCB005-A CMC-hiPSC-003	KSCB005-A-1 CMC-hiPSC-003(Nestin-GFP)
32024875	2019 Fiedorowicz K. et al.	Tissue-specific promoter-based reporter system for monitoring cell differentiation from iPSCs to cardiomyocytes	Healthy	Fusion 2A	pTNTT2 - luc - T2A - PuroR - pmCMV - GFP - pACTC - mCherry - WPRE - pEF1a - NeoR	Lentivirus	Random	Random insertion/N/A		N/A	N/A

31791010	2019 Drick N. <i>et al.</i>	Generation of a NKX2.1 - p63 double transgenic knock-in reporter cell line from human induced pluripotent stem cells (MHH006-A-4)	Healthy	2A	NKX2.1 5'arm - P2A - eGFP - pPGK - Hygro - 3'arm p63 5'arm - P2A - dTomato - TALENs - PuroR - 3'arm	C-ter stop codon ex 14q13.3 tumor protein p63 3q28	hPSCreg	MHH006-A HSC1285_T-IP52	MHH006-A-4 HSC1285IP52_Nkx2.1eGFP_p63dTomato MHH006-A-2 HSC1285_T IP52/Nkx2.1eGFP		
31735076	2019 Ghazizadeh Z. <i>et al.</i>	Metastable Atrial State Underlies the Primary Genetic Substrate for MYL4 Mutation-Associated Atrial Fibrillation	Healthy	Fusion	MYH6 5'arm - mCherry - 3'arm SHOX2 5'arm - GFP - 3'arm	CRISPR/Cas9	N/A	MYH6 locus SHOX2 locus	hPSCreg	Waa009-A IP	
31884373	2019 Nur Patria Y. <i>et al.</i>	Generation of a SOX9-tdTomato reporter human iPSC line, MCR1001-A-2, using CRISPR/Cas9 editing	Healthy	2A	SOX9 5'arm - T2A - tdTomato - LoxP - pPGK - PuroR - BGH polyA - LoxP - 3'arm	CRISPR/Cas9	C-ter stop codon exSOX9 locus	hPSCreg	MCR1001-A PB001	MCR1001-A-2 MCR1001-A SOX9dTom	
31683099	2019 Lee Y. <i>et al.</i>	Generation of a PDX1-EGFP reporter human induced pluripotent stem cell line, KSCB005-A-3, using the CRISPR/Cas9 system	Healthy	Fusion	PDX1 5'arm - EGFP - pPGK - PuroR - BGH polyA - 3'arm	CRISPR/Cas9	C-ter stop codon exPDX1/13q12.2	hPSCreg	KSCB005-A CMC-hiPSC-003	KSCB005-A-3 CMC-003-Pdx1EGFP	
31499408	2019 Lee Y. <i>et al.</i>	Generation of a NESTIN-EGFP reporter human induced pluripotent stem cell line, KSCB005-A-1, using CRISPR/Cas9 nuclease	Healthy	Fusion	Nestin 5'arm - EGFP - pPGK - PuroR - BGH polyA - 3'arm	CRISPR/Cas9	C-ter stop codon exNESTIN/1q23.1	hPSCreg	KSCB005-A CMC-hiPSC-003	KSCB005-A-1 CMC-hiPSC-003(Nestin-GFP)	
31473565	2019 Engels L. <i>et al.</i>	Generation of a CFTR knock-in reporter cell line (MHH006-A-1) from a human induced pluripotent stem cell line	Healthy	2A	CFTR 5'arm - ZeocinR - T2A - dTomato - FRT - pPGK - HygroR - FRT - 3'arm	TALENs	N-ter exon1	CFTR, 7q31.2	hPSCreg	MHH006-A HSC1285_T-IP52	MHH006-A-1 HSC1285IP52_CFTRTomatox74
30735882	2019 Matsui S. <i>et al.</i>	Differentiation and isolation of iPSC-derived remodeling ductal plate-like cells by use of an AQP1-GFP reporter human iPSC line	Healthy	Fusion	AQP1 5'arm - EGFP - PolyA - LoxP - pPGK - NeoR - LoxP - 3'arm	Bacterial artificial chromosome	AQP1 locus	Cellosaurus	CVCL_D006 585A1	CVCL_VS01 23C27 CVCL_D020 692D2	
31048719	2019 Calatayud C. <i>et al.</i>	CRISPR/Cas9-mediated generation of a tyrosine hydroxylase reporter iPSC line for live imaging and isolation of dopaminergic neurons	Healthy	2A	TH 5'arm - P2A - mOrange - LoxP - pEGF1 - NeoR - PolyA - LoxP - 3'arm	CRISPR/Cas9	C-ter stop codon	TH gene	Cellosaurus	CVCL_R159 SP_11	CVCL_C3PH TH-mOrange hiPSC
30900175	2019 Li M. <i>et al.</i>	One-Step Generation of Seamless Luciferase Gene Knockin Using CRISPR/Cas9 Genome Editing in Human Pluripotent Stem Cells	Fragile X Syndrome	2A	FMR1 5'arm - 2A - Nluc - 3'arm	CRISPR/Cas9	FMR1 locus				
30378731	2019 Adkar S. S. <i>et al.</i>	Step-Wise Chondrogenesis of Human Induced Pluripotent Stem Cells and Purification Via a Reporter Allele Generated by CRISPR-Cas9 Genome Editing	Healthy	2A	COL2A1 5'arm - 2A - EGFP - LoxP - pPGK - PuroR - LoxP - 3'arm	CRISPR/Cas9	C-ter stop codon exCOL2A1 locus	Cellosaurus	CVCL_3653 BJ (Human Fibroblast)	CVCL_VU02 BjF1.6 (BJF1) ATCC®KCS-1019	
31733438	2019 Überbacher C. <i>et al.</i>	Application of CRISPR/Cas9 editing and digital droplet PCR in human iPSCs to generate novel knock-in reporter lines to visualize dopaminergic neurons	Healthy	2A	TH 5'arm - T2A - eGFP - LoxP - pEF1a - BlastR - LoxP - 3'arm	CRISPR/Cas9	C-ter stop codon exTH gene	hPSCreg	80Z17 STBC1063-A SECR56-03-04 STBC1063-C SECR56-03-08		
32361463	2020 Blöchlinger A. <i>et al.</i>	Generation of an INSULIN-H2B-Cherry reporter human iPSC line	Healthy	2A	osasaigavirus2A(T2A)-histone2B(H2B)-Cherry	CRISPR/Cas9	C-ter stop codon exinsulingene(INS)	hPSCreg	HMGU1001-A XM001	HMGU1001-A-1 hINS-T2A-H2B-Cherry [v1]	

32777770	2020 Lee M. et al.	Generation of OCT4-EGFP, NANOG, tdTomato dual reporter human induced pluripotent stem cell line, KXUI001-A, using the CRISPR/Cas9 system	Healthy	2A	OCT4 5'arm - 2A - EGFP - 2A - PuroR - 3'arm NANOG 5'arm - 2A - tdTomato - 2A - blasticidinR - 3'arm	CRISPR/Cas9	C-ter stop codon	OCT4, NANOG	hPSCreg	KXUI001-A OCT4-EGFP, NANOG-tdTomato-BI-IPSC
32034090	2020 Okubo T. et al.	Generation and validation of a PITX2-EGFP reporter line of human induced pluripotent stem cells enables isolation of periorbital mesenchymal cells	Healthy	IRES2	PITX2 5'arm - IRES2/2A - EGFP - SV40 - NeoR - 3'arm	TALENs	C-ter stop codon	exPITX2	hPSCreg	HUEM5I004-C-201B71
32714647	2020 Lam P. T. et al.	Generation of a Retina Reporter hPSC Line to Label Progenitor, Ganglion, and Photoreceptor Cell Types	Healthy	2A	RCVRN 5'arm - PA2 - mCherry - FRT - TKNeo - FRT - 3'arm BRN3b 5'arm - P2A - eGFP - Loop - TKBLAST - Loop - 3'arm VSX2 5'arm - P2A - Cerulean - FRT - TKPURO - FRT - 3'arm	CRISPR/Cas9	C-ter stop codon	VSX2 BRN3b RCVRN	hPSCreg	TMGI001-A-A19545
33373890	2020 Siehler et al.	Generation of a heterozygous C-peptide-mCherry reporter human iPSC line (HMGUI001-A-8)	Healthy	Fusion	INS 5'arm - mCherry - 3'arm	CRISPR/Cas9	C-ter stop codon	Ex Insulin gene (INS)/1p15.5	hPSCreg	HMGUI001-A-XM001 HMGUI001-A-8 C-PEP-mCherry-hiPSC
32544852	2020 Moya N et al.	Generation of a homozygous ARX nuclear CFP (ARX/CFP/CFP) reporter human iPSC line (HMGUI001-A-4)	Healthy	2A	ARX 5'arm - 2A - H2B - CFP - Flag - 3'arm	CRISPR/Cas9	C-ter stop codon	ex ARX gene (ARX)/Xp21.3	hPSCreg	HMGUI001-A-XM001 HMGUI001-A-4 hiPSC-ARX-T2A-H2B-CFP-Flag
33352530	2020 Zhou M et al.	Generation of a human iPSC line GIBH002-A-2 with a dual-reporter for NKX2-5 using TALENs	Healthy	Fusion	NKX2.5 5'arm - eGFP - 2A - PuroR - 3'arm NKX2.5 5'arm - eGFP - 2A - PuroR - Loop - NeoR - pPGK - Loop - 3'arm	TALENs	N-ter exon1	NKX2-5, 5q35.1	hPSCreg	GIBH002-A-C11 GIBH002-A-2 NKX2-5 GFP-Puro/wt-IPSC
31082375	2020 D'Alessio et al.	Long-term development of human IPSC-derived pyramidal neurons quantified after transplantation into the neonatal mouse cortex	Healthy	AAVS1	AAV-CAGGS-EGFP	CRISPR/Cas9	AAVS1	AAVS1-PPP1R12C	N/A	N/A (PB347)
32619494	2020 Zhao et al.	Induced Fetal Human Muscle Stem Cells with High Therapeutic Potential in a Mouse Muscular Dystrophy Model	Healthy	Fusion	PAX3-GFP MYF5-tdTomato	Bacterial artificial chromosome CRISPR/Cas9	N-ter exon1	PAX3 locus MYF5 locus	hPSCreg	KUIFMSI004-C-201B71 SD1
32474864	2020 Butterfield K. N. et al.	Generation of an Induced Pluripotent Stem Cell Line with the Constitutive EGFP Reporter	Healthy	AAVS1	AAVS1 5'arm - SA - PuroR - PolyA - pCAG - EGFP - PolyA - 3'arm	CRISPR/Cas9	AAVS1	AAVS1-PPP1R12C	N/A	N/A N/A
32550911	2020 Wang L. et al.	Homozygous MESP1 knock-in reporter hESCs facilitated cardiovascular cell differentiation and myocardial infarction repair	Healthy	2A	MESP1 5'arm - T2A - mTomato - pPGK - PuroR - 3'arm	TALENs	C-ter stop codon	exMESP1	hPSCreg	Wae009-A-H9
32977294	2020 Zaho H et al.	Generation of a tdTomato-GAD67 reporter human epilepsy mutation induced pluripotent stem cell line, USTCI001-A-2, using CRISPR/Cas9 editing	Dravet Syndrome (Developmental a Fusion		GAD67 5'arm - TdTomato - Loop - pPGK - PuroR - LoxP - 3'arm	CRISPR/Cas9	N-ter exon1	GAD67 Locus	hPSCreg	USTCI001-A USTCI001-A-2

31566285	2020 Sun Y.-H. <i>et al.</i>	Human induced pluripotent stem cell line with genetically encoded fluorescent voltage indicator generated via CRISPR for action potential assessment post-cardiogenesis	Healthy	AAVS1 ZA	AAVS1 5'arm - SA - TZA - PuroR - PolyA - pCAG - attB1 - AnTuGhit - attB2 - PolyA - 3'arm	CRISPR/Cas9	AAVS1	AAVS1- PPP1R12C	hPSCreg	WAI001-C IP5-Df6-9-9T-B
32421247	2020 Kim J.-W. <i>et al.</i>	Live-cell screening platform using human-induced pluripotent stem cells expressing fluorescence-tagged cytochrome P450 1A1		Fusion	CYP1A1 5'arm - mCherry - PolyA - pPGK - NeoR - 3'arm	CRISPR/Cas9		CYP1A1 locus		
32011235	2020 Choi I. Y. <i>et al.</i>	Transcriptional landscape of myogenesis from human pluripotent stem cells reveals a key role of TWIST1 in maintenance of skeletal muscle progenitors	Healthy	ZA	PAX7 5'arm - 2A - EGFP - pPGK - PuroR - 3'arm MYOG 5'arm - 2A - EGFP - pPGK - PuroR - 3'arm RUNX1 5'arm - 2A - EGFP - pPGK - NeoR - 3'arm	CRISPR/Cas9 zFN	C-ter stop codon	PAX7 locus MYOG locus RUNX1 locus	hPSCreg	WAI002-A H9
31915384	2020 Diaz-Cuadros M. <i>et al.</i>	In vitro characterization of the human segmentation clock	Healthy	AAVS1 ZA	AAVS1 5'arm - pCAG - H2B - mCherry - 3'arm HES7 5'arm - TZA - Achilles - NLS - CLL1 - PEST - 3'arm MESP2 5'arm - TZA - H2B - mCherry - 3'arm HES7-TZA-Achilles-NLS-CLL1-PEST PAX3-TZA-YFP-NLS	CRISPR/Cas9	N-ter	AAVS1- PPP1R12C HES7 locus MESP2 locus PAX3 locus	hPSCreg	CRM002-A NCBM-1
34087992	2021 Tsukamoto S. <i>et al.</i>	Generation of two ISL1-tdTomato reporter human pluripotent stem cell lines using CRISPR-Cas9 genome editing	Healthy	ZA	tdTomato cleaved by TZA peptide under the control of endogenous ISL1 and EF1 alpha promoter-driven Bleomycin resistance gene	CRISPR/Cas9	C-ter stop codon	ex ISL1 gene (ISL1)/hPSCreg		BRC014-A-1 HPS037 BRC014-A-2 HPS038
33571874	2021 Haase A. <i>et al.</i>	Establishment of MHH001-A-5, a GcaMP6f and RedStar dual reporter human iPSC line for in vitro and in vivo characterization and in situ tracing of iPSC derivatives	Healthy	AAVS1	pCAG-RedStar pCAG-GcaMP6f	TALENs	AAVS1	AAVS1- PPP1R12C	hPSCreg	MHH001-A hHSC_Iso4_ADCF SeVPS2 (Ph6nlx) MHH001-A-5 Ruby53
33739449	2021 Nalbandian <i>et al.</i>	Characterization of hPSC-Derived Muscle Progenitors Reveals Distinctive Markers for Myogenic Cell Purification Toward Cell Therapy	Healthy	Fusion	PAX7-Venus MYF5-tdTomato	CRISPR/Cas9	N-ter exon1	PAX7 locus MYF5 locus	hPSCreg	KUFEM5004-C [20187] SDI
33610012	2021 Schimid <i>et al.</i>	Generation of two gene edited iPSC-lines carrying a DOX-inducible NGN2 expression cassette with and without GFP in the AAVS1 locus	Healthy	ZA	AAVS1 5'arm - 2A - NeoR - pCAG - M2ITTA - 3'arm AAVS1 5'arm - 2A - PuroR - pNGN2 - TRE - 3'arm	TALENs	AAVS1	AAVS1- PPP1R12C	hPSCreg	BION010-C BION010-C-13 (without GFP) BION010-C + NGN2 #7-26 BION010-C-15 (with GFP) BION010-C +dox Inducible NGN2-GFP
34481189	2021 Jo S. <i>et al.</i>	Generation of an ACTA2-EGFP reporter human induced pluripotent stem cell line, KIT001-C-41, using CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination		Fusion	ACTA2 5' arm-EGFP-polyA-PGK promoter-neo-ACTA2 3' arm	CRISPR/Cas9	C-ter stop codon	ex ACTA2/10q23.31		KIT001-C KIT001-C-41
33878708	2021 Jung J. <i>et al.</i>	Generation of Brachyury-mCherry knock-in reporter human pluripotent stem cell line (SNUe003-A-2) using CRISPR/Cas9 nuclease	Healthy	ZA	Brachyury 5'arm - TZA - mCherry - polyA - pPGK - NeoR - polyA - 3'arm	CRISPR/Cas9	C-ter stop codon	ex Brachyury/6q27	hPSCreg	SNUe003-A SNUeE53 SNUe003-A-2 B-mC-K3-SE-3
34297940	2021 Okubo C. <i>et al.</i>	Expression dynamics of HAND1/2 in in vitro human cardiomyocyte differentiation	Healthy	ZA	HAND1 5'arm - flag - 2A - mCherry - LoxP - PuroR - pPGK - LoxP - 3'arm HAND2 5'arm - HA - 2A - EGFP - LoxP - pPGK - NeoR - LoxP - 3'arm	CRISPR/Cas9	C-ter stop codon exon2 AAVS1	HAND1 locus HAND2 locus AAVS1	hPSCreg	BRC023-A 40982

34297940	2021 Okubo C. et al.	Expression dynamics of HAND1/2 in in vitro human cardiomyocyte differentiation	Healthy	AAVS1	AAVS1 5'arm - SA - 2A - PuroR - PolyA - pCAG - tagBFP - PolyA - 3'arm	TALENs	AAVS1	AAVS1-PPP1R12C	hPSCreg	BRC023-A-40982		
34775202	2021 Arendzen C. H. et al.	Generation of LUMC041-A-2: Equipping a PAX3 reporter iPSC line with doxycycline inducible H2B-mTurquoise2 for live cell imaging	Healthy	AAVS1 2A	AAVS1 5'arm - TZA - PuroR - pCAG - rTA3G - mTurq2 - H2B - TRE3G - 3'arm	CRISPR/Cas9	AAVS1	AAVS1-PPP1R12C	hPSCreg	CRM1003-A-NCRM-1	LUMC041-A-2 CRM1003-A-2	
33542270	2021 Chirikian O. et al.	CRISPR/Cas9-based targeting of fluorescent reporters to human iPSCs to isolate atrial and ventricular-specific cardiomyocytes	Healthy	2A	5'arm - P2A - Fluorophore - LoxP - pGK - PuroR - LoxP - 3'arm	CRISPR/Cas9	MYL2 SLN	MYL2 locus SLN locus			113 C15	
33660062	2021 Lauschke K. et al.	Creating a human-induced pluripotent stem cell-based NIX2.5 reporter gene assay for developmental toxicity testing	Healthy	2A	NIX2.5 5'arm - TZA - Nluc - 3'arm	CRISPR/Cas9			C-ter stop codon ex NIX2.5 locus	hPSCreg	BIONI010-C	
33216174	2021 Gao Y. et al.	CRISPR/Cas9-edited triple-fusion reporter gene imaging of dynamics and function of transplanted human urinary-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes	Healthy	AAVS1 2A	AAVS1 5'arm - SA - 2A - PuroR - PolyA - Ubi - Fluc - RFP - HSVtk - PolyA - 3'arm	CRISPR/Cas9	AAVS1	AAVS1-PPP1R12C				
34509159	2021 Temoncin O. et al.	Generation of an hiPSC1 knock-in line expressing TY1-tagged MNX1-protein together with mScarlet	Healthy	2A	MNX1 5'arm - 2xTY1 - TZA - mScarlet - PolyA - 3'arm	CRISPR/Cas9	Motor Neuron Homeobox 1 (MNX1); 7q36.3	Motor Neuron Homeobox 1 (MNX1); 7q36.3	Cellosaurus hPSCreg	CVCL_A9MS1013-4FA	BKMOL001-A hiPSC-1-MNX1-2xTY1-TZA-mScarlet	
32857377	2021 Galdos F. X. et al.	Purification of Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Using CRISPR/Cas9-Mediated Integration of Fluorescent Reporters										
35176664	2022 Kamiya D. et al.	Generation of human GAPDH knock-in reporter iPSC lines for stable expression of tdTomato in pluripotent and differentiated culture conditions	Healthy	2A	F2A-tdTomato	CRISPR/Cas9			C-ter stop codon ex GAPDH; 12p13.31	hPSCreg	KUMIS012-A-1231A3	KUMIS012-A-1 GAPDH1d71 KUMIS012-A-2 GAPDH1d72
35931075	2022 Park G. et al.	Direct visualization of the transition status during neural differentiation by dual-fluorescent reporter human pluripotent stem cells	Healthy	2A	TUBB3 5'arm - P2A - EGFP - LoxP - pEF1alpha - puro - 3'arm NGN2 5'arm - P2A - TagRFP - LoxP - pEF1alpha - puro - 3'arm	CRISPR/Cas9		TUBB3 locus chr16 NGN2 locus chr4	hPSCreg		RPC001-A RPC1P5771	
35127713	2022 Lopez-Muneta L. et al.	Generation of NKX2.5GFP Reporter Human iPSCs and Differentiation into Functional Cardiac Fibroblasts	Healthy	2A	NKX2.5 5'arm - 2A-GFP - LoxP - pGK - Puro - LoxP - 3'arm	CRISPR/Cas9			C-ter stop codon ex NKX2.5 locus	Cellosaurus	CVCL_V189 CBIP51sv-4F-40	CVCL_V190 CBIP51sv-4F-5
36125708	2022 Ashmore-Harris C.	Generation of In Vivo Traceable Hepatocyte-Like Cells from Human iPSCs										

36097905	2022	Wakimizu T. <i>et al.</i>	SHOX2 refines the identification of human sinoatrial nodal cell population in the in vitro cardiac differentiation	Healthy	Fusion	SHOX2 5'arm - mCherry - VloxP - PGK - NeoR - VloxP 3'arm HCN4 HA - EGFP - FRT - PGK - chromosome NeoR - FRT - HA	CRISPR/Cas9 Bacterial artificial N-ter exon1	SHOX2 locus HCN4 locus	Cellosaurus	CVCL_K09240982	CVCL_CBLU40282 HCN4-EGFP-mCherry
35051384	2022	Nouri P. <i>et al.</i>	Generation of a NES-mScarlet Red Fluorescent Reporter Human iPSC Line for Live Cell Imaging and Flow Cytometric Analysis and Sorting Using CRISPR-Cas9-Mediated Gene Editing	Healthy	2A	NES 5'arm - P2A - mScarlet - 3'arm	CRISPR/Cas9	C-ter stop codon ex NES locus	hPSCreg	HMGU-001-A1M001	
35561459	2022	Fu J. <i>et al.</i>	Generation of a human iPSC line CIB1D10-A with a reporter for ASGR1 using CRISPR/Cas9	Healthy	2A	ASGR1 5'arm - P2A - mCherry - LoxP - pPGK - PuroR - LoxP - 3'arm	CRISPR/Cas9	C-ter stop codon ex 17p13.1	ASGR1 locus, hPSCreg	CIB1D10-A1PSN0069	
35961104	2022	Sharma V. <i>et al.</i>	Generation of AAVS1-EGFP reporter cell lines from an isogenic pair of trisomy 21 and euploid human iPSCs	Healthy Down Syndrome	Fusion	AAVS1 5'arm - PuroR - PolyA - pCAG - EGFP - pLacZ - PolyA - 3'arm	ZFN	AAVS1	AAVS1- PPP1R12C	CVCL_C1YD DS1-IP54-Trisomic	NS1002-A NS1002-B
35701501	2022	Feher A. <i>et al.</i>	Establishment and characterization of a novel human induced pluripotent stem cell line stably expressing the IRFP720 reporter	Healthy	2A	AAVS1 5'arm - 2A - PuroR - chS4 - pCAG - IRFP - chS4 - 3'arm	CRISPR/Cas9	AAVS1	AAVS1- PPP1R12C		SBAD202-01
35573682	2022	Guan Y. <i>et al.</i>	Generation of an RCVRN-eGFP Reporter hiPSC Line by CRISPR/Cas9 to Monitor Photoreceptor Cell Development and Facilitate the Cell Enrichment for Transplantation	Healthy	2A	RCVRN 5'arm - PA2 - eGFP - 3'arm	CRISPR/Cas9	C-ter stop codon ex RCVRN locus			BC1
35355819	2022	Metz-Raz E. <i>et al.</i>	Generation of a dual edited human induced pluripotent stem cell Myl7-GFP reporter line with inducible CRISPR/dCas9	Healthy	2A	AAVS1 5'arm - SA - T2A - NeoR - pCAG - TetON - PolyA - mCherry - P2A - dCas9-KRAB - TetO - 3'arm	CRISPR/Cas9	AAVS1	AAVS1- PPP1R12C	CVCL_LUD15 MYC-mEGFP-MYL7-d13	SCV1038-A NCS-1002-002-KRAB-dCas9
35281493	2022	Schreiber A. M. <i>et al.</i>	Selected Histone Deacetylase Inhibitors Reverse the Frataxin Transcriptional Defect in a Novel Friedreich's ataxia Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neuronal Reporter System	Healthy	2A	FXN 5'arm - Linker SA - Nluc - 3' arm	CRISPR/Cas9	C-ter stop codon ex FXN locus			N/A
34352913	2022	Graffunder A. S. <i>et al.</i>	Design and Characterization of a Fluorescent Reporter Enabling Live-cell Monitoring of MCT8 Expression	Healthy	2A						
36700081	2023	Arendzen C. H. <i>et al.</i>	Introduction of a Geminin mScarlet Reporter into H2B-mTurq2 hiPSCs for Live-cell Imaging of Proliferation and Cell Cycling	Healthy	AAVS1 2A	AAVS1 5'arm - SA - PuroR - PolyA - pCAG - mScarlet-GMNN1-110 - SV40 PolyA - 3'arm	CRISPR/Cas9	AAVS1	AAVS1- PPP1R12C	CRMI003-A NCRM-1	LUMC041-A-3 CRMI003-A-3
37001365	2023	Jo S. <i>et al.</i>	Generation of a PDGFRB-mCherry knock-in reporter human induced pluripotent stem cell line (KIT1001-A-1), using CRISPR/Cas9 nuclease	Healthy	Fusion	5' arm-mCherry-polyA-PGK promoter-neo-PDGFRB 3' arm	CRISPR/Cas9	C-ter stop codon ex PDGFRB/Sq.32	hPSCreg	KIT1001-A	KIT1001-A-1 PDGFRB-mCherry PSC 2-A
36753833	2023	Srisook P. <i>et al.</i>	Generation of RUNX1c-eGFP induced pluripotent stem cell, MUS1012-A-4, using CRISPR/Cas9	Healthy	Fusion	RUNX1c 5'arm-eGFP-loxP-PGK promoter-puramycin-polyA-loxP-3'arm	CRISPR/Cas9	N-ter exon1	Runt-Related Transcription Factor 1c (RUNX1c) 21q22.12	MUS1012-A SUPS3.6	MUS1012-A-4 SUPS3.6-RUNX1c-5-18

37284748	2023	Galdos F. X. et al.	Combined lineage tracing and scRNA-seq reveals unexpected first heart field predominance of human iPSC differentiation	Healthy	2A	CCR5-pCMV - LoxP - NeoR - PolyA - LoxP - TurboGFP - PolyA - MYL2 - P2A - TdTomato - polyA - LoxP - pRGK - PuroR - LoxP	CRISPR/Cas9	C-ter stop codon	CCR5 MYL2	hPSCreg	SCVI110-A UCSF001-A wfc11	
38086384	2023	Nakade K. et al.	Efficient selection of knocked-in pluripotent stem cells using a dual cassette cellular elimination system	Healthy	2A	5'arm - 2A - TdTomato - pEF1a - pro - BleoR - 3'arm	CRISPR/Cas9	C-ter stop codon	OCT3/4 EF1A1 H2BC21	Cellosaurus hPSCreg	CVCL_T791 454E2 BRC014-A 1383D6	HPS0077 HPS1006 HPS232 HPS140 HPS141 HPS037 HPS5038
37902188	2023	Bai J. et al.	Episodic live imaging of cone photoreceptor maturation in GNAT2-EGFP retinal organoids	Healthy	Fusion	GNAT2 5'arm - EGFP - P2A - 3'arm	CRISPR/Cas9	N-ter exon2	GNAT2	hPSCreg	UCSF001-A wfc11	UCSF001-A-41 AICS-0034.d.62
36853689	2023	Ren X. et al.	Efficient bi-allelic tagging in human induced pluripotent stem cells using CRISPR	Healthy	2A	5'arm - T2A - EGFP - P2A - NeoR - 3'arm 5'arm - T2A - mCherry - P2A - BSD - 3'arm	CRISPR/Cas9	C-ter stop codon	SIN3A locus (chr15)	hPSCreg	UCSF001-A wfc11	
35870039	2023	Cherian R. M. et al.	Fluorescent hiPSC-derived MYH6-mScarlet cardiomyocytes for real-time tracking, imaging, and cardiotoxicity assays	Healthy	2A	5'arm - 2A - mScarlet - LoxP - pPGL3 - PuroR - LoxP - 3'arm	CRISPR/Cas9	C-ter stop codon	ex MYH6 locus	hPSCreg	TAU002-A UTA.04602.WT	D103-4
36744062	2023	Romero J. C. et al.	Oligodendrogenesis and myelination tracing in a CRISPR/Cas9-engineered brain microphysiological system	Healthy	Fusion	PLP1 5'arm - EGFP - 3'arm	CRISPR/Cas9	N/A	PLP1 locus	hPSCreg	USCB001-A NBSG_008	
36598341	2023	Schneide B.-M. M.	Determining untargeted, Off-Target, and Copy Number Status of Transgenic Events After CRISPR/Cas9 Targeted AAVS1 Safe Harbor	Healthy	AAVS1	AAVS1 5'arm - PuroR - GLuc - pEF1-HTLV - 3'arm	CRISPR/Cas9	AAVS1	AAVS1- PPP1R12C	hPSCreg	WISC008-B PSI(MR90)-4	
38043527	2023	Vlassis A. et al.	Modification of iPSCs Using Double-Control Quantitative CRISPR-Cas12a-integrated transgenes in genomic safe harbors retain high expression in human hematopoietic iPSC-derived lineages and primary cells	Healthy	AAVS1 2A	AAVS1 5'arm - pCAG - FMCK63 - myc - CD28 - 4-1-BB - CD3z - 2A - EGFP - PolyA - 3'arm AAVS1 5'arm - pCAG - FMCK63 - myc - CD28 - 4-1-BB - CD3z - PolyA - 3'arm AAVS1 5'arm - pCAG - EGFP - PolyA - 3'arm	CRISPR/MAD7 (CRISPR/Cas12a)	AAVS1	AAVS1- PPP1R12C	hPSCreg	WTSI018-B HPSI014-kolf 2	WTSI018-B-1 HPSI014-kolf 2-C1
bioRxiv	2023	Huang X. et al.	Downregulation of the silent potassium channel Kv6.1 increases ALS C9orf72 patient line motor neuron vulnerability	Healthy	AAVS1	AAVS1 5'arm - pH89 - GFP - 3'arm	ZFN	AAVS1	AAVS1- PPP1R12C		Patient lines : 39b SOD1A4V/+ SOD1A4V/+ Isogenic lines : 39b-cor SOD1+/+ SOD1+/+	
36543321	2023	Miao Y. et al.	Reconstruction and deconstruction of human somitogenesis in vitro	Healthy	AAVS1 2A	AAVS1 5'arm - pCAG - H2B - mCherry - 3'arm HES7 5'arm - T2A - Achilles - NLS - CL1 - PEST - 3'arm MESP2 5'arm - T2A - H2B - mCherry - 3'arm HES7-T2A-Achilles-NLS-CL1-PEST PAX3-T2A-YFP-NLS	CRISPR/Cas9	N-ter	AAVS1- PPP1R12C HES7 locus MESP2 locus PAX3 locus	hPSCreg	CRM003-A NCBM-1	
37443287	2023	Chung J. et al.	The Troyer syndrome protein spartin mediates selective autophagy of lipid droplets	Healthy	AAVS1	AAVS1 5'arm - T2A - PuroR - PolyA - LHX3 - T2A - ISL1 - P2A - NG2 - FLAG - pTRE3G - pCAG - Tet-On 3G - PolyA - 3'arm	CRISPR/Cas9	AAVS1	AAVS1- PPP1R12C	hPSCreg	TMO001-A Clns3 Epistomal iPSC Line	

37076490	2023	Kawasaki S. <i>et al.</i>	Programmable mammalian transitional modulators by CRISPR-associated proteins	Healthy	AAVS1	AAVS1 5'arm - pCAG - rITA - pTetO - dSPCad9 - 2a - mCherry - 3'arm	TALENs	AAVS1	AAVS1-PPP1R12C	hPSCreg	RUCD14-A138D6	
38219302	2024	Schreiber M.-K. <i>et al.</i>	Generation of a fluorescent oligodendrocyte reporter line in human induced pluripotent stem cells	Healthy	Fusion	PLP1-Citrine-EF1-GFP-P2A-Puroymin	CRISPR/Cas9	C-ter stop codon	PLP1 [ENSG00000123560], GRCh38; Chromosome X: 103,773,718-103,792,619	hPSCreg	RUCDR002-A1C-113	RUCDR002-A-70
38552636	2024	Ohtsishi Y. <i>et al.</i>	Screening of factors inducing alveolar type 1 epithelial cells using human pluripotent stem cells	Healthy	Fusion	pAGER 5'arm - mCherry - HiBIT - PolyA - LoxP - hPGK - NeoR - PolyA - LoxP - 3'arm	CRISPR/Cas9	N-ter exon1	AGER	Cellosaurus	CVCL_RND0 ChiPSC18	B2-3 SFTPCGFP reporter B2-3-dual-42-7 SFTPCGFP AGERmCherry-HiBIT dual-reporter SFTPC4Tomato (SFTC2-ST-B3) NKX2-1gfp (BU3 NG) CVCL_WN92 BU3 NKX2-1GFP AGERtdTomato (BU3 NGAT1)
38642558	2024	Burgess C. L. <i>et al.</i>	Generation of human alveolar epithelial type 1 cells from pluripotent stem cells	Healthy	Fusion	NKX2.1 5'arm - SA - E3 - 2A - GFP - PolyA - LoxP - pPKG - PuroTK - PolyA - LoxP - 3'arm AGER 5'arm - tdTomato - PolyA - LoxP - PolyA - PuroR - pPKG - LoxP - 3'arm	CRISPR/Cas9	C-ter stop codon exon3 N-ter exon1	AGER	Stem Cell Bank Boston University Cellosaurus	CVCL_WN92 BU3 NKX2-1GFP AGERtdTomato (BU3 NGAT1)	
38547668	2024	Zhang T. <i>et al.</i>	Generation of SST-P2A-mCherry reporter human embryonic stem cell line using the CRISPR/Cas9 system (WAe001-A-2C)	Diabetes	Fusion	SST 5'arm - P2A - mCherry - NLS - pPKG - PuroR - pPKG - PolyA - 3'arm	CRISPR/Cas9	C-ter stop codon	SST/3q27.3	hPSCreg	WAe001-A WA01	WAe001-A-2C SST-P2A-mCherry
38497409	2024	Piscopo V. E. C. <i>et al.</i>	The use of a SOX10 reporter toward ameliorating oligodendrocyte lineage differentiation from human induced pluripotent stem cells	Healthy	2A	SOX10-P2A-mOrange	CRISPR/Cas9	C-ter stop codon	exSOX10 locus	Cellosaurus	CVCL_C0X0 3450 81.280	
38103636	2024	Cota P. <i>et al.</i>	Insulin regulates h	Healthy	2A	INS 5'arm - T2A - H2B - mCherry	CRISPR/Cas9	C-ter stop codon	exINS locus	hPSCreg	HMGUJ001 XM001	HMGUJ001-A-1 HINS-T2A-H2B-Cherry (1/1)
38277710	2024	Houweiling P. <i>et al.</i>	Generation of a human ACTA1-tdTomato reporter iPSC line using CRISPR/Cas9 editing	Healthy	2A	ACTA1 5'arm - 2A - tdTomato - PolyA - 3'arm	CRISPR/Cas9	C-ter stop codon	exACTA1	hPSCreg	MCRH010-A PB010	MCRH010-A-1 PB010.5-ACTA110dTom
38853761	2024	Zhao Y. <i>et al.</i>	Optimizing in vitro T cell differentiation by using induced pluripotent stem cells with GFP-RUNX1 and mCherry-TCF7 labelling	Healthy	Fusion	TCF7-mCherry-Puro RUNX1-GFP-Neo	CRISPR/Cas9	C-ter stop codon exon15 C-ter stop codon exon12	TCF7 RUNX1	Nuwavecell	Z1C1 cell line	
38896969	2024	Durens M. <i>et al.</i>	An induced pluripotent stem cell line carrying a silencing-resistant calcium reporter allele	Frontotemporal Dementia	AAVS1	AAVS1 5'arm FRT - SA - IRES NeoR - BGH PolyA - FRT - UCE0 - pCAG - GCaMP6 - Rbg PolyA - 3'arm	CRISPR/Cas9	AAVS1	AAVS1-PPP1R12C	hPSCreg	UCSF001-A wtc11	SMMS059-A-79 or UCSF001-A-79 MSE3336A
38103636	2024	Cota P. <i>et al.</i>	Insulin regulates human pancreatic endocrine cell differentiation in vitro	Healthy	2A	INS 5'arm - T2A - histone 2B (H2B) - Cherry - 3'arm	CRISPR/Cas9	C-ter stop codon	exinsulin gene (INS)	hPSCreg	HMGUJ001-A XM001	HMGUJ001-A-43 HINS-T2A-H2B-Cherry (1/1)
38100908	2024	Douglas M. <i>et al.</i>	The generation and validation of two NKX2-5 fluorescent reporter human embryonic stem cell lines: UMANe002-A-1 and UMANe002-A-2	Healthy	2A	NKX2-5 5'arm - GFP - 2A - 3'arm NKX2-5 5'arm - 2A - GFP - LoxP - pPKG - PuroR - LoxP - 3'arm	CRISPR/Cas9	N-ter exon1 C-ter exon2	NKX2-5 locus	hPSCreg	UMANe002-A Man-13	UMANe002-A-1 UMANe002-A-2
38743670	2024	Inomata Y. <i>et al.</i>	Lgr6-expressing functional nail stem-like cells differentiated from human-induced pluripotent stem cells	Healthy	Fusion	51TR pLgr6 - EGFP - PolyA - pCMV - PuroR - PolyA - 51TR	piggyBack	Random	Random insertions	Cellosaurus	CVCL_1063 HIPS-RIKEN-2f CVCL_BS18 25361	

38843694	2024 Haake J. <i>et al.</i>	Generation of three iPSC lines with inducible systems to be used in Angelman syndrome research	Healthy Angelman syndrome Angelman syndrome	IRES	AAVS1 5'arm - pCAG - rITA3 - IRES - PuorR - PolyA - pTRE - GFP - 3'arm	CRISPR/Cas9	AAVS1	AAVS1-PPP1R12C	hPSCreg	DSMZ001-A DSMZ001-C-1 DSMZ001-L-1 DSMZ001-A-AG1-0 ZIP015-K	DSMZ001-A-1 DSMZ001-C-1-rITA DSMZ001-A-1-AG1-B-rITA ZIP015-K-1 AS-IP-rITA
38645166	2024 Davis J. C. <i>et al.</i>	IAPP Marks Mono-hormonal Stem-cell Derived β Cells that Maintain Stable Insulin Production in vitro and in vivo	Healthy	ZA	5'arm - P2A - mCherry - 3'arm	CRISPR/Cas9	C-ter stop codon	INS locus IAPP locus	1016 iPSC		
38460734	2024 Lynch A. T. <i>et al.</i>	The generation and validation of a dual cardiac HAND1-Tomato NKX2-5-GFP human embryonic stem cell line	Healthy	ZA	HAND1 5'arm - T2A - dTomato - <i>LoxP</i> - pSGK - NeoR - <i>LoxP</i> - 3'arm	CRISPR/Cas9	C-ter stop codon	exHAND1 locus		UMANw002-A-2	UMANw002-A-3
bioRxiv	2024 Canan M. A. <i>et al.</i>	Resolving human α versus β cell fate allocation for the generation of stem cell-derived islets	Healthy	Fusion	PAX4 5'arm - H2B - mCherry - RGS-his - 3'arm	CRISPR/Cas9	N-ter exon1	PAX4 locus	hPSCreg	HMGU001-A-4 hPSC-ARX-T2A-H2B-CFP-Flag	HMGU001-A-4S ARX-CFP/PAX4-mCherry
bioRxiv	2024 Rosenstein A. H. <i>et al.</i>	FAST-STEM: A Human pluripotent stem cell engineering toolkit for rapid design-build-test-learn development of human cell-based therapeutic devices	Huntington disease	AAVS1	AAV1 5'arm - attP - pEF1a - EGFP - P2A - NeoR - BGH PolyA - attB' - 3'arm AAV1 5'arm - attP - pEF1a - tagBFP - P2A - NeoR - BGH PolyA - attB' - 3'arm AAV1 5'arm - attP - pEF1a - mScarlet - P2A - NeoR - BGH PolyA - attB' - 3'arm	CRISPR/Cas9	AAVS1	AAVS1-PPP1R12C	Collosaurus	CVCL_D079 HD-IPS11	

Annexe 4 : Tableau récapitulatif des lignées iPSCs rapportrices