# Modélisation de maladies neurodégénératives à l'aide de cellules souches pluripotentes induites humaines

Thomas Lemonnier

▶ **To cite this version:**

Thomas Lemonnier. Modélisation de maladies neurodégénératives à l'aide de cellules souches pluripotentes induites humaines. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2012. Français. NNT : 2012PA05T074 . tel-00806699

**HAL Id: tel-00806699**

**https://theses.hal.science/tel-00806699**

Submitted on 2 Apr 2013

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

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

UNIVERSITE PARIS DESCARTES

**THÈSE**

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR**

**en Sciences de la Vie et de la Santé**

**Spécialité Neurosciences**

**École Doctorale : GC2iD**

**Laboratoire Rétrovirus et Transfert Génétique – Institut Pasteur**

# Modélisation de maladies neurodégénératives à l'aide de cellules souches pluripotentes induites humaines

présentée et soutenue publiquement
le 25 septembre 2012 par
**Thomas LEMONNIER**

| | | | |
|---|---|---|---|
| Président : | | Dr Bernard Zalc | Université Pierre et Marie Curie, CRICM. |
| Directrice de thèse | : | Dr Delphine Bohl | Institut Pasteur, Paris. |
| Rapporteur : | | Dr Séverine Boillée | Université Pierre et Marie Curie, ICM. |
| Rapporteur : | | Pr Thierry Levade | Université de Toulouse. |
| Examinateur : | | Pr Rolland Pochet | Université libre de Bruxelles.. |
| Examinateur : | | Dr Bruno Gasnier | Université Paris Descartes. |
| Examinateur : | | Dr Cécile Martinat | I-STEM, AFM. |

# Sommaire

**Introduction** ..... **- 11 -**

**1. Les maladies neurodégénératives** ..... **- 11 -**

*1.1. Introduction* ..... *- 11 -*

*1.2. Modèles d'étude des maladies neurodégénératives* ..... *- 11 -*

1.2.1. Etudes chez l'homme ..... - 11 -

1.2.2. Modèles animaux ..... - 14 -

1.2.3. Modèles cellulaires ..... - 17 -

**2. Les maladies de surcharge lysosomale** ..... **- 20 -**

*2.1. Introduction* ..... *- 20 -*

*2.2. Les Mucopolysaccharidoses* ..... *- 22 -*

*2.3. La mucopolysaccharidose de type III B (MPSIIIB)* ..... *- 23 -*

2.3.1. Description ..... - 23 -

2.3.2. Métabolites accumulés dans la MPSIIIB ..... - 23 -

2.3.3. Rôle des protéoglycanes à héparanes sulfates ..... - 24 -

2.3.4. Dégradation des HS ..... - 25 -

*2.4. Physiopathologie de la MPSIIIB* ..... *- 27 -*

2.4.1. Défauts biochimiques ..... - 27 -

2.4.2. Vésicules de surcharge ..... - 27 -

2.4.3. Atteinte du cerveau et des neurones ..... - 29 -

2.4.4. Neuroinflammation ..... - 31 -

2.4.5. Autres défauts ..... - 31 -

2.4.6. Traitement ..... - 32 -

**3. La Sclérose latérale amyotrophique** ..... **- 34 -**

*3.1. Description* ..... *- 34 -*

*3.2. Formes familiales et sporadiques* ..... *- 35 -*

*3.3. Traitements* ..... *- 38 -*

*3.4. Physiopathologie de la SLA* ..... *- 38 -*

3.4.1. Agrégats protéiques ..... - 40 -

3.4.2. Stress oxydatif ..... - 42 -

3.4.3. Excitotoxicité liée au glutamate ..... - 44 -

3.4.4. Défauts mitochondriaux ..... - 46 -

3.4.5. Anomalies du transport axonal ..... - 46 -

3.4.6. Anomalies du transport endosomal ..... - 48 -
3.4.7. Conclusion ..... - 50 -

**4. La forme ALS2/Alsine ..... - 50 -**

*4.1. Description ..... - 50 -*

*4.2. Le gène ALS2 ..... - 51 -*

*4.3. La protéine Alsine (ALS2) ..... - 52 -*
4.3.1. Les modèles murins ..... - 54 -
4.3.2. Localisation subcellulaire et rôles de l'alsine ..... - 56 -
4.3.3. Conclusion ..... - 59 -

**5. Organite et trafic intracellulaire ..... - 60 -**

*5.1. L'appareil de Golgi ..... - 60 -*
5.1.1. Structure ..... - 60 -
5.1.2. Glycosylation des protéines ..... - 61 -
5.1.3. Transport ..... - 63 -
5.1.4. La matrice golgienne ..... - 70 -
5.1.5. Golgi et microtubules ..... - 71 -
5.1.6. La protéine GM130 ..... - 72 -

*5.2. La voie endo-lysosomale ..... - 76 -*
5.2.1. Introduction ..... - 76 -
5.2.2. Les endosomes précoces (EE, early endosomes) ..... - 78 -
5.2.3. Les endosomes tardifs ..... - 79 -
5.2.4. Le lysosome ..... - 82 -

**6. Les cellules souches pluripotentes induites. ..... - 85 -**

*6.1. Les cellules souches – définition ..... - 85 -*

*6.2. Les cellules souches embryonnaires (cellules ES) ..... - 88 -*
6.2.1. Historique et contexte ..... - 88 -
6.2.2. Comparaison des cellules ES murines et humaines ..... - 88 -
6.2.3. Intérêts en recherche des cellules ES humaines ..... - 93 -
6.2.4. Conclusion ..... - 94 -

*6.3. Les cellules souches pluripotentes induites ..... - 96 -*
6.3.1. Origine/Découverte ..... - 96 -
6.3.2. Caractéristiques ..... - 97 -
6.3.3. Génération ..... - 98 -
6.3.4. La cellule reprogrammée ..... - 99 -
6.3.5. Méthodes de reprogrammation ..... - 101 -
6.3.6. Mécanismes de reprogrammation ..... - 104 -
6.3.7. Modélisation de pathologies neurodégénératives ..... - 112 -

**Chondrodysplasie métaphysaire autosomique récessive (Hypoplasie cartilage-cheveux) ..... - 117 -**

6.3.8. Criblage moléculaire thérapeutique ..... - 120 -
6.3.9. Thérapie cellulaire ..... - 122 -

**Objectifs ..... - 124 -**

**Résultats ..... - 127 -**

**1. Modélisation de défauts neuronaux associés à la mucopolysaccharidose de type IIIB à l'aide de cellules souches pluripotentes induites humaines - (Article 1). ..... - 127 -**

*1.1. Introduction. ..... - 127 -*

*1.2. L'isolement des cellules iPS de patients MPSIIIB a nécessité l'apport de l'enzyme manquante aux cellules. ..... - 128 -*

*1.3. Caractérisation des clones d'iPS. ..... - 129 -*

*1.4. Les cellules iPS de patients ont accumulé des vésicules de surcharge et ont présenté des altérations de l'appareil de Golgi. ..... - 130 -*

*1.5. Pluripotence des cellules iPS de patients. ..... - 130 -*

*1.6. Les précurseurs neuraux issus des cellules iPS de patients ont présenté des profils d'expression génique modifiés. ..... - 131 -*

*1.7. Les neurones de patients ont montré de fortes lésions de surcharge et des atteintes de l'appareil de Golgi. ..... - 132 -*

*1.8. Conclusion. ..... - 133 -*

**2. Activation des plaques d'adhérence focales par les saccharides d'héparane sulfate solubles extra-cellulaires ..... - 164 -**

*2.1. Introduction ..... - 164 -*

*2.2. Résultats ..... - 167 -*
2.2.1. Augmentation de l'expression de l'intégrine β1 dans les astrocytes MPSIIIB ..... - 167 -
2.2.2. Les plaques d'adhérence focales sont plus abondantes dans les astrocytes MPSIIIB ..... - 169 -
2.2.3. Activation de la phosphorylation de FAK par les HS dans les astrocytes normaux ..... - 171 -
2.2.4. Activation constitutive de la phosphorylation de FAK dans les précurseurs neuraux humains MPSIIIB et activation par des HS dans des précurseurs neuraux normaux. ..... - 171 -

*2.3. Conclusion ..... - 174 -*

**3. Génération de cellules souches pluripotentes induites et modélisation de la SLA2. ..... - 175 -**

*3.1. Introduction..... - 175 -*

*3.2. Résultats ..... - 176 -*

3.2.1. Génération de clones d'iPS de patients. ..... - 176 -
3.2.2. Caractérisation des clones d'iPS de patients. ..... - 178 -
3.2.3. Différenciation neuronale des clones d'iPS. ..... - 181 -
3.2.4. Expression de l'Alsine dans les précurseurs neuraux ..... - 189 -
3.2.5. Les endosomes sont-ils altérés en absence de l'Alsine ? ..... - 191 -
3.2.6. La capacité de branchement des neurones de patients est-elle altérée ? - 193 -

*3.3. Conclusion..... - 195 -*

*3.4. Matériel et méthodes ..... - 196 -*

**Discussion ..... - 198 -**

**1. Modélisation et étude physiopathologique de la MPSIIIB ..... - 198 -**

*1.1. Génération des cellules iPS de MPSIIIB ..... - 198 -*

*1.2. Modélisation des caractéristiques pathologiques ..... - 200 -*

*1.3. Interaction avec la matrice extracellulaire..... - 202 -*

*1.4. Problèmes développementaux dans la MPSIIIB..... - 203 -*

*1.5. Cascade physiopathologique ..... - 205 -*

**2. Modélisation de la SLA ALS2/Alsine ..... - 206 -**

*2.1. Développement du modèle cellulaire humain. ..... - 206 -*

*2.2. Phénotypes observés dans les neurones de patients. ..... - 207 -*

*2.3. iPS AL2/Alsin et développement ..... - 210 -*

*2.4. La différenciation neuronale des iPS ALS2/Alsin. ..... - 211 -*

*2.5. Utilisation des cellules iPS pour modéliser la SLA..... - 212 -*

**3. Utilisation des cellules iPS comme outil de modélisation des maladies neurodégénératives..... - 213 -**

*3.1. Variabilité du comportement des clones de cellules iPS ..... - 213 -*

*3.2. Modifications génétiques ..... - 214 -*

*3.3. Modifications épigénétiques ..... - 216 -*

*3.4. Différenciation des iPS ..... - 217 -*

*3.5. Trans-différenciation..... - 219 -*

*3.6. Conclusions ..... - 220 -*

**Conclusion et perspectives ..... - 221 -**

**1. Etude de la MPSIIIB ..... - 221 -**

**2. Etude de la ALS2/SLA ..... - 222 -**

**3. Les iPS comme outils ..... - 223 -**

**Bibliographie ..... - 225 -**

**A ..... - 225 -**

**Annexe ..... - 258 -**

# Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à remercier l'ensemble des personnes qui ont contribué à ce projet.

Je remercie d'abord tout particulièrement ma directrice de thèse Delphine Bohl pour m'avoir permis de travailler sur un sujet passionnant, pour son soutien et sa disponibilité durant ces quatre années. Je tiens également à la remercier pour son aide précieuse dans la conduite de ce projet et dans la rédaction de ce mémoire.

Mes remerciements vont également Jean Michel Heard pour m'avoir accueilli dans son unité, ainsi que pour ses conseils.

Je tiens également à remercier les membres de mon jury de thèse, je suis très reconnaissant à Séverine Boillée et à Thierry Levade d'avoir accepté d'être mes rapporteurs, à Cécile Martinat, Roland Pochet et Bruno Gasnier d'avoir accepté d''examiner cette thèse et enfin à Bernard Zalc de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Un grand merci à tous mes collègues, en commençant par Stéphane pour sa bonne humeur et son aide, aux autres thésards Diana, Julie et Elise. Enfin je remercie aussi tous les autres membres de l'équipe actuelle ou passée Sandrine, Stéphanie, Grégoire, Guillaume… et tous les autres.

Un grand merci à ma famille, mes parents pour leur soutien et pour leur aide, ainsi qu'à mon frère et à mes sœurs.

Enfin un grand merci à tous les autres, en commençant par Béa, pour tout. Merci aussi à Nad sans qui je serais encore en DEUG…, à Jeff et à tous les autres.

# Abréviations

AAV : virus adéno-associé (Adeno-Associated virus)
ADNmt : ADN mitochondrial
AKAP450 : A Kinase Anchoring Protein
AMPA : acide 2-amino-3-(5-méthyl-3-hydroxy-1,2-oxazol-4-yl) propanoïque
APP : amyloid precursor protein
ARNm : ARN messagers
ARNsi : ARN interférant
BDNF : Brain-Derived Neurotrophic Factor
bFGF : basic Fibroblast Growth Factors (FGF2)
CHMP2B : CHarged Multivesicular body Protein 2B
CLASPs : CLIP (Cytoplasmic LInker Protein)-ASsociated Proteins
CNV : copy number variation
COP : Coatamer Protein
COPII : coat protein II
DPI : diagnostic préimplantatoire
EB : corps embryonnaires (Embryoid Bodies)
EBV : Virus d'Epstein-Barr
EE : endosomes précoces (early endosomes)
EEA1 : Early Endosome Associated Protein 1
EEAT2 : Excitatory amino acid transporter 2
EGF : epidermal growth factor
EpiSC : epiblast stem cell
ERGIC : ER-to-Golgi Intermediate Compartment
ES : cellules Souches Embryonnaires
ESCRTIII : Endosomal System Complex Required for Transport
FA : plaques d'adhérence focales (focal adhesion)
FAK : Focal Adhesion Kinase
FGFR : récepteur au FGF
fSLA : Sclérose Latérale Amyotrophique d'origine familiale
FTD : Démence Fronto-Temporale
FUS : Fused in Sarcoma
GABA : acide γ-aminobutyrique
GAG : glycosaminoglycanes
GAP43 : Growth Associated Protein 43
GEF : facteurs d'échange de guanosine
GFP : Green Fluorescent Protein
GM130 : Golgi matrix protein 130
GM2/GM3 : Ganglioside Monosialic 2/3

GPI : glycosyl-phosphatidyl-inositol
GRASP : Golgi ReAssembly and Stacking Protein
GRIP1 : Glutamate Receptor Interacting Protein 1
HNE : 4-hydroxynonal
HOPS HOmotypic fusion and vacuole Protein Sorting complex
HS : Héparanes Sulfates
HSO : oligosaccharides d'héparanes sulfates
HSPG : protéoglycanes à héparanes sulfates
hTERT : télomérase humaine
IAHSP : paraplégie spastique familiale ascendante à début précoce (Infantile-onset Ascending Hereditary Spastic Paralysis)
IDUA : α-L-iduronidase
IGF1 : Insulin-like Growth Factor 1
iMEF : fibroblastes embryonnaires murins irradiés
iPS : cellules Souches Pluripotentes induites (induced Pluripotent Stem cells)
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
JSLA : Sclérose Latérale Amyotrophique Juvénile
JSLP : Scléroses Latérales Primaires Juvéniles
LAMP1 : Lysosomal Associated Membrane Protein 1
LC3 : MAP1LC3A, Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3 Alpha
LCR : Liquide Céphalo-Rachidien
LIF: Leukemia Inhibitor Factor
M6P: Mannose-6-Phosphate
M6PR : Mannose-6-Phosphate Receptor
MAPT : Microtubule-Associated Protein tau
MEC : Matrice Extra-Cellulaire
MMLV : virus de la leucémie murine (Moloney Murine Leukemia Virus)
MORN Membrane Occupation and Recognition Nexus
MPS : Mucopolysaccharidoses
MPSIIIB : Mucopolysaccharidoses de type IIIB
MPTP : 1-Méthyle 4-Phényl 1,2,3,6-Tétrahydro Pyridine
NAGLU : α-N-Acétyl-glucosaminidase
NGF: Nerve Growth Factor
NMDA: acide N-méthyl-D-aspartique
OCT4: Octamer-Binding Transcription factor 4
OPTN: optineurin
PH/DH: Diffuse B cell lymphoma (Dbl) homology / pleckstrin homology domains
PINK1: PTEN-induced putative kinase 1
PN : Précurseurs Neuraux
PO : poly-ornithine
RabGAP5: Rab5-specific GTPase Activating Protein
RCC1: Regulator of Chromosome Condensation
RE: Réticulum Endoplasmique

RFP: Red Fluorescent Protein
RLD: domaine RCC1-like
ROS : Espèces réactives oxygénées (ROS, Reactive Oxygen Species)
RPGR : Retinis Pigmentosa GTPase Regulator
SCMAS : sous unité c de l'ATP synthase de la mitochondrie
SLA : Sclérose Latérale Amyotrophique
SLP : Sclérose Latérale Primaire
SNARE : Soluble NSF (N-ethyl-maleimide Sensitive Factor) Attachment protein REceptor
SNC : Système Nerveux Central
SOD1 : Superoxyde Dismutase 1
SOX2 : SRY-Sex determining Region Y-box2
SSEA: Stage-Specific Embryonic Antigen
sSLA : Sclérose Latérale Amyotrophique d'origine sporadique
TARDBP: TAR DNA-Binding Protein
TDP-43: TAR DNA-Binding Protein 43
TEP : Tomographie par Emission de Positons
TGFβ: Transforming Growth Factor beta
TLR4: Toll-Like Receptor 4
TNF: Tumor Necrosis Factor
TRA: Tumor Rejection Antigen
UBQLN2: ubiquilin 2
VAPB: VAMP (Vesicle-Associated Membrane Protein)-associated protein B and C
VCP Valosine Containing Protein
VPA: l'acide valproïque
VPS39: Vacuolar Protein Sorting 39
VPS9 : Vacuolar Protein Sorting 9 domain

# Introduction

## 1. Les maladies neurodégénératives

### *1.1. Introduction*

Les maladies neurodégénératives forment un groupe hétérogène et complexe de pathologies chroniques évolutives. Elles se caractérisent par un dysfonctionnement progressif du système nerveux, provoqué par une détérioration du fonctionnement des cellules nerveuses, notamment des neurones. Certaines de ces maladies affectent l'enfant ou le jeune adulte, mais le plus souvent ce sont des pathologies qui se rencontrent après 60 ans (Table 1). Le tableau clinique peut être soit une atteinte prédominante des fonctions psychiques aboutissant à une démence comme dans la maladie d'Alzheimer, soit des atteintes motrices comme dans le cas de la Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA), ou encore l'association des deux comme dans le cas de la Chorée de Huntington. Dans certaines de ces pathologies, des facteurs génétiques ont pu être mis en causes (formes héréditaires), mais le plus souvent, elles surviennent de manière isolée (formes sporadiques) et les causes ne sont pas déterminées, même si cela n'exclut pas l'implication de facteurs génétiques. Dans tous les cas, la physiopathologie de ces maladies reste pour l'heure mal connue, et ce malgré de nombreuses études menées sur divers modèles dérivés des formes génétiques de ces pathologies.

### *1.2. Modèles d'étude des maladies neurodégénératives*

#### 1.2.1. Etudes chez l'homme

Les maladies neurodégénératives ont dans un premier temps été étudiées chez les patients et principalement à partir de biopsies réalisées après leur décès. Les études effectuées post-mortem sur des cerveaux de patients ont permis d'étudier la dégénérescence du système nerveux. Les zones préférentiellement affectées dans de nombreuses maladies neurodégénératives ont ainsi pu être identifiées (Figure 1).

Des études biochimiques réalisées sur ces prélèvements ont permis de déterminer les neurotransmetteurs affectés, comme la dopamine dans la maladie de Parkinson, l'acide γ-aminobutyrique (GABA) dans la Chorée de Huntington ou l'acétylcholine dans la maladie d'Alzheimer. Des tentatives de correction de ces défauts de neurotransmetteurs ont été réalisées sur la base de ces données, mais elles n'ont permis une amélioration que dans le cas du Parkinson avec l'administration de L-dopa aux patients. Enfin, des études histologiques menées par la suite ont permis d'identifier un certain nombre de marqueurs de ces maladies, comme les plaques d'amyloïdes ou les agrégats fibrillaires de la protéine tau dans les cerveaux de patients atteints d'Alzheimer, ou la formation d'agrégats protéiques intra ou extra cellulaires comme dans la SLA, le Parkinson ou l'Alzheimer (Young, 2009).

Aujourd'hui, les techniques d'imagerie telles que l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) ou la Tomographie par Emission de Positons (TEP), permettent de suivre l'évolution de la pathologie chez les patients. Ces outils ont permis de déterminer un certain nombre de processus pathologiques liés à différentes pathologies neurodégénératives. Par exemple, ils ont permis de localiser et de quantifier la dégénérescence du cerveau au cours de la maladie, de savoir que lorsque la maladie de Parkinson se déclarait, 50% à 80% des neurones dopaminergiques avaient déjà dégénéré (Stoessl et al., 2011) ou encore, dans le cas de la maladie d'Alzheimer, de déterminer que la formation des plaques d'amyloïdes était un évènement précoce de la pathologie (Quigley et al., 2011). L'IRM a permis également de quantifier la perte en myéline (Stankoff et al., 2006), ce qui peut être important dans le cas de la sclérose en plaque. Néanmoins bien que de plus en plus résolutives, ces méthodes ne permettent pas d'étudier les processus pathologiques au niveau cellulaire ni moléculaire. Ces techniques sont encore aujourd'hui plus un outil de diagnostic que d'étude de la physiopathologie.

Afin de pouvoir un jour traiter ces maladies, l'étude des processus physiopathologiques mis en place progressivement au cours de la maladie est indispensable. En effet, si l'on peut envisager de pouvoir un jour bloquer l'évolution de ces pathologies, il semble compliqué de vouloir remplacer les neurones qui ont déjà dégénéré. La connaissance des premières étapes de la pathologie pourrait faciliter le développement de nouveaux traitements. Les études menées directement chez les patients étant limitées par l'impossibilité d'étudier les cellules qui dégénèrent lors des stades précoces, des modèles sont nécessaires afin de pouvoir décrypter les mécanismes sous-jacents.

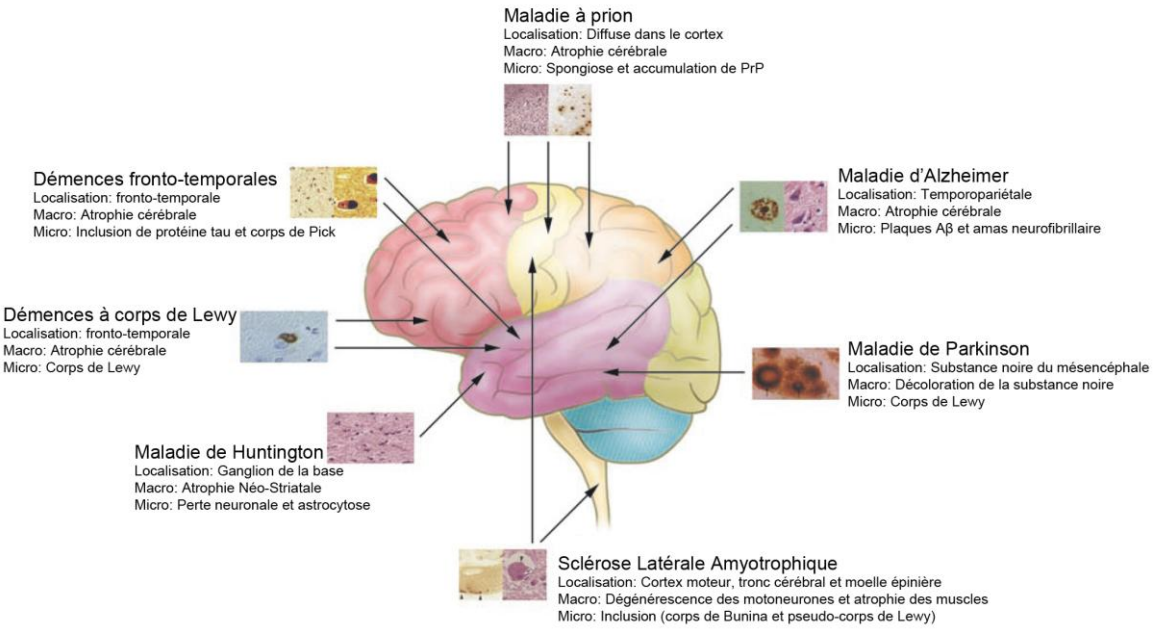



**Figure 1.** Exemples de maladies neurodégénératives et les zones du système nerveux qu'elles affectent. Macro : Observation macroscopique – Micro : Observation microscopique. Adapté de: Bertram and Tanzi, 2005.

| Pathologie | Age de début | Hérédité | Prévalence |
|---|---|---|---|
| Maladie d'Alzheimer | Adulte | Sporadique/Familliale | 1 à 5 % à 65 ans et de 20 à 25% à 85 ans |
| Maladie de Parkinson | Adulte | Sporadique<br>Autosomique dominant<br>Autosomique récessif | 1-5/10 000 |
| Sclérose latérale amyotrophique (maladie de Charcot ou de Lou Gehrig | Adulte et juvénile | Sporadique/<br>Autosomique dominant/<br>Autosomique récessif | 1-9/100 000 |
| Maladie de Huntington | Variable | Autosomique dominant | 1-9/100 000 |
| Démence à corps de Lewy | Adulte | Autosomique dominant | 6-9/10 000 |
| Démences fronto-temporales (maladie de Pick) | Adulte | Autosomique dominant | 4-9/100 000 |
| Sclérose latérale primitive | Variable | Autosomique récessif | 1-9/100 000 |
| Sclérose en plaques | Adulte | Polygénique/polyfactoriel | 6-9/10 000 |
| Ataxie de Friedreich | Enfance | Autosomique récessif | 1-9/100 000 |
| Hypoplasies olivo-ponto-cérébelleuses de type I/II | Néonatale/petite enfance | Autosomique récessif | <1/1 000 000 |
| leucodystrophies | Variable | Autosomique récessif<br>Récéssif lié à l'X<br>Dominant lié à l'X | 2/1000 |
| Amyotrophie spinale infantile liée à l'X | Néonatale/petite enfance | Récessif lié à l'X | |
| Syndrome tremblement-ataxie lié à une prémutation de l'X fragile | Adulte | Dominant lié à l'X | 1-9/100 000 |
| Atrophie multisystématisée | Adulte | Sporadique | 1-9/100 000 |
| Ataxie spinocérébelleuse | Variable | Autosomique dominante<br>Autosomique récessif | 1-9/100 000 |
| Adrénoleucodystrophie liée à l'X | Variable | Récessif lié à l'X | 1-9/100 000 |
| Paraplégie spastique familiale | Variable | Sporadique<br>Autosomique dominante<br>Autosomique récessive<br>Dominant lié à l'X | 1-9/100 000 |
| Maladie de Niemann-Pick | Variable | Autosomique récessif | 1-9/100 000 |
| Céroïde-lipofuscinose neuronale juvénile | Enfance | Autosomique récessif | 1-9/1 000 000 |
| Maladie de Sandhoff | Variable | Autosomique récessif | 1-9/1 000 000 |
| Bêta-mannosidose | Néonatale/petite enfance | Autosomique récessif | <1/1 000 000 |
| Maladie de Gaucher | Néonatale/petite enfance | Autosomique récessif | <1/1 000 000 |
| Sialidose | Enfance | Autosomique récessif | <1/1 000 000 |
| Mucopolysaccharidose type IIIA | Enfance | Autosomique récessif | 1-9/1 000 000 |
| Mucopolysaccharidose type IIIB | Néonatale/petite enfance | Autosomique récessif | <1/1 000 000 |
| Mucopolysaccharidose type IIIC | | Autosomique récessif | <1/1 000 000 |
| Mucopolysaccharidose type IIID | | Autosomique récessif | <1/1 000 000 |

**Tableau 1.** Exemples de maladies neurodégénératives (sources : http://OMIN.org ; http://Orpha.net).

### 1.2.2. Modèles animaux

Dans les années 1950, l'un des premiers modèle animal de maladies neurodégénératives a été obtenu par l'administration de réserpine. Cette molécule a permis une déplétion en dopamine et a entraîné un phénotype pseudo-parkinsonien chez les lapins traités (Carlsson, 1959). Pendant les années qui suivirent plusieurs autres maladies neurodégénératives ont été modélisées de la même manière à l'aide de molécules provoquant des lésions dans des régions spécifiques du cerveau : par exemple avec la 6-hydroxydopamine, le MPTP (1-méthyle 4-phényl 1,2,3,6-tétrahydro pyridine), le kaïnate ou encore le quinolate pour modéliser la maladie de Parkinson (Young, 2009). Ces molécules permettent de détruire des zones spécifiques du cerveau et donc de créer un phénotype proche de celui de certaines pathologies. Elles ont permis de déterminer les zones touchées par différentes pathologies ainsi qu'une meilleure compréhension de la neuroanatomie et de l'organisation du cerveau. Néanmoins, même si le phénotype obtenu peut être similaire à la maladie humaine, la cause de la mort des neurones peut être différente. En effet, de telles molécules ne sont dans la majorité des cas pas impliquées dans le déclenchement de ces pathologies. Ces neurotoxines ne permettent donc pas d'étudier les causes pathologiques les plus fréquentes de la mort des neurones. Les modèles générés de cette manière ne sont donc pas nécessairement adaptés à la recherche thérapeutique.

Par la suite, de nombreuses mutations génétiques ont pu être identifiées comme étant impliquées dans les maladies neurodégénératives. La découverte de ces mutations a permis la génération de modèles animaux. Dans certains cas, ces pathologies peuvent être provoquées par des mutations dans un seul gène, comme dans le cas des mucopolysaccharidoses ou de la maladie de Huntington. Mais le plus souvent, les gènes identifiés ne sont responsables que d'une partie des cas. Par exemple dans le cas de la SLA, les mutations dans le gène le plus étudié, celui de la superoxyde dismutase (SOD1), ne sont responsables que d'environ 2% de l'ensemble des cas. Enfin les mutations génétiques impliquées n'ont pas toujours une pénétrance complète et agissent plus comme des facteurs de risque. C'est par exemple le cas de certaines de celles associées à la maladie d'Alzheimer ou au Parkinson. Néanmoins, même si ces altérations génétiques ne sont pas toujours représentatives de l'ensemble des patients, elles offrent la possibilité de créer des modèles pouvant aider à la compréhension de la physiopathologie de la maladie et notamment la mise en place des évènements les plus précoces.

#### 1.2.2.1. Modèles murins

Des modèles de souris transgéniques ont été générés pour de nombreuses maladies neurodégénératives. Ils sont à l'origine des principales connaissances disponibles actuellement relatives à ces maladies. Par exemple, de nombreux modèles murins ont été générés en utilisant le gène SOD1 dans le cas de la SLA. Ce gène fut le premier des gènes identifiés dans cette pathologie et de nombreuses mutations dans celui-ci ont été découvertes depuis (plus de 150). Les souris dans lesquelles le gène SOD1 a été inactivé n'ont pas présenté pas de pathologie semblable à la SLA (Reaume et al., 1996), alors que des souris qui surexprimaient une forme mutante du gène développaient une pathologie similaire à celle de l'homme. De nombreux modèles ont été générés en utilisant différentes mutations de SOD1. Dans tous les cas, la surexpression est importante et peut représenter jusqu'à 40 fois le niveau d'expression physiologique de SOD1 chez la souris. Ces modèles ont ainsi permis de déterminer un certain nombre des processus qui pourraient être impliqués dans la maladie, comme une toxicité des formes mutantes de SOD1 ou la présence d'agrégats protéiques dans les motoneurones.

Dans le cas d'autres pathologies, l'obtention d'un modèle peut être plus compliquée. Par exemple, dans le cas de la maladie de Parkinson des modèles ont été générés après l'identification de mutations dans des gènes comme celui de l'α-synucléine ou de la PARKIN (pour une revue, voir Antony et al., 2011). La présence de l'α-synucléine dans les corps de Lewy, des inclusions neuronales caractéristiques de la maladie de Parkinson, ainsi que des mutations dans le gène qui la code dans des cas de forme familiale de cette pathologie, ont conduit à réaliser des modèles murins surexprimant cette protéine. Les souris ont présenté alors des inclusions contenant de l'α-synucléine, mais pas de dégénérescence des neurones dopaminergiques (Antony et al., 2011). Les mutations dans le gène de la PARKIN sont la cause la plus fréquente de maladie de Parkison familiale récessive à début précoce. Les souris inactivées pour le gène de la parkin ont présenté quelques atteintes comme des déficits moteurs et prémoteurs typiques de la maladie, comprenant une diminution de la libération de dopamine, des anomalies synaptiques, des dommages mitochondriaux et une augmentation du stress oxydatif, mais pas de neurodégénérescence des neurones dopaminergiques (Antony et al., 2011). Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, les modèles murins existants ne récapitulent pas non plus l'intégralité du phénotype pathologique. Les modèles murins surexprimant le gène humain mutant de la protéine APP (Amyloid Precursor Protein) ou les modèles surexprimant à la fois les gènes des protéines APP et de la preseniline ont présenté certaines des caractéristiques de la maladie comme les plaques d'amyloïdes, mais pas les agrégats fibrillaires de protéines tau qui sont également caractéristiques de la maladie. Pour obtenir des souris développant ces agrégats, la surexpression de la protéine tau mutante a été nécessaire. Afin d'obtenir des souris reproduisant plus

fidèlement le phénotype de la maladie d'Alzheimer, des souris surexprimant à la fois les gènes de l'APP, de la preseniline et de tau ont été générées. Néanmoins, dans tous ces modèles de souris, la perte neuronale n'a pas été observée de manière évidente (Antony et al., 2011).

Comme décrit dans les cas du Parkinson, ou de l'Alzheimer, il peut être nécessaire de générer des souris dans lesquelles plusieurs gènes ont été inactivées ou surexprimées simultanément pour obtenir un phénotype se rapprochant de celui des patients, ce qui peut poser des questions quant à la validité des phénotypes observés sur ces modèles. De plus les mutations utilisées pour générer les modèles dans le cas de ces maladies ou de la SLA ne sont souvent représentatifs que d'une faible proportion des patients atteints par ces affections. La question de la représentativité de ou des altérations observées peut donc également être posée.

#### 1.2.2.2. Autres modèles animaux

D'autres modèles animaux sont utilisés pour étudier les maladies neurodégénératives. On peut citer par exemple la drosophile, le nématode ou le poisson zèbre. Les intérêts de ces modèles sont multiples. Tout d'abord, ils ont un cycle de génération court et prolifique permettant des manipulations génétiques plus aisées que chez les mammifères. De plus ils possèdent un système nerveux plus simple. Par exemple le nématode possède 302 neurones dont les positions, les identités et les connexions sont identiques d'un animal à l'autre. D'autre part les neurones sont facilement observables chez ces animaux. En effet le nématode est transparent, tout comme le poisson zèbre lors de son développement. Ces modèles, bien que génétiquement plus éloignés de l'homme, présentent donc de nombreux avantages pour l'étude de ces pathologies.

La drosophile a été utilisée, par exemple, pour modéliser la forme de SLA causée par des mutations dans le gène TARDBP qui code la protéine TDP-43 (TAR DNA-binding protein 43) (Li et al., 2010b). La surexpression de la forme humaine de cette protéine dans les motoneurones de drosophile a induit leur mort. Des études ont également été conduites chez le poisson zèbre, chez qui la surexpression de la forme mutante de TDP-43 a provoqué des altérations motrices telles qu'une diminution de la longueur des axones des motoneurones, le développement de branchements surnuméraires et prématurés ainsi qu'une nage défectueuse des poissons (Kabashi et al., 2010). Le nématode est aussi utilisé pour étudier les formes génétiques des maladies neurodégénératives. Il a été utilisé par exemple pour modéliser des SLA causées par des mutations du gène SOD1. L'expression de la forme mutante de la protéine humaine a entraîné, entre autres, des défauts locomoteurs accompagnés d'agrégats de la protéine SOD1 (Oeda et al., 2001).

Ces modèles sont particulièrement adaptés aux études portant sur la fonction des gènes et des protéines. Néanmoins, ces animaux restent très éloignés génétiquement de l'homme, et des altérations génétiques humaines qui conduisent à une pathologie ne se traduisent pas toujours par un phénotype équivalent chez ces animaux.

### 1.2.3. Modèles cellulaires

#### 1.2.3.1. Cellules issues des modèles animaux

Les modèles murins des maladies neurodégénératives permettent non seulement d'étudier les phénotypes pathologiques *in vivo*, mais ils offrent de plus la possibilité d'étudier les cellules en culture à différents stades de la pathologie. Les cellules peuvent être prélevées chez des individus adultes comme chez des embryons. Les types cellulaires utilisés sont variables allant des fibroblastes aux cellules neurales. Dans le cas de la SLA, une étude réalisée sur la prolifération des cellules satellites du muscle squelettique issus de souris surexprimant la proteine SOD1 mutée a montré un défaut de prolifération (Manzano et al., 2012). Des études sur des cultures de neurones primaires de souris a permis d'étudier des phénotypes intrinsèques aux cellules d'intérêt, tels que des défauts de la croissance des prolongements neuronaux comme dans le cas de la SLA ou de la mucopolysaccharidose de type IIIB (Tudor et al., 2005; Hocquemiller et al., 2010).

#### 1.2.3.2. Cellules humaines

##### *1.2.3.2.1. Cellules primaires et lignées*

Des cellules primaires issues des patients peuvent être utilisées lorsqu'elles sont facilement accessibles, comme les fibroblastes ou les cellules sanguines. Même si ce ne sont pas les cellules affectées dans les maladies neurodégénératives, elles peuvent être utilisées afin d'étudier les défauts moléculaires sous-jacents à ces pathologies. Par exemple, une étude sur des fibroblastes de patients atteints de la maladie de Parkinson et porteurs d'une mutation dans le gène PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1) a permis de montrer que des mécanismes bioénergétiques mitochondriaux pouvaient être altérés (Abramov et al., 2011). Des altérations des fonctions mitochondriales ont ensuite été observées dans les cerveaux de patients

ou chez la souris mutante, validant les observations faites sur les fibroblastes (Gautier et al., 2012).

A côté des cellules primaires, de nombreuses lignées cellulaires sont utilisées comme modèles. Les intérêts de ces lignées cellulaires sont leur facilité de culture comparativement aux cellules primaires et la possibilité de les modifier génétiquement plus aisément. Ces lignées comme les cellules HEK293 ou les cellules HeLa qui sont éloignées des cellules neurales permettent surtout d'étudier l'impact d'altérations génétiques sur des processus cellulaires ubiquitaires comme la synthèse des protéines, le transport vésiculaire ou encore l'intégrité des organites intracellulaires comme les mitochondries ou l'appareil de Golgi (Roy et al., 2012). Des lignées plus proches des cellules neurales comme les cellules de neuroblastome SH-SY5Y sont également utilisées pour étudier les maladies neurodégénératives. Cette lignée peut être différenciée en neurones dopaminergiques et est donc utilisée comme modèle de la maladie de Parkinson (Xie et al., 2010). Cependant, le caractère tumoral de ces cellules peut infléchir les phénotypes obtenus. D'autre part, ces cellules sont plutôt des modèles « aigus » de pathologies par opposition aux cellules des patients qui « expriment » chroniquement une mutation. Ainsi les lignées génétiquement modifiées ne vont pas avoir la possibilité de s'être adaptées à l'expression d'un gène mutant ou à son extinction. Cette particularité fait que ces lignées peuvent permettre plus directement d'observer les conséquences d'une anomalie génétique, mais dans le même temps, les défauts observés ne sont pas nécessairement représentatifs.

#### *1.2.3.2.2. Cellules souches embryonnaires*

Bien que leur utilisation soit interdite en France, sauf dérogation, les cellules souches embryonnaires (ES) humaines offrent des perspectives très intéressantes dans le cadre de l'étude des maladies neurodégénératives. En effet, elles peuvent générer l'ensemble des cellules de l'organisme et donc par ce biais permettre l'obtention des cellules affectées tels que les neurones. Néanmoins, l'obtention de cellules souches embryonnaires humaines présentant des mutations génétiques responsables de maladies neurodégénératives est compliquée puisqu'en France seuls les embryons porteurs de mutation provenant de diagnostic préimplantatoire peuvent être utilisés. Cela limite donc fortement le nombre de maladies pouvant être modélisées par cette approche. Pour pallier à cette limitation, l'une des solutions est de modifier génétiquement ces cellules afin de leur faire exprimer une mutation. Cette opération a été réalisée pour la première fois en 2006 en générant des cellules embryonnaires humaines porteuses de la mutation responsable du syndrome de Lesch-Nyhan (Urbach et al., 2004). Mais cette technique, même si elle est possible, reste peu efficace sur ce type de cellules. Quelques lignées de cellules embryonnaires

humaines de maladies neurodégénératives ont tout de même pu être établies, comme pour la maladie de Huntington et les ataxies spino-cérébelleuses de type 2 et 7 (Mateizel et al., 2006, 2010). Néanmoins, jusqu'à présent, aucun phénotype associé à ces pathologies n'a été décrit dans les cellules de ces lignées.

#### *1.2.3.2.3. Les cellules souches pluripotentes induites*

Depuis 2007 et la génération des premières cellules souches pluripotentes induites humaines (iPS) à partir de cellules somatiques, de nouvelles perspectives sont apparues pour l'étude des maladies neurodégénératives. En effet, ces cellules permettent comme les cellules souches embryonnaires humaines de générer l'ensemble des cellules de l'organisme. De plus, elles sont issues de cellules somatiques et ne sont donc pas soumises aux mêmes règlementations, ce qui rend leur utilisation autorisée en France. Enfin, le fait de pouvoir générer des cellules pluripotentes directement avec des cellules somatiques offre la possibilité de prélever des cellules de chaque patient atteint par une maladie neurodégénérative, de les reprogrammer, puis de les différencier dans les cellules d'intérêt. Ces cellules iPS, sont décrites en détails au chapitre 7.

# 2. Les maladies de surcharge lysosomale

## *2.1. Introduction*

Les maladies de surcharge lysosomale forment un groupe hétérogène qui comprend une cinquantaine de pathologies héréditaires caractérisées par l'accumulation de macromolécules partiellement ou non digérées. Ceci entraine des dysfonctionnements cellulaires se traduisant par des anomalies cliniques. Parmi les troubles généralement observés, on peut citer des organomégalies, des retards du développement, ou encore des atteintes du système nerveux central (SNC). Prises séparément, ce sont des maladies rares, mais prises dans leur ensemble elles touchent près d'un sujet sur 5000 (Meikle et al., 1999). Les maladies lysosomales étaient habituellement classifiées en fonction de la nature du premier substrat accumulé. Néanmoins, la classification selon le type de protéine déficiente semble aujourd'hui plus pertinente (Tableau 2).

Ces maladies sont causées par une mutation dans un seul gène. Elles sont héréditaires et leur transmission est le plus souvent récessive hormis quelques unes où la transmission est liée à l'X comme la maladie de Fabry. Classiquement les maladies lysosomales sont provoquées par la déficience d'une hydrolase lysosomale, mais elles peuvent aussi être causées par la déficience d'autres protéines nécessaires au bon fonctionnement du lysosome, comme celles impliquées dans les modifications post-traductionnelles des enzymes lysosomales ou dans leur transport vers les lysosomes (Ruivo et al., 2009) (Tableau 2).

Le dysfonctionnement du lysosome entraîne l'interruption de la dégradation d'un métabolite et mène à l'accumulation de substrats partiellement dégradés. Le matériel qui est accumulé initialement dans les endosomes, puis dans les lysosomes et éventuellement dans les autres compartiments cellulaires et dans l'environnement extracellulaire, va perturber le fonctionnement cellulaire.

Il existe pour certaines de ces maladies des traitements plus ou moins efficaces comme la greffe de moelle osseuse ou l'enzymothérapie. Mais ces méthodes de traitement restent inefficaces pour traiter les atteintes neurologiques, sans doute à cause de la difficulté de franchissement de la barrière hémato-encéphalique. Une solution pour soigner les troubles neurologiques pourrait être la thérapie génique en apportant l'enzyme directement dans le cerveau des patients. Le laboratoire de Jean Michel Heard est aujourd'hui directement impliqué dans la mise en place de tels essais de thérapie génique pour la maladie de Sanfilippo.

| Maladie | Protéine déficiente | Métabolite accumulé |
|---|---|---|
| **Déficience en hydrolase lysosomale ou en un co-activateur** | | |
| ***Déficit dans la dégradation des glycosaminoglycanes (Mucopolysaccharidose - MPS)*** | | |
| MPSI (maladie de Hurler, de Scheie et de Hurler-Scheie ) | α-L-iduronidase | HS/DS |
| MPSII (maladie de Hunter) | iduronate 2-sulfatase | HS/DS |
| MPSIIIA (maladie de Sanfilippo A) | héparane N-sulfamidase (sulfatase) | HS |
| MPSIIIB (maladie de Sanfilippo B) | α-N-acétyl-alpha-glucosaminidase | HS |
| MPSIIIC (maladie de Sanfilippo C) | Acetyl-CoA:α-glucosaminide acétyltransférase | HS |
| MPSIIID (maladie de Sanfilippo D) | N-acétylglucosamine-6-sulfatase | HS |
| MPSIVA (maladie de Morquio A) | Galactose-6-sulfatase | KS |
| MPSIVB (maladie de Morquio B) | β-galactosidase | KS |
| MPSVI (maladie de Maroteaux-Lamy) | Galactosamine-4-Sulfatase | DS |
| MPSVII (Sly) | β-glucuronidase | DS/HS/CS |
| ***Déficit dans la dégradation de la partie glycane des glycoprotéines*** | | |
| Aspartylglucosaminurie | N-aspartyl β-glucosaminidase | Aspartylglucosamine |
| Fucosidose | α-L-fucosidase | Fucosyl-oligosaccharides/fucosyl-glycolipides |
| α-mannosidose | α-D-mannosidase lysosomale | α-mannosyl-oligosacharides |
| β-mannosidose | β-mannosidase lysosomale | β-mannosyl-oligosacharides |
| Maladie de Schindler et maladie deKanzaki | α-N-acetylgalactosaminidase ou α-galactosidase B | Oligosaccharides/GAGs/glycosphingolipides |
| sialidose | α-neuraminidase | Sialyloligosaccharides |
| ***Déficit dans la dégradation du glycogène*** | | |
| Maladie de Pompe (glycogénose de type II) | α-1,4-glucosidase acide ou maltase acide | Glycogène |
| ***Déficit dans la dégradation des composants des Sphingolipides*** | | |
| Maladie de Fabry | α-galactosidase A | Globotriaosyl-digalactosylceramide |
| Maladie de Farber | Céramidase | Ceramide |
| Maladie de Gaucher | β-glucosidase acide/glucocérébrosidase ou son activateur la saposine C | Glucosylceramide |
| Gangliosidose à GM1 de type I, II et III | β-galactosidase | Gangliosides GM1/galactosyloligosaccharide/KS |
| Maladie de Tay-Sachs (Gangliosidose à GM2 variants B) | β-hexosaminidase A (chaîne α) | Gangliosides GM2/asialo-GM2 |
| Maladie de Sandhoff (Gangliosidose à GM2, variant 0) | β-hexosaminidases A et B (chaîne β) | Gangliosides GM2/asialo-GM2/globoside |
| Gangliosidose à GM2 variant AB | Activateur GM2 | Gangliosides GM2/asialo-GM2 |
| Maladie de Krabbe | Galactocérébrosidase | Galactosylceramide/galactosylsphingosine |
| Leucodystrophie métachromatique | Arylsulfatase A ou son activateur la saposine B | Sulfatides/Gangliosides GM1/glycolipides |
| Maladie de Niemann-Pick A et B | Sphingomyélinase | Sphingomyeline |
| Déficit global en prosaposine | Prosaposine (précurseurs des saposine A, B, C et D) | Glucosylceramide/sulfatide/ceramide |
| ***Déficit dans la dégradation des polypeptides*** | | |
| Pycnodysostose | Cathepsine K | Fragments de collagène |
| ***Déficit dans la dégradation des lipides*** | | |
| Maladie de Wolman | Lipase acide | Esters de cholestérol |
| ***Autres*** | | |
| Ceroid lipofuscinose neuronale de type 1 | Palmitoyl protéine thiostérase (PPT) | Saponine |
| Ceroid lipofuscinose neuronale de type 2 | Tripeptidyl-peptidase I (TPP) | scMAS |
| **Déficience en protéine membranaire et en transporteur lysosomaux** | | |
| Ceroid lipofuscinose neuronale de type 3 | Battenine (CNL3) | scMAS |
| Ceroid lipofuscinose neuronale de type 5 | Glycoprotéine lysosomal (CNL5) | scMAS |
| Ceroid lipofuscinose neuronale de type 6 | Protéine transmembranaire (CNL6) | scMAS |
| Ceroid lipofuscinose neuronale de type 7 | Transporteur lysosomal putatif (MFSD8) | ? |
| Ceroid lipofuscinose neuronale de type 8 | Protéine transmembranaire (CNL8) | scMAS |
| Maladie de Niemann-Pick type C1 | NPC-1 (transporteur membranaire) | Cholestérol/sphinglipides |
| Maladie de Niemann-Pick type C2 | NPC-2 (Transporteur soluble) | Cholestérol/sphinglipides |
| Cystinose | Transporteur de la cystine | Cystine |
| Maladie de surcharge en acide sialique libre (maladie de Sala) | Transporteur de l'acide sialique | Acide sialique |
| **Déficience multiple d'enzymes lysosomales** | | |
| ***Déficience en protéine de protection des enzymes lysosomales*** | | |
| Galactosialidoses | Cathepsine A (protège la β-galacosidase et la neuraminidase) | Sialyloligosaccharides/galactosyloligosaccharide |
| ***Déficience en enzyme de modifications post-traductionnelles dans le RE et dans le Golgi*** | | |
| Maladie de Austin (Déficites multiples en sulfatase) | Facteur de modification des sulfatase 1 (SUMF1) | Lipides sulfatés/GAGs |
| Mucolipidose type 2 (Maladie des cellules à inclusions) | N-acétylglucosamine-1-phosphotransférase (sous-unitées α et β ; GNPTAB) | Oligosaccharides/GAGs/lipides |
| Mucolipidose type 3 (Pseudo-polydystrophie de Hurler) | N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase (sous-unité γ ; GNPTG) | Oligosaccharides/GAGs/lipides |
| **Déficience en protéine impliquée dans le trafic intracellulaire** | | |
| Mucolipidose type 4 | mucolipine-1 (MCOLN1) | Déficience dans la voie de l'endocytose |
| Glycogénose par déficit en LAMP-2 (Maladie de Danon) | LAMP-2 | Déficience dans la voie de l'autophagie |

**Tableau 2.** Classification des maladies de surcharge lysosomale en fonction de la protéine déficiente. La MPSIIIB est encadrée en rouge. HS : Héparane sulfate ; DS : Dermatane sulfate ; KS : kératane sulfate ; CS : chondroïtine sulfate ; GAGs : glycosaminoglycanes ; scMAS : sous-unité c de l'ATP synthase mitochondriale. Adapté de Wraith, 2002; Roy, 2012.

## *2.2. Les Mucopolysaccharidoses*

Les mucopolysaccharidoses (MPS) sont un groupe de maladies lysosomales provoquées par une déficience dans l'une des enzymes catalysant la dégradation des glycosaminoglycanes (GAGs) et qui se caractérisent par une accumulation de GAGs partiellement dégradés. Cette accumulation entraîne des dysfonctionnements cellulaires et tissulaires. Les MPS ont dans leur ensemble une prévalence d'environ 1/25 000 naissances. La classification des MPS comprend aujourd'hui dix pathologies dans lesquelles on observe des déficiences de dégradation d'un ou plusieurs GAGs. Il existe les MPS de type I, II, III, IV, VI et VII. Les MPS de type III comptent quatre sous groupes (IIIA, IIIB, IIIC et IIID) et les MPS IV en comprennent deux (IV A et IVB) (Neufeld and Muenzer, 2001) (voir Tableau 2). Il est intéressant de constater que la présence d'héparanes sulfates (HS) parmi les GAGs accumulés dans les maladies de surcharge lysosomale semble corrélée aux atteintes du SNC, alors que les autres GAGs semblent plus impliqués dans les atteintes périphériques. Cela suggère que la toxicité des oligosaccharides d'héparanes sulfates (HSO) serait spécifique du SNC.

Les mucopolysaccharidoses de type III ou syndrome de Sanfilippo pourraient être classées parmi les MPS les plus sévères. Elles se caractérisent toujours par une atteinte du SNC associée à des signes périphériques modérés. Elles sont provoquées par une interruption de la chaîne de dégradation des héparanes sulfates. L'incidence des MPSIII est inférieure à 1 pour 100 000 naissances en Europe (Héron et al., 2011). Chacun des quatre sous types de MPSIII est du à une déficience en une enzyme différente (voir Tableau 2).

Les quatre sous types de MPSIII sont très proches au niveau clinique même si on peut observer de grande variabilité de la symptomatologie clinique au sein même d'un sous type ou de patients d'une même famille (Perkins et al., 2001). La MPSIIIA est néanmoins considérée comme la plus sévère avec un début plus précoce. La pathologie évolue plus ou moins vite selon les malades, dans certains cas l'évolution est régulière alors que dans d'autres, elle se fait par des dégradations brutales entrecoupées de phases stables.

Les signes cliniques que l'on retrouve le plus fréquemment dans les quatre MPSIII sont principalement neurologiques. La pathologie débute en général entre 2 et 6 ans avec dans un premier temps un retard de développement et des troubles du comportement. Le retard de développement porte sur le langage. Par exemple, les troubles de la parole, avec une articulation défectueuse et un vocabulaire pauvre sont très fréquents. Dans les formes les plus sévères, certains enfants n'apprennent jamais à parler. Les troubles du comportement comprennent habituellement des défauts d'attention, une hyperactivité ainsi qu'une agressivité. Enfin, on observe une régression intellectuelle rapide et sévère. L'atteinte somatique est en revanche

modérée avec au début une macrocéphalie et une avance staturo-pondérale. La dysmorphie faciale, classiquement observée dans les maladies lysosomales, est modérée ou absente, les cheveux sont parfois épais et drus, l'atteinte squelettique est discrète et relativement tardive. Une hépato-splénomégalie modérée est souvent présente chez les jeunes enfants mais disparait ensuite le plus souvent. Une surdité est classique même dans les formes modérées. A partir de 10 ans, les enfants sont souvent plus calmes, ils développent des troubles orthopédiques, des troubles de l'alimentation et du transit, des troubles du sommeil. Des convulsions et des surinfections des voies respiratoires sont fréquentes. Dans la phase finale, les malades sont en général grabataires, ils perdent tout contact avec leur entourage et développent une profonde démence. Le décès survient en général vers 20 ans souvent à la suite d'une infection respiratoire. Quelques cas avec une survie prolongée ont néanmoins été rapportés.

## *2.3. La mucopolysaccharidose de type III B (MPSIIIB)*

### 2.3.1. Description

La MPSIIIB se caractérise par un retard mental sévère, avec de nombreux troubles du comportement comprenant une hyperactivité, de l'agressivité et de nombreux troubles du sommeil. Les atteintes périphériques sont modérées et comportent entre autre une hépatomégalie et une cardiomégalie. Cette pathologie est provoquée par une déficience de l'enzyme α-N-Acétyl-glucosaminidase (NAGLU) qui entraine l'accumulation d'héparanes sulfates partiellement dégradés. Sa prévalence est inférieure à 1/100 000 naissance. Le gène codant l'enzyme NAGLU a été cloné en 1995 (Zhao et al., 1995). Cette découverte à permis la création d'un modèle murin par inactivation du gène (Li et al., 1999). Ce modèle est depuis utilisé pour étudier la physiopathologie ainsi que pour rechercher des traitements (Voir chapitre 2.2.4.) Quelques animaux présentent naturellement cette maladie comme le chien ou un oiseau (l'ému) et sont également utilisés.

### 2.3.2. Métabolites accumulés dans la MPSIIIB

Les mucopolysaccharidoses sont provoquées par l'absence d'une hydrolase lysosomale qui provoque l'accumulation de GAGs partiellement dégradés. Pour comprendre comment l'accumulation de tels métabolites peut provoquer des

altérations du fonctionnement des cellules, il est nécessaire de connaitre leur rôle et leur voie de dégradation.

Dans les MPSIII, ce sont des oligosaccharides d'héparanes sulfates (HS) qui sont accumulés. Les HS sont des GAGs dont les unités disaccharidiques sont composées d'un acide hexuronique relié par une liaison α1 – 4 à une glucosamine. Les GAGs sont de longs polysaccharides non ramifiés constitués par des répétitions d'unités disaccharidiques. Ils sont classés selon la nature des oses qui les composent et par la façon dont ils sont liés. Les différentes familles de GAGs sont les chondroïtine sulfates, les dermatane sulfates, les kératane sulfates ou encore les héparanes sulfates (HS). Les GAGs ont de nombreuses fonctions cellulaires qu'ils exercent sous forme de protéoglycanes. Ces dernières sont des macromolécules hydrophiles majoritairement situées à la surface des cellules, dans les matrices extracellulaires. Ils peuvent être, dans certains cas, intracellulaires voire circulants. Ils sont constitués d'un noyau protéique sur lequel sont greffés un ou plusieurs GAGs. Leurs fonctions peuvent être exercées aussi bien par leur noyau protéique que par leurs chaînes oligosaccharidiques. En règle générale, la partie protéique va principalement permettre la localisation et les GAGs vont agir en se liant à diverses protéines. La diversité de ces partenaires protéiques est particulièrement vaste (facteurs de croissances, cytokines, protéines de la matrice extracellulaire…) et fait donc que les protéoglycanes sont impliqués dans de très nombreux processus cellulaires tels que la croissance, la migration, la prolifération ou encore dans la différenciation (Sasisekharan et al., 2006).

### 2.3.3. Rôle des protéoglycanes à héparanes sulfates

Les protéoglycanes à héparanes sulfates (HSPG) possèdent de nombreuses fonctions cellulaires qu'ils assurent via les sites de fixation à de nombreuses protéines que contiennent les HS. Par exemple, ils interagissent, via des interactions électrostatiques avec de très nombreux facteurs de croissance (bFGF, EGF…), ainsi qu'avec des chemokines (IL-8), avec des molécules d'adhésion telles que la NCAM, ou avec des protéines de la matrice extracellulaire (fibronectine, laminine, collagène...). Dans le cas des facteurs de croissance tels que le bFGF (basic Fibroblast Growth Factors, FGF2), les HSPG jouent le rôle de co-facteurs. Ils pourraient également moduler la réponse cellulaire à ces facteurs. Par exemple dans le cas du bFGF, ce dernier régule la prolifération et la différenciation cellulaire en se fixant au récepteur au FGF (FGFR) qui est activé en se dimérisant. Les HSPG sont nécessaires d'une part pour que le bFGF ait une forte affinité pour son récepteur et d'autre part en induisant la formation d'un dimère de bFGF et en favorisant la formation du dimère transitoire des récepteurs. Ces deux actions des HSPG se font

via des interactions spécifiques avec à la fois le bFGF et avec le FGFR et permettent la transduction du signal (Sasisekharan et al., 2006).

### 2.3.4. Dégradation des HS

La première étape du recyclage des HS consiste en leur séparation du corps protéique de HSPG. Celle-ci se fait soit en extracellulaire, au niveau de la membrane plasmique, soit après endocytose. Dans les endosomes, des enzymes (héparanases et protéases) vont respectivement cliver les chaines d'HS et le noyau protéique formant ainsi des oligosaccharides d'héparanes sulfates (HSO). Au cours de cette étape, les HS sont clivés en petits fragments ayant une masse moyenne d'environ 5 kDa. Les étapes finales de la dégradation des HSO vont se dérouler au sein des lysosomes (Figure 2), où les monosaccharides vont être retirés via une série d'étapes bien définies. Elles comprennent des modifications biochimiques (désulfatation) et des clivages. Les enzymes qui participent à ces étapes finales de la dégradation des HS sont toutes impliquées dans différentes MPS (Figure 3), dans lesquelles la dégradation s'arrête aux HSO. Ces derniers sont des fragments d'HS qui possèdent encore la capacité d'interagir avec de nombreux partenaires.

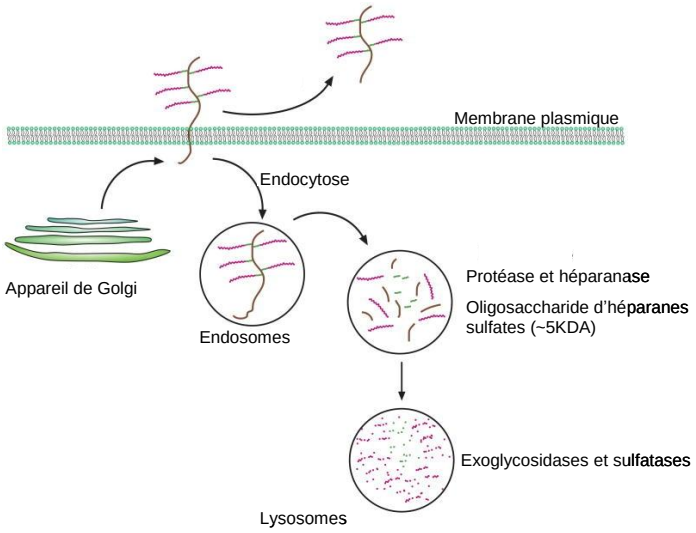



**Figure 2.** Cycles des HS. Les HSPG sont synthétisés par l'appareil de Golgi, puis transportés à la membrane cellulaire. Pour les dégrader, ils sont soit séparés de la membrane plasmique en extracellulaire, soit endocytés pour être dégradés dans les lysosomes. *Adapté de Varki, 2009 Essentials of Glycobiology. 2nd edition.*

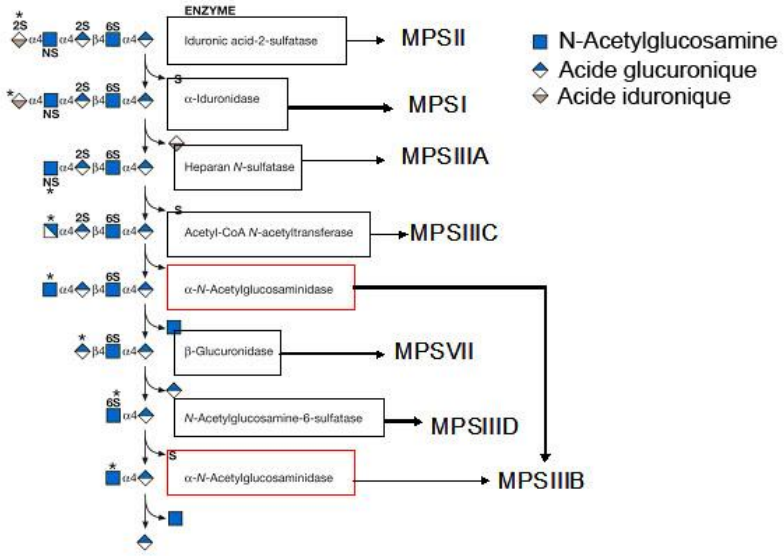



**Figure 3.** Etapes finales de la dégradation des HS dans le lysosome. *Adapté de Varki, 2009 Essentials of Glycobiology. 2nd edition.*

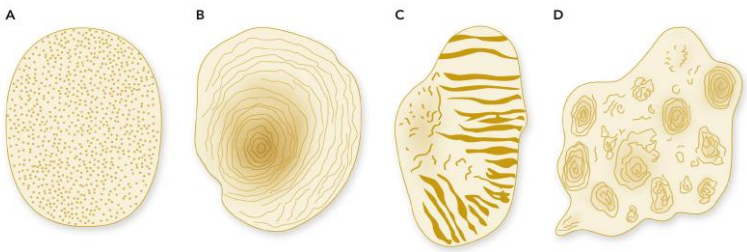



**Figure 4.** Les différents types de vésicules accumulées dans les MPSs. A : matériel clair et amorphe. B : matériel composé de structures multilamélaires en forme d'empreintes digitales. C : matériel composé de piles denses de membranes formant un corps zébré (*zebra bodies*). D : matériel lamellaire. Adapté de Parkinson-Lawrence et al., 2010.

## *2.4. Physiopathologie de la MPSIIIB*

La physiopathologie de la MPSIIIB a d'abord été étudiée sur des biopsies post-mortem de patients. Ces études ont permis de dresser un tableau de la pathologie uniquement au stade final. Après l'identification du gène responsable de la MPSIIIB codant l'enzyme NAGLU, un modèle murin a pu être généré (Li et al., 1999). Des études menées au sein du laboratoire ont montré que les souris déficientes en NAGLU présentaient un comportement rappellant celui des enfants malades, avec notamment une hyperactivité et une perte de la peur et de la notion de danger (Cressant et al., 2004). Ces perturbations du comportement apparaissent vers le 7$^{ème}$ mois chez les souris malades. D'autre part, comme nous le verrons par la suite, les souris mutantes présentaient d'autres phénotypes proches de ceux des patients. Des cultures cellulaires primaires établies à partir de ces souris ont également permis d'étudier la physiopathologie de la MPSIIIB.

### 2.4.1. Défauts biochimiques

Au niveau biochimique, les analyses effectuées sur des liquides biologiques de patients (urines, liquide céphalo-rachidien) ont montré l'accumulation d'HS partiellement dégradés. Les analyses réalisées post-mortem ont montré que cette accumulation était accompagnée de l'accumulation secondaire des gangliosides GM2 et GM3 dans le cerveau des patients (Tamagawa et al., 1985; Hadfield et al., 1980). L'accumulation de ces métabolites a également été retrouvée dans le cerveau des souris MPSIIIB (Li et al., 1999).

### 2.4.2. Vésicules de surcharge

Les observations microscopiques des tissus de patients MPSIIIB ont révélé la présence cytoplasmique de vacuoles élargies accompagnées d'un gonflement du cytoplasme dans les macrophages, dans les cellules du foie, dans les cellules intestinales, dans les cellules rénales et surtout dans les neurones (Tamagawa et al., 1985). Cette accumulation de vésicules distendues est l'une des premières conséquences de la pathologie au niveau cellulaire. L'observation de ces vésicules en microscopie électronique a permis de mieux les caractériser. Elles contiennent un matériel hétérogène qui peut être clair et amorphe, lamellaire, composé de structures multilamellaires formant des « empreintes digitales » ou encore composé des piles

denses de membranes (appelées zebra bodies) (Figure 4) (Tamagawa et al., 1985; Hadfield et al., 1980).

La présence de vésicules de surcharge a été également retrouvée dans le cerveau des souris mutantes dès les premiers stades de la maladie. Depuis ces observations, nombreuses expériences ont été menées chez la souris afin de mieux caractériser ces vésicules.

Les vésicules de surcharge sont communément considérées comme des lysosomes engorgés par du matériel non digéré résultant du défaut génétique. Dans le cerveau des souris, il a été décrit une importante vacuolisation dans les neurones (dans le soma et dans les prolongements) et dans les cellules non neuronales telles que les cellules microgliales, les cellules périvasculaires, les méninges et les astrocytes (Cressant et al., 2004).

Des analyses ultrastructurales ont été réalisées sur des tranches de cerveaux de souris mutantes et ont montré que les vésicules étaient similaires à celles observées dans les cerveaux de patients aussi bien au niveau morphologique qu'au niveau du matériel accumulé (Vitry et al., 2010). Le diamètre des vésicules de surcharge variait de moins de 0,1 µm à plusieurs micromètres. L'accumulation des vésicules a également été observée dans des cultures primaires de neurones corticaux issus des souris MPSIIIB et leurs ultrastructures ont rappellé celles observées sur coupes de cerveaux de souris MPSIIIB.

Les vésicules de surcharge peuvent être marquées par une protéine de fusion constituée de l'enzyme lysosomale IDUA (α-L-iduronidase) et de la GFP (Green Fluorescent Protein) (Chen et al., 2006). Cette construction a permis d'analyser la dynamique des vésicules dans les neurones en culture. Il a été montré que les vésicules accumulées dans les neurones corticaux de souris MPSIIIB avaient une dynamique diffèrente de celle observée dans les neurones de souris normales. Les plus grosses vésicules, dont le diamètre était supérieur à 1 µm, étaient toujours immobiles dans les neurones MPSIIIB et formaient souvent des agrégats. Ces derniers entravaient le déplacement des petites vésicules dans les prolongements des neurones en formant des « bouchons ». Hormis ces altérations, la dynamique des petites vésicules était normale, indiquant que la machinerie de transport impliquée dans la dynamique des lysosomes ne semblait pas affectée dans la pathologie (Vitry et al., 2010).

Il a également été montré que les vésicules de surcharge observées dans les cerveaux de souris exprimaient la protéine LAMP1 (Lysosomal Associated Membrane Protein 1) qui est un marqueur des lysosomes (Ohmi et al., 2003). Des analyses en microscopie électronique après marquage par « immunogold » ont confirmé la présence de la protéine LAMP1 à la membrane de ces dernières (Vitry et al., 2010). Vitry et col. ont cherché à savoir si ces vésicules étaient liées aux voies de l'endocytose ou de l'autophagie. Ils ont montré que les vésicules de surcharge

exprimant LAMP1 n'exprimaient pas de marqueurs des endosomes précoces (Early Endosome Associated Protein 1 : EEA1 ; mannose-6-phosphate receptor : M6PR) ni LC3 (MAP1LC3A, microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha) qui est un marqueur des autophagosomes, suggérant que ces vésicules n'étaient pas liées aux voies de l'endocytose ou de l'autophagie (Vitry et al., 2010). Ils ont ensuite montré que dans les neurones de souris MPSIIIB ces vésicules distendues contenaient le marqueur du cis-Golgi GM130 (Golgi matrix protein 130) plus fréquemment que dans les neurones contrôles. Dans les neurites MPSIIIB, elles étaient également plus souvent associées au marqueur Sec23-COPII, un marqueur de vésicules en formation au niveau du réticulum endoplasmique (RE) et du pré-Golgi. Ainsi la triple localisation de LAMP1, GM130 et Sec23-COPII sur les vésicules distendues a suggéré que l'origine des vésicules distendues dans les neurones pouvaient être liée aux compartiments pré-golgiens ou golgiens (Vitry et al., 2010). Des immunomarquages ont montré que ces vésicules ne contenaient pas d'HS ni de gangliosides (Vitry et al., 2010).

Ces différents résultats ont suggéré que les vésicules distendues n'étaient pas des lysosomes engorgés mais pouvaient être associées aux compartiments pré-golgien ou au complexe golgien. L'observation de l'appareil de Golgi en microscopie électronique a ensuite montré que l'architecture de ce dernier était désorganisée dans les neurones MPSIIIB à divers degrés avec par exemple, des saccules dilatés, ou encore avec des vésicules LAMP1 en continuité avec des saccules golgiennes (Vitry et al., 2010). Enfin, une étude récente du laboratoire a permis de montrer que la formation de ces vésicules était induite par la surexpression de GM130. En effet, dans des cellules HeLa déplétées en enzyme NAGLU, l'extinction de l'expression de GM130 a conduit à une absence presque totale de ces vésicules. Par contre, dans des cellules HeLa normales, la surexpression de GM130 a entrainé la formation de vésicules présentant les mêmes caractéristiques que celles accumulées dans les cellules déficientes pour la NAGLU (Roy et al., 2012). En conclusion l'hypothèse serait que ces vésicules distendues n'auraient pas pour origine des lysosomes engorgés, mais proviendraient de défauts de l'appareil de Golgi. Elles constitueraient une sorte d'impasse en étant incapable de fusionner et s'accumuleraient donc dans les cellules.

### 2.4.3. Atteinte du cerveau et des neurones

Les analyses post-mortem sur les cerveaux des patients ont permis de mettre en évidence de nombreuses lésions et anomalies. Elles ont notamment révélé une sévère atrophie et démyélinisation cérébrale (le poids du cerveau est réduit de moitié à deux tiers) (Hadfield et al., 1980; Hamano et al., 2008). Une perte neuronale accompagnée d'une gliose a été observée dans le cerveau des patients en

particulier dans le thalamus, dans les couches III et V du cortex cérébral et particulièrement dans l'insula, dans le cortex temporal, dans la zone compacte de la substance noire, dans le noyau de l'olive inférieure, dans le cortex cérébelleux, dans le striatum et dans le noyau du raphé (Hadfield et al., 1980; Tamagawa et al., 1985). Dans les travaux de Hamano en 2008, la seule dégénérescence neuronale observée se situait dans la substance noire du cerveau des patients. Ces différences pourraient être un reflet de l'hétérogénéité phénotypique de la pathologie chez les patients. Une gliose fibrillaire plus ou moins importante suivant les régions a également été observée (Tamagawa et al., 1985). Une astrocytose dans le cortex cérébral accompagnée de la présence de macrophages a également été rapportée (Hadfield et al., 1980; Hamano et al., 2008). Enfin, de nombreux neurones étaient distendus et présentaient une importante surcharge dans de nombreuses zones du cerveau, et principalement dans le cortex ainsi qu'au niveau des cellules de Purkinje dans le cervelet de plusieurs patients (Tamagawa et al., 1985; Hamano et al., 2008).

Les études chez la souris ont montré que l'atrophie corticale, la perte neuronale et la diminution de la densité synaptique étaient présentes uniquement aux stades finaux de la maladie (Vitry et al., 2009). La mort des neurones n'est donc vraisemblablement pas responsable des premiers troubles du comportement observés dans cette pathologie. Plus probablement, les troubles comportementaux résultent d'un dysfonctionnement neuronal engendré par l'accumulation d'HSO.

Plusieurs études ont montré que les neurones de souris MPSIIIB étaient affectés. La neuritogénèse est un processus dynamique qui implique la pousse des neurites, leur branchement ou leur rétractation. La croissance neuritique est la résultante de leur pousse et de leur rétractation. La maturation de l'arbre neuritique des neurones dépend de l'équilibre de ces différents procédés. Dans les neurones corticaux de souris MPSIIIB en culture, il a été montré que cet équilibre était perturbé par la présence d'HSO (Hocquemiller et al., 2010). Des défauts de la rétractation des neurites ont été observés avec un accroissement de leur longueur et un excès de branchement. Il en a résulté un arbre neuritique plus important que la normale dans les neurones MPSIIIB. Après correction enzymatique des neurones avec un vecteur viral exprimant l'enzyme NAGLU, ces défauts ont été corrigés. De plus il a été montré que ce défaut était concomitant à l'augmentation d'expression de la protéine GAP43 (Growth Associated Protein 43) dans les neurones corticaux MPSIIIB en culture ainsi que dans les cerveaux de souris MPSIIIB (Li et al., 2002; Ausseil et al., 2008; Hocquemiller et al., 2010). GAP43 est une protéine impliquée au niveau du cône de croissance qui contrôle l'extension neuritique en réponse à des signaux externes. GAP43 peut être phosphorylée par la protéine kinase C. Quand c'est le cas, elle interagit avec diverses protéines du cytosquelette comme la F-actine qui stabilise les filaments d'actine et promeut la croissance des neurites. Lorsqu'elle est déphosphorylée elle est retrouvée au niveau des cônes de croissance de neurites en rétractation (Benowitz and Routtenberg, 1997). L'augmentation de l'expression de GAP43 pourrait donc être impliquée dans la croissance excessive des neurites chez

les neurones de souris MPSIIIB et ainsi participer aux anomalies corticales et aux défauts de plasticité.

Un autre phénotype décrit dans les neurones MPSIIIB est lié à la densité de la protéine synaptophysine qui est diminuée dans des neurones corticaux de souris MPSIIIB âgées de dix jours ou 8 mois (Vitry et al., 2009). Il a été montré que cette diminution était provoquée par l'accumulation des HSO et qu'elle n'était pas le reflet d'une diminution du nombre de neurones dans le cortex ou d'une diminution du nombre de synapses. Elle était le reflet d'une modification des composants des vésicules synaptiques. *In vitro* sur des cultures de neurones corticaux MPSIIIB il a été montré qu'il y avait une augmentation de la dégradation de la synaptophysine par le protéasome (Vitry et al., 2009). La synaptophysine est une protéine très abondante dans la membrane des vésicules synaptiques, et serait impliquée dans l'exocytose, dans la libération de neurotransmetteurs et dans la maturation des vésicules synaptiques. Sa diminution pourrait donc avoir des conséquences sur la plasticité du système nerveux et sur son fonctionnement.

### 2.4.4. Neuroinflammation

Chez les souris MPSIIIB, une neuroinflammation et une activation de la microglie ont été décrites dès l'âge de 1 mois (Ohmi et al., 2003). Au sein du laboratoire, des études ont mis en évidence que l'activation de la microglie pouvait se faire par les HSO présents dans l'environnement extracellulaire. En culture, des cellules microgliales ont été activées par des HSO, mais pas par des chaînes d'HS natives (Ausseil et al., 2008). Les travaux ont montré que cette activation se faisait par les récepteurs TLR4 (Toll-Like Receptor 4) associé à la protéine Myd88. Cette étude a également montré qu'en l'absence de neuroinflammation chez des souris déficientes en NAGLU et inactivées pour les gènes de TLR4 et Myd88, la neuropathologie se développait tout de même (Ausseil et al., 2008). Ces résultats ont montré que l'inflammation pouvait contribuer à induire la neurodégénérescence dans les stades tardifs de la maladie mais que l'initiation de la neurodégénérescence était un évènement qui au départ n'impliquait que les neurones.

### 2.4.5. Autres défauts

Plusieurs autres défauts ont été rapportés chez les souris MPSIIIB. Ces défauts impliqueraient des altérations d'autres processus cellulaires. Par exemple, la protéine SCMAS (sous unité c de l'ATP synthase de la mitochondrie) qui est impliquée dans

la production d'ATP, est accumulée dans les neurones pyramidaux des couches II et III du cortex enthorinal médian dans les cerveaux de souris MPSIIIB (Ryazantsev et al., 2007). Il a été montré que les neurones qui accumulaient SCMAS présentaient les anomalies typiquement observées dans la pathologie et que les zones où elle était détectée contenaient également les métabolites qui s'accumulent habituellement comme des GAGs, du cholestérol ou encore les gangliosides (GM2 et GM3) (Ryazantsev et al., 2007). Cette accumulation de SCMAS pourrait traduire une altération des fonctions de la mitochondrie dans les neurones de souris MPSIIIB. Une autre étude a suggéré que la protéine tau, impliquée dans diverses maladies neurodégénératives, serait hyper-phosphorylée dans le cortex enthorinal médian des souris MPSIIIB (Ohmi et al., 2009).

### 2.4.6. Traitement

Bien que différentes approches aient été testées, il n'existe aujourd'hui aucun traitement pour cette pathologie. En effet, les traitements par greffe de moelle osseuse (Vellodi et al., 1992; Sivakumur and Wraith, 1999), ou l'enzymothérapie (Zhao and Neufeld, 2000) ne permettent pas de corriger les défauts au niveau du système nerveux sans doute du fait que l'enzyme ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique.

La prise en charge des patients consiste aujourd'hui à traiter les complications comme les problèmes respiratoires fréquents chez les patients, les troubles du comportement, les difficultés d'alimentation, ou encore des problèmes d'audition. Par exemple, dans le cas des problèmes respiratoires, les enfants sont traités pour les fréquentes infections par des traitements antibiotiques, par des séances de kinésithérapie respiratoire pour libérer les bronches des sécrétions ou encore dans le cas de difficultés encore plus prononcées par des trachéotomies.

Afin de corriger la pathologie au niveau du système nerveux, le traitement le plus prometteur aujourd'hui est la thérapie génique qui consiste à apporter le gène de la NAGLU directement dans le cerveau des patients.

Les essais de ce type de traitement se sont montrés particulièrement prometteurs chez les animaux modèles. La preuve de concept a été réalisée chez la souris MPSIIIB dans notre laboratoire ainsi que dans d'autres équipes (Fu et al., 2002; Cressant et al., 2004). L'injection d'un vecteur AAV (Adeno-Associated virus) dans un seul point du cerveau a permis d'améliorer le comportement des souris malades. De plus, les cellules transduites ont libéré de l'enzyme qui a été recaptée par des cellules distantes permettant ainsi une correction des cellules dans une vaste zone du cerveau. D'autre part, l'accumulation des gangliosides GM2 et GM3 a été réduite

et enfin l'accumulation de vésicules de surcharge étaient fortement réduites (Cressant et al., 2004). Des études ont été poursuivies chez le chien malade (Ellinwood et al., 2011) et ont montré qu'une immunosuppression était nécessaire, et que dans ce cas, l'injection du vecteur corrigeait la pathologie.

Un essai clinique initié par le laboratoire, basé sur ces recherches, est en cours de préparation. Les phases I et II concernant entre autres l'innocuité du traitement doivent débuter en 2013.

# 3. La Sclérose latérale amyotrophique

## *3.1. Description*

La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est la maladie neurodégénérative des motoneurones la plus fréquente chez l'adulte. Elle a été décrite pour la première fois en 1874 par Jean Martin Charcot, elle est également appelée maladie de Charcot. La SLA est plus connue dans les pays anglo-saxons sous nom de maladie de Lou Gehrig du nom d'un célèbre joueur de baseball atteint par cette maladie en 1939. L'incidence (0,4 à 2/100 000 par an) et la prévalence (4 à 7/100 000) sont relativement uniformes dans les pays occidentaux, mais sont plus élevées dans certaines îles du Pacifique ouest. La SLA débute en général entre 50 et 60 ans. Il existe une légère prédominance masculine (1,5 à 1,8 homme pour une 1 femme). Les causes de la SLA restent aujourd'hui encore mal connues. Dans la plupart des cas, les SLA se déclenchent de façon sporadique (sSLA) mais dans environ 10% des cas les SLA sont d'origine familiale (fSLA). De nombreux facteurs de risques sont incriminés, mais aucun n'a pu être clairement impliqué comme causant la pathologie. Les plus fréquemment cités sont le métier d'agriculteur et/ou l'exposition aux pesticides, les traumatismes physiques importants et/ou le sport de haut niveau, l'exposition aux métaux lourds et le tabac.

La SLA est une maladie neurodégénérative caractérisée par une paralysie musculaire progressive due à la dégénérescence des motoneurones supérieurs et inférieurs (Figure 5). Les motoneurones supérieurs sont situés dans le cortex moteur (gyrus précentral). Ces sont des cellules pyramidales et leur neurotransmetteur est le glutamate. Ils projettent sur les motoneurones inférieurs aux niveaux du tronc cérébral (corticaux bulbaires) et de la moelle épinière (corticaux spinaux). Les principaux motoneurones centraux responsables des mouvements volontaires sont les cellules de Betz. Elles sont situées dans la couche V du cortex moteur. Les axones des motoneurones supérieurs vont former le tractus cortico-spinal croisé ou latéral (ou voie pyramidale croisée) et le tractus cortico-spinal direct ou antérieur (voie pyramidale direct). Leur perte peut produire de la rigidité musculaire (spasticité), des réflexes anormalement vifs. La maladie touche également fréquemment les motoneurones préfrontaux qui sont impliqués dans la planification et dans l'orchestration du travail des autres motoneurones. La perte des neurones préfrontaux peut entrainer des formes particulières avec des atteintes cognitives qui comprennent le plus souvent des dysfonctionnements exécutifs (moteur) mais qui peuvent aussi entrainer des altérations dans les comportements sociaux. Dans les formes où les atteintes cognitives sont les plus importantes, les patients présentent en plus de la SLA des critères de démence fronto-temporale (FTD). Les motoneurones inférieurs se trouvent dans le tronc cérébral (motoneurones bulbaires)

et dans la corne antérieure de la moelle épinière (motoneurones spinaux). Ils connectent directement les muscles et leur neurotransmetteur est l'acétylcholine. Leur dégénérescence conduit à une faiblesse progressive des muscles et à leur atrophie.

Dans les deux tiers des cas, la pathologie débute par une forme spinale qui se traduit par une atteinte des membres. Cette forme est caractérisée par une faiblesse et une fonte musculaire focale, de début distal ou proximal, au niveau des membres inférieurs et supérieurs. Une spasticité se développe dans les membres atrophiés et affaiblis, affectant la dextérité manuelle et la démarche. La maladie débuterait dans ce cas là par une atteinte des motoneurones inférieurs. Pour le tiers restant, la maladie commence par une forme bulbaire. Celle-ci se traduit en général par une dysarthrie et une dysphagie aux solides ou aux liquides. Les symptômes au niveau des membres peuvent apparaître presque simultanément avec les symptômes bulbaires, ou, dans la grande majorité des cas, 1 à 2 ans après. La paralysie est progressive et entraîne une insuffisance respiratoire conduisant généralement au décès dans les 2 à 3 ans (forme bulbaire) ou dans les 3 à 5 ans (forme spinale). Les muscles contrôlant les mouvements oculaires et ceux contrôlant le sphincter urinaire sont épargnés dans la pathologie.

La distinction entre la SLA et d'autres maladies du motoneurone n'est pas toujours aisée et peut entrainer de longs délais de diagnostic. Le fait que les motoneurones supérieurs et inférieurs ne soient pas toujours simultanément touchés dès le début de la pathologie peut faire qu'il ne soit pas possible de distinguer la SLA d'autres maladies. Par exemple, lorsque seuls les motoneurones inférieurs sont atteints, la symptomatologie est réduite à une para-parésie spastique qui peut avoir d'autres étiologies comme une compression tumorale médullaire ou encore certaines scléroses en plaques. Si seuls les motoneurones supérieurs sont touchés, il s'agit d'une sclérose latérale primaire (SLP). L'évolution de la SLP est différente de celle de la SLA et se compte en général en dizaines d'années. L'électromyogramme permet d'authentifier l'atteinte des motoneurones de la corne antérieure de la moelle épinière.

## *3.2. Formes familiales et sporadiques*

La plupart des cas sont des formes sporadiques (SLAs), mais dans environ 10% des cas ce sont des formes familiales (SLAf). De nombreuses mutations dans différents gènes ont pu être identifiées dans ces formes familiales (Tableau 3).

Le premier gène identifié comme responsable de SLA, en étudiant les formes familiales (fSLA), fut le gène codant la superoxyde dismutase 1 (SOD1) en 1993 (Rosen et al., 1993). Les mutations dans ce gène sont impliquées dans environ 20 à

25% des formes familiales et dans 2 à 7% des formes sporadiques (Pasinelli and Brown, 2006). Alors que la protéine SOD1 n'est composée que de 154 acides aminés, au moins 160 mutations touchant les cinq exons du gène ont été identifiées (ALS Online Database). Depuis 1993 des mutations dans d'autres gènes ont été identifiées comme responsables de fSLA (voir Table 3). Les gènes touchés sont impliqués dans des processus cellulaires variés, comme le stress oxydatif (SOD1), le trafic endosomal ou la signalisation cellulaire (Alsin/ALS2, VAPB) les modifications de l'ARN (TARDBP, FUS) ou encore dans le cytosquelette (MAPT). Plus récemment deux nouvelles mutations ont été identifiées, l'une dans le gène UBQLN2 codant l'ubiquiline et provoquant des formes de SLA liées à l'X, la seconde est une répétition d'un héxanucléotide au locus 9p21 dans un intron de C9ORF72 (open reading frame 72). Cette dernière altération génétique serait à l'origine d'environ 50% des fSLA en Finlande (Renton et al., 2011), d'environ 20% des fSLA aux Etats-Unis (DeJesus-Hernandez et al., 2011) et de 20% des sSLA en Finlande (Renton et al., 2011). En France, cette mutation est responsable de 46% des SLA familiales et de 8% des SLA sporadiques (Millecamps et al., 2012). Cette altération entrainerait non seulement des SLA mais également des démences fronto- temporales (FTD).

De plus dans les formes sporadiques, des gènes de susceptibilité ont également été décrits, avec par exemple des expansions poly-alanine dans le gène NIPA1 (Blauw et al., 2012) ou encore dans le gène CYP27A1 (Diekstra et al., 2012).

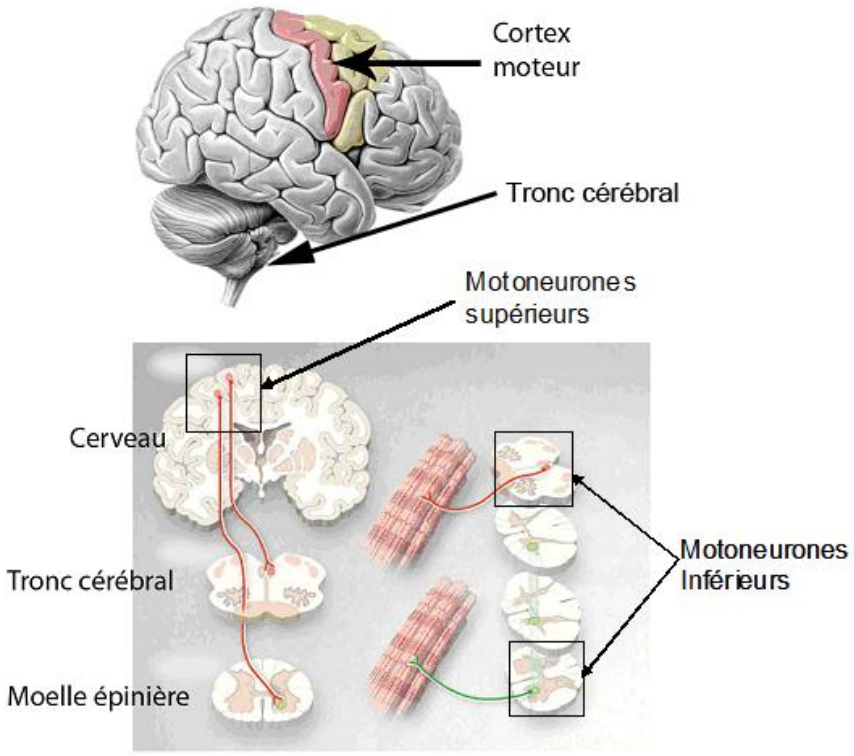



**Figure 5.** Localisation des différents types de motoneurones affectés dans la SLA – *adapté de* (Rowland and Shneider, 2001) *et de [http://www.medecine.unige.ch](http://www.medecine.unige.ch).*

| Sous type génétique | locus | Gène | Age de début et mode de transmission |
|---|---|---|---|
| **Stress oxydatif** | | | |
| ALS1 | 21q22 | Superoxide dismutase 1 (SOD1) | Adulte/AD |
| **Modification de l'ARN** | | | |
| ALS4 | 9q34 | Senataxin (SETX) | Juvenile/AD |
| ALS6 | 16p11.2 | Fused in sarcoma (FUS) | Adulte/AD |
| ALS9 | 14q11.2 | Angiogenin (ANG) | Adulte/AD |
| ALS10 | 1p36.2 | TAR DNA-binding protein (TARDBP) | Adulte/AD |
| **Trafic endosomale et signalisation cellulaire** | | | |
| ALS2 | 2q33 | Alsin (ALS2) | Juvenile/AR |
| ALS11 | 6q21 | Polyphosphoinositide phosphatase (FIG4) | Adulte/AD |
| ALS8 | 20q13.3 | Vesicle-associated membrane protein-associated protein B (VAPB) | Adulte/AD |
| ALS12 | 10p13 | Optineurin (OPTN) | Adulte/AD and AR |
| **Excitotoxicité liée au Glutamate** | | | |
| ND | 12q24 | d-amino acid oxidase (DAO) | Adulte/AD |
| **Ubiquitine/dégradation des protéine** | | | |
| ND | 9p13–p12 | Valosin-containing protein (VCP) | Adulte/AD |
| ALSX | Xp11 | Ubiquilin 2 (UBQLN2) | Adulte/lié à l'X |
| **Cytosquelette** | | | |
| ALS–dementia–PD | 17q21 | Microtubule-associated protein tau (MAPT) | Adulte/AD |
| **Autres gènes** | | | |
| ALS5 | 15q15–q21 | Spatacsin (SPG11) | Juvenile/AR |
| ALS–FTD | 9p13.3 | σ Non-opioid receptor 1 (SIGMAR1) | Adulte/AD<br>Juvenile/AR |
| ALS–FTD | 9q21–q22 | Chromosome 9 open reading frame 72 (C9ORF72) | Adulte/AD |
| **Gènes inconnus** | | | |
| ALS3 | 18q21 | Non connu | Adulte/AD |
| ALS7 | 20ptel–p13 | Non connu | Adulte/AD |

AD : Autosomique dominant ; AR : Autosomique récéssif ; ALS : Scérose latérale amyotrophique ; FTD : Démence fronto-temporale ; PD : Maladie de Parkinson

**Tableau 3.** Liste des formes génétiques de la SLA Adapté de (*Ferraiuolo et al., 2011)*.

## *3.3. Traitements*

Le traitement de patients atteints de SLA repose aujourd'hui uniquement sur l'utilisation du riluzole. Ce médicament ne permet d'augmenter la survie des patients que de quelques mois. L'un de ses modes d'action connu est de limiter l'excito-toxicité en agissant sur le métabolisme du glutamate. Les autres traitements dans le cadre de la SLA visent à pallier les symptômes de la maladie et à assurer un certain confort au patient. Ces traitements comprennent de la kinésithérapie, de l'orthophonie pour les troubles dysarthriques (troubles moteurs affectant la parole) et les troubles de déglutition, la lutte contre les surinfections bronchiques par antibiothérapie, des traitements médicamenteux symptomatiques des crampes et de la spasticité liée au syndrome pyramidal, la ventilation mécanique en cas d'atteinte des muscles respiratoires.

La recherche de nouveaux traitements s'est principalement faite jusqu'à maintenant en utilisant le modèle de souris mutante SOD1. Différentes molécules ont montré des effets thérapeutiques bénéfiques sur ces souris, mais lors des essais cliniques, aucune molécule n'a eu d'effet sur la maladie chez les patients. Cette inefficacité pourrait, en partie, être due au fait que les processus pathologiques chez les patients sont beaucoup plus hétérogènes que chez les modèles.

## *3.4. Physiopathologie de la SLA*

Les études de la physiopathologie de la SLA sont menées depuis de nombreuses années. Ces recherches ont dans un premier temps été menées sur des biopsies post-mortem. Ces analyses anatomopathologiques menées chez les patients, principalement atteints de SLA sporadique, ont révélé de nombreuses altérations morphologiques du SNC. Sur le plan macroscopique, ont été observés une atrophie du gyrus précentral (région du cortex qui comprend le cortex moteur), une sclérose et une dégénérescence des voies cortico-spinales, un amincissement des racines ventrales de la moelle épinière et des nerfs hypoglosses (innervant les muscles de la langue) ainsi qu'une atrophie des muscles squelettiques d'innervation somatique et des muscles d'innervation bulbaire (déglutition, phonation). Des analyses plus fines ont montré qu'au point de vue microscopique, il pouvait y avoir une perte de plus de la moitié des motoneurones de la moelle épinière accompagnée d'une gliose astrocytaire dans la matière grise spinale. Les motoneurones spinaux survivants étaient atrophiés et contenaient des corps d'inclusions pouvant présenter une morphologie compacte ou fibrillaire. Dans le cortex moteur, a été rapportée une déplétion partielle des neurones pyramidaux géants (cellules de Betz) accompagnée d'une gliose astrocytaire variable dans la matière grise et dans la matière blanche

sous-jacente. Dans les aires affectées par le processus pathologique, une activation de la microglie a été détectée (Duckett and Torre, 2001). Ces études ont permis de dresser un tableau de la maladie au stade terminal, mais n'ont pas permis de déterminer les causes de la pathologie.

Les études physiopathologiques sont aujourd'hui menées, d'une part sur des échantillons biologiques de patient, comme du liquide céphalo-rachidien (LCR) ou des cellules telles que les fibroblastes, et d'autre part sur des animaux modèles et des systèmes de cultures cellulaires. L'identification de mutations dans des gènes impliqués dans des processus très différents a permis de déterminer que la perturbation de divers processus cellulaires pouvait être à l'origine de la même maladie. D'autre part, il a été possible de créer des modèles animaux mutants dans les gènes identifiés. Parmi ces modèles, les souris surexprimant la protéine SOD1 mutante est le plus utilisé (Kato, 2007; Swarup and Julien, 2011) et ce modèle est à l'origine d'une grande partie des connaissances des processus pathologiques de la maladie. Les souris qui surexpriment la protéine mutante humaine présentent une pathologie similaire à la maladie humaine. Plusieurs modèles de souris SOD1 ont été générés à partir de différentes mutations. Le premier et le plus utilisé est le modèle surexprimant la forme mutante de SOD1 G93A (Gurney et al., 1994). Une douzaine de modèles surexprimant d'autres formes mutantes de SOD1 ont depuis été générés (A4V, G85R, G37R, A4T, H43R, H46R, H48Q, D90A …). Pour toutes ces mutations des modèles murins présentant une pathologie ont pu être obtenu. Néanmoins, des différences dans l'âge de début de la maladie et dans sa progression existent entre ces différents modèles. Différentes revues décrivent très bien ces modèles (Kato, 2007; Swarup and Julien, 2011). Enfin, il existe également des modèles autres que les souris utilisées pour modéliser la SLA, comme les rats surexprimant la forme mutante G93A de SOD1 (Nicaise et al., 2009).

Cependant, les mutations dans le gène SOD1 ne représentent que 2% des patients atteints de SLA. Les mécanismes pathologiques identifiés grâce à ce modèle ne sont donc pas nécessairement représentatifs de la majorité des cas. D'autres modèles animaux sont donc en cours de génération ou ont été générés. C'est le cas par exemple de différents modèles mutants dans la protéine TDP-43 mais ces modèles ne reproduisent pas la maladie de façon satisfaisante (Swarup and Julien, 2011).

En parallèle de ces modèles animaux, divers modèles cellulaires sont également utilisés pour étudier la SLA, comme des lignées motoneuronales (cellules NSC-34) surexprimant la protéine mutante SOD1 (Gomes et al., 2010).

Malgré les études menées chez les patients et dans les modèles murins et cellulaires, les voies moléculaires conduisant à la mort des motoneurones sont encore mal connues. Il semble que, comme dans d'autres maladies neurodégénératives, ce soit un ensemble de mécanismes physiopathologiques qui est à l'origine de la maladie et que cet ensemble inclue, de manière non exclusive ni

exhaustive, les facteurs génétiques, l'agrégation de protéines, le stress oxydatif, l'excitotoxicité, des dysfonctionnements mitochondriaux, des perturbations du transport axonal, des défauts de l'appareil de Golgi ou encore l'implication des cellules gliales.

### 3.4.1. Agrégats protéiques

- Les agrégats dans les tissus post-mortem humains.

Les inclusions cytoplasmiques dans les motoneurones et dans les cellules gliales sont l'une des caractéristiques de la physiopathologie de la SLA. Les inclusions présentes dans la SLA peuvent être séparées en trois grands groupes qui sont : les inclusions ubiquitinylées, les corps de Bunina et les inclusions hyalines (Xiao et al., 2006).

- Les inclusions ubiquitinylées

Les inclusions ubiquitinylées sont retrouvées dans la majorité des cas de SLA sporadiques et familiales. Elles sont observées dans le soma des motoneurones sur des biospies post-mortem et sont révélées avec des anticorps dirigés contre l'ubiquitine. Elles existent sous deux formes : les inclusions filamenteuses (skein-like inclusions) (Figure 6A) et des inclusions compactes de forme sphérique (Figure 6B). Parmi les inclusions compactes, certaines ressemblent aux corps de Lewy observés dans la maladie de Parkinson mais elles ne contiennent pas l'α-synucléine.

Les inclusions ubiquitinylées peuvent parfois contenir des filaments intermédiaires comme les neurofilaments ou la périphérine (Xiao et al., 2006).

Chez les patients présentant une mutation dans le gène SOD1, les inclusions ubiquitinylées contiennent la protéine SOD1 mutée et des anticorps dirigés contre les formes mal repliées de cette protéine marquent fortement ces inclusions. La protéine SOD1 mal repliée peut également être détectée dans le cytoplasme des motoneurones de patients ayant des formes sporadiques.

La protéine TDP-43 est également observée dans des inclusions ubiquitinylées (Neumann et al., 2006) chez les patients qui présentent une mutation dans le gène de TDP43 (TADBP) mais aussi chez des patients atteints de sSLA. De manière similaire, des inclusions ubiquitinylées contenant la protéine mutante FUS (fused in sarcoma) ont été observées chez des patients présentant une fSLA liée à FUS (Mackenzie et al., 2010).

Il est intéressant de remarquer que les inclusions décrites chez les patients présentant une fSLA diffèrent en fonction du gène muté. En effet, les inclusions

contenant SOD1 ne sont pas retrouvées chez les patients mutants dans le gène codant pour TDP43, et inversement, les inclusions contenant TDP43 ne sont pas retrouvées chez les patients mutants dans le gène SOD1, suggérant que les mécanismes physiopathologiques entrainés par ces mutations sont différents. Il est également intéressant de constater qu'il semble que les inclusions TDP43 soient retrouvées chez l'ensemble des patients non mutant dans le gène SOD1.

- Les corps de Bunina

Les corps de Bunina (Figure 6C) sont de petites inclusions éosinophiles qui sont observées dans les motoneurones de patients dans plus de 85% des cas. Elles ont été décrites pour la première fois en 1962 et sont présentent dans le corps cellulaire des neurones et dans les dendrites. Elles sont fréquemment observées chez les malades atteints de sSLA et plus souvent chez ceux dont la pathologie évolue rapidement. Chez les patients présentant une démence associée à la SLA, les corps de Bunina ont tendance à être plus gros. Ils sont en général présents dans les motoneurones spinaux et absents des cellules de Betz. Leur origine reste incertaine, mais ils pourraient provenir des lysosomes. Ils contiennent de la cystatine C et de la transferrine. Les protéines accumulées fréquemment dans les inclusions lors des maladies neurodégénératives (comme tau, l'α-synucléine ou encore TDP43) ne sont pas retrouvées dans les corps de Bunina (Okamoto et al., 2008). Ils constitueraient un marqueur spécifique de la maladie (Xiao et al., 2006).

- Les inclusions hyalines

Les inclusions hyalines (Figure 6D) sont des inclusions argyrophiles (visibles par un traitement au sel d'argent) qui présentent des morphologies variables. Elles sont observées au sein du soma et des dendrites proximaux. Elles contiennent des neurofilaments (chaines lourdes et moyennes). Ces inclusions ne sont pas spécifiques de la SLA et seraient plutôt rares.

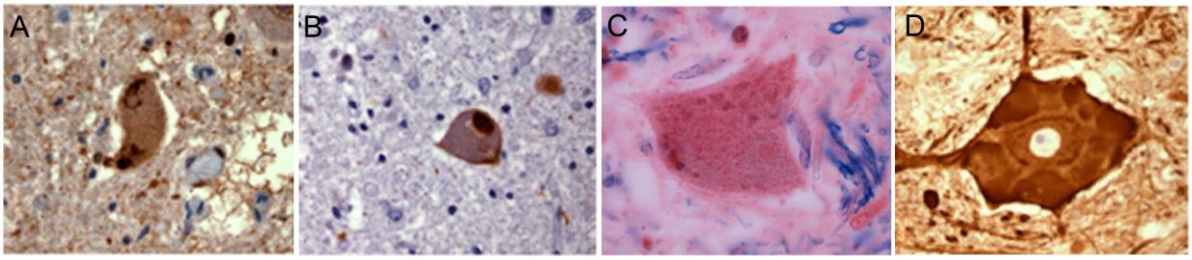



**Figure 6.** Inclusions cytoplasmiques dans les motoneurones de moelle épinière post-mortem de patients atteints de SLA sporadique ou familiale. **A**. Immunomarquage de l'ubiquitine dans les inclusions filamenteuses. **B**. Immunomarquage de la pérpiphérine dans les inclusions compactes. **C**. marquage des corps de Bunina à l'hématoxyline. **D**. Immunomarquage des neurofilaments dans des inclusions hyalines. Adapté de (Xiao et al., 2006).

- Les agrégats dans les tissus post-mortem humains.

Des agrégats protéiques ont également été observés dans les cellules chez les modèles murins de SLA.

Dans des modèles de souris surexprimant des formes mutantes de la protéine SOD1 (G93A, G85R et G37R), des inclusions ubiquitinilées contenant cette protéine ont été observées dans des astrocytes et des neurones sur des coupes de moelle au stade terminal de la pathologie (Bruijn et al., 1998). Le même type d'observation a été effectué sur des coupes de moelle épinière de souris exprimant une forme mutante de TDP43 (Xu et al., 2011).

La surexpression des formes mutantes G37R, G85R ou G93C de SOD1 a entraîné la formation d'agrégats contenant principalement la protéine SOD1 mutante dans une lignée cellulaire humaine (HEK293) (Witan et al., 2009). La surexpression de la protéine TDP43 mutante dans des cellules 5H-SYHY a entraîné la formation d'inclusions contenant la protéine TDP43 et positives pour l'ubiquitine (Nonaka et al., 2009)

La formation et le rôle joués par ces inclusions dans la physiopathologie de la maladie restent inconnus. Deux hypothèses sont principalement envisagées quant à leurs rôles. Dans la première, les agrégats protéiques pourraient entrainer une toxicité cellulaire et donc jouer un rôle dans le processus pathologique. L'hypothèse inverse est que les agrégats seraient des sous-produits innocents du processus de neurodégénération voire même que leur formation pourrait être le résultat d'un processus de défense de la cellule visant à réduire la concentration intracellulaire des protéines toxiques.

### 3.4.2. Stress oxydatif

Le stress oxydatif est une agression des constituants de la cellule suite à une production non contrôlée et excessive d'espèces réactives oxygénées (ROS, Reactive Oxygen Species). La production de ROS est normale pour tous les organismes vivant en aérobie et ne constitue pas, en soi, une situation de stress oxydant. En effet, la cellule dispose d'un système complexe de détoxification contre les ROS comprenant des enzymes (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase…) et des petites molécules (vitamine E, vitamine C…). Une production excessive ou un défaut des mécanismes protecteurs conduit au stress oxydatif au cours duquel les protéines cellulaires, les lipides, les ARN et même l'ADN peuvent être altérés par réaction oxydative.

Différentes études ont révélé une augmentation du taux de certains marqueurs du stress oxydatif dans des échantillons biologiques de patients (LCR, sérum, urine). Par exemple, une augmentation du taux de 4-hydroxynonénal (HNE) dans le LCR de patients atteints de sSLA a été rapportée (Smith et al., 1998). Ce métabolite est produit par la peroxydation lipidique et peut créer des altérations dans la membrane telles que des modifications de sa fluidité mais aussi l'inactivation de récepteurs ou d'enzymes. Il faut également noter que le HNE est un composé stable qui peut diffuser hors de la cellule où il est produit et peut ainsi représenter un messager cytotoxique (Michel et al., 2008).

D'autre part, l'analyse des tissus prélevés post-mortem et provenant de patients atteints de sSLA sporadique ou de SLA liée à des mutations du gène SOD1 a révélé d'importants dommages causés aux protéines, aux lipides, à l'ADN et également aux ARN messagers (ARNm) par des radicaux libres. L'implication du stress oxydatif est soutenue par le fait que des fibroblastes de patients en culture sont plus sensibles au stress oxydatif que des fibroblastes sains (Shaw et al., 1995; Shibata et al., 2001).

Comme chez les patients, des dommages liés au stress oxydatif ont été observés chez les souris qui surexpriment la forme mutante G93A de la protéine SOD1. Une oxydation des ARNm a été principalement retrouvée dans les motoneurones et dans les oligodendrocytes au décours des étapes pré-symptomatiques de la maladie. Elle a été associée à une diminution de l'expression des protéines encodées par ces ARNm. De nombreux ARNm sont sensibles au stress oxydatif. Cependant, chez la souris mutante SOD1, il a pu être observé que certains ARNm y étaient plus sensibles, comme ceux codant des protéines impliquées dans la chaîne de transfert des électrons de la mitochondrie, ou codant des protéines impliquées dans l'élaboration du cytosquelette ou encore l'ARNm de SOD1 (Chang et al., 2008).

Ces dommages oxydatifs ont également été retrouvés dans les modèles cellulaires surexprimant la protéine mutante SOD1. De manière intéressante, la protéine SOD1 elle-même semble être particulièrement susceptible aux modifications post-traductionnelles liées au stress oxydatif (Liu et al., 1999). Des dommages oxydatifs ont également été décrits sur de nombreux lipides et autres protéines chez ces souris SOD1 G93A (Liu et al., 1999). Dans des modèles cellulaires des mutations de TDP43, la présence de la protéine mutante a induit un stress oxydatif dans la lignée cellulaire motoneuronale NSC34 (Duan et al., 2010).

Le stress oxydatif semble donc jouer un rôle important dans le processus pathologique de la SLA. Des essais de traitement chez la souris mutante SOD1 avec des molécules anti-oxydantes ont amélioré le phénotype de ces dernières. Néanmoins, des essais similaires chez les patients n'ont montré aucun bénéfice.

### 3.4.3. Excitotoxicité liée au glutamate

Le glutamate est un acide aminé excitateur du SNC. Il agit par l'intermédiaire de ses récepteurs dont il existe deux grands types : les récepteurs ionotropiques et les récepteurs métabotropiques directement couplés aux protéines G. Il existe trois types de récepteurs ionotropiques au glutamate : les récepteurs NMDA, AMPA et kaïnate (Niciu et al., 2012). Ces récepteurs sont perméables aux cations principalement au sodium ($Na^+$) et au potassium ($K^+$) et pour certains au calcium ($Ca^{2+}$). Les deux récepteurs principalement impliqués dans les phénomènes d'excitotoxicité liée au glutamate sont les récepteurs NMDA et AMPA.

Les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate) sont composés d'une combinaison de sous-unité NR1 et de sous-unité NR2 et/ou NR3. Au potentiel de repos des neurones, la fixation du glutamate au récepteur NMDA ne suffit pas pour permettre l'entrée d'ions dans le canal. De plus au repos, le pore du récepteur est bloqué par un ion magnésium (Mg2+). Une dépolarisation de la membrane est nécessaire pour permettre la levée du blocage du récepteur par le Mg2+. Ces récepteurs sont le principal canal ionique assurant l'entrée du calcium. Les récepteurs AMPA sont les acteurs majeurs de la transmission synaptique rapide. Quatre gènes codent les sous unités du récepteur AMPA : GluR1, GluR2, GluR3 et GluR4. L'ARNm codant la sous-unité GluR2 subit une modification post-transcriptionnelle particulière. Elle est éditée au niveau d'un codon CAG qui devient CGG entraînant le remplacement d'une glutamine par une arginine. Cette modification rend les récepteurs composés de cette sous-unité imperméables au calcium.

En temps normal, le glutamate libéré dans la fente synaptique est éliminé afin d'éviter une sur-activation des récepteurs. Des transporteurs spécialisés (*excitatory amino acid transporter*, EAAT) assurent la recapture du glutamate. Ces transporteurs sont présents à la membrane plasmique des astrocytes et à la membrane post-synaptique. Il existe quatre types de transporteurs EAAT : les transporteurs EAAT1 (GLAST) et EAAT2 (GLT-1) sont exprimés par les astrocytes, les transporteurs EAAT3 et EAAT4 sont exprimés à la membrane des neurones post-synaptiques.

L'activation des récepteurs au glutamate entraine une dépolarisation des neurones provoquée par l'entrée de cations, dont le calcium. De plus, l'activation des récepteurs métabotropiques au glutamate peut entraîner la libération de calcium des réserves intracellulaires. L'élévation de la concentration intracellulaire de calcium joue un rôle important de second messager dans plusieurs voies de signalisation. Cependant, une élévation trop importante de calcium peut entrainer la mort cellulaire en perturbant l'homéostasie calcique et en entraînant l'activation secondaire d'enzymes dont des phospholipases, des endonucléases et des protéases telles que la calpaïne. La concentration calcique est contrôlée par plusieurs mécanismes. Le premier permet l'exportation du calcium à travers la membrane plasmique. Le second

mécanisme permet de stocker le calcium dans des sites de réserves intracellulaires tels que le réticulum endoplasmique. Enfin, des protéines (calbindine, calmoduline) ainsi que des phospholipides peuvent jouer le rôle de tampon en se liant au calcium intracellulaire.

L'excitotoxicité provoquée par le glutamate est causée par une entrée massive de calcium dans le neurone post-synaptique. Cette entrée massive pourrait être due à une augmentation du niveau de glutamate dans la fente synaptique entraînant une stimulation excessive des récepteurs. Elle pourrait également être provoquée par une augmentation de la sensibilité au glutamate du neurone post-synaptique provoquée soit par une altération de l'homéostasie énergétique perturbant l'élimination du calcium, soit par une altération de l'expression des récepteurs au glutamate. Les motoneurones sont particulièrement vulnérables à l'excitotoxicité induite par les récepteurs AMPA. En effet, ils expriment peu la sous-unité GluR2 et leurs récepteurs AMPA sont donc principalement perméables au $Ca^{2+}$. De plus ils expriment peu de protéines de tamponnage du calcium (Quinlan, 2011).

Des analyses de LCR de patients atteints de sSLA ont permis de déterminer que le taux de glutamate est augmenté chez les malades. Cette élévation est attribuée à une perte, par les cellules gliales, du transporteur au glutamate EAAT2 (Rothstein et al., 1995). Ces altérations pourraient être le reflet de lésions neuronales provoquées par un mécanisme d'excitotoxicité. De plus, des études électrophysiologiques chez les patients ont montré une hyperexcitabilité du système moteur dans les stades présymptomatiques ou précoces de la pathologie, en corrélation avec une sur-activation des motoneurones par le glutamate.

Enfin, un élément supplémentaire indiquant l'implication de l'excitotoxicité dans la maladie est que la seule stratégie thérapeutique qui ralentisse l'évolution de la pathologie utilise une molécule inhibant le relargage du glutamate. Le Riluzole est en effet le seul médicament qui permet d'améliorer légèrement l'espérance de vie des patients. Néanmoins, d'autres agents anti-glutamate n'ont pas eu d'effet lors des essais cliniques.

Les études menées sur les modèles de souris mutantes G93A et G37R dans le gène SOD1 ont démontré le rôle pathogénique de l'excitotoxicité incluant des propriétés électrophysiologiques altérées et un accroissement de la sensibilité des motoneurones à l'excitotoxicité, l'altération de l'expression de la sous unité GluR2 du récepteur AMPA, la réduction de l'expression et de l'activité de EAAT2, l'augmentation des efflux de glutamate depuis les terminaisons nerveuses dans la moelle épinière, une réduction dans le ratio synaptique d'inhibition et d'activation global dans les motoneurones et la perte de l'expression de GluR2 par les cellules avoisinantes des motoneurones (Van Damme et al., 2005).

### 3.4.4. Défauts mitochondriaux

La première indication de l'implication des mitochondries dans la SLA a été le résultat d'analyses ultrastructurales chez des patients qui montraient des agrégats de mitochondries dans les muscles et dans la moelle épinière (Sasaki and Iwata, 1996). Des agrégats présynaptiques de mitochondries ont également été observés dans les cellules de Betz (Sasaki and Iwata, 1999). De plus des modifications dans l'activité des différents complexes de la chaîne de transport des électrons dans des tissus issus de patients ont été documentées (Browne et al., 2006). D'autre part, des altérations de l'ADN mitochondrial (ADNmt) ont été observées chez des patients atteints de sSLA avec notamment des délétions ou une diminution du taux d'ADNmt non liée à une diminution du nombre de mitochondries (Menzies et al., 2002).

Des altérations au niveau des mitochondries ont également été observées chez les souris surexprimant la forme mutante G93A de SOD1. En effet, des vacuoles formées par des mitochondries en dégénérescence ont été observées dans les axones et dans les dendrites des motoneurones dès le stade présymtomatique. D'autre part, des défauts de la chaîne respiratoire de la mitochondrie ont été rapportés. Ils étaient associés à des dommages oxydatifs des protéines mitochondriales et des lipides (Shi et al., 2010).

D'autre part il a été rapporté que la capacité de la mitochondrie à maintenir l'homéostasie calcique était perturbée dans des mitochondries purifiées à partir de cerveau de souris surexprimant SOD1 G93A (Damiano et al., 2006). Cette altération pourrait augmenter la susceptibilité des motoneurones aux perturbations de l'homéostasie calcique liées à l'excitotoxicité induite par le glutamate. De plus, le stress du RE, supposé interrompre les échanges de calcium entre le RE et la mitochondrie a été observé dans des modèles de SLA.

Enfin, il a été montré que la morphologie des mitochondries était altérée dans des motoneurones primaires de souris SOD1 mutantes et dans des cellules NSC-34 (lignée de cellules motoneuronales) (Menzies et al., 2002) surexprimant la protéine SOD1 mutante.

### 3.4.5. Anomalies du transport axonal

Des résultats obtenus à la fois à partir de biopsies de patients mais aussi de modèles murins et cellulaires soutiennent le concept que la SLA serait une axonopathie distale (dying-back axonopathy). Les défauts de transport axonal sont susceptibles de contribuer au processus d'axonopathie distale en particulier les défauts dans le transport antérograde et les défauts quantitatifs et fonctionnels des mitochondries qui

combinés provoquent une déplétion en énergie dans la partie distale de l'axone (pour une revue, voir Dadon-Nachum et al., 2011).

Des atteintes du transport axonal ont été mises en évidence dans de nombreuses maladies neurodégénératives (Perlson et al., 2010), y compris dans la SLA. La pathologie axonale est un élément clé de la SLA, et pourrait donc avoir un rôle crucial dans la physiopathologie de la maladie. Les motoneurones sont des cellules hautement polarisées avec de très longs axones, et le transport axonal est requis pour la livraison des composants essentiels (comme les ARN, les protéines et les organites) au compartiment axonal qui comprend les structures synaptiques de la jonction neuromusculaire. Les principales machineries utilisées pour le transport axonal sont la kinésine associée aux microtubules qui gère les transports vers la jonction neuromusculaire (antérograde) et la dynéine un moteur moléculaire cytoplasmique qui assure le transport vers le corps cellulaire (rétrograde).

Chez les souris mutantes G93A SOD1, des déficiences de transport ont été observées lors des stades précoces de la maladie (De Vos et al., 2007), soutenant l'hypothèse selon laquelle ces défauts du transport axonal et plus globalement les perturbations du compartiment axonal joueraient un rôle physiopathologique important. Il a été montré que les souris mutantes SOD1 présentaient un transport axonal perturbé aussi bien antérograde que rétrograde. Les défauts pourraient être liés aux éléments transportés. Par exemple seul le trafic antérograde des mitochondries est perturbé chez ces souris (De Vos et al., 2007).

Les mécanismes moléculaires sous-jacents à ces défauts de transport axonal chez les souris mutantes SOD1 restent inconnus mais sont vraisemblablement multiples. Des altérations mitochondriales menant à une baisse du transport axonal des organelles pourraient entraîner un défaut du transport d'autres constituants cellulaires par un manque en énergie nécessaire au transport.

Le TNF (tumor necrosis factor) qui est surproduit chez les souris SOD1 a été montré comme perturbant les fonctions de la kinésine en impliquant des mécanismes liés à la protéine kinase p38 MAPK p38 (mitogen activated protein kinase) dont l'activation excessive à été décrite dans la SLA (De Vos et al., 2008).

D'autre part, le fait que des mutations dans le gène codant pour la dynactine, qui est une protéine impliquée dans le transport axonal, dans le gène VAPB (Vesicule Associated membrane protein-associated Protein B) codant pour une protéine qui est impliquée dans le transport des vésicules et dans le gène ALS2 codant pour l'alsine qui est impliquée dans la dynamique des endosomes, soient responsables de formes génétiques de SLA soutient l'implication de défauts du transport axonal dans la pathologie.

### 3.4.6. Anomalies du transport endosomal

L'endocytose est un procédé par lequel les molécules extra-cellulaires sont capturées à la membrane cellulaire puis internalisées. Les molécules sont ensuite délivrées à leur destination par un système complexe d'organites appelé réseau endosomal. Des perturbations de ce système d'adressage sont impliquées dans différentes formes de SLA.

Des mutations géniques trouvées dans des formes rares de fSLA impliquent des protéines impliquées dans le trafic des endosomes. Il s'agit de mutations dans le gène ALS2 codant la protéine Alsine qui est impliquée dans le trafic et la fusion des endosomes (Chandran et al., 2007), dans le gènes VAPB, qui code une protéine impliquée dans le trafic vésiculaire, dans le gène OPTN qui code l'optineurine qui est également impliquée dans le trafic vésiculaire, dans le gène d'ESCRTIII (Endosomal System Complex Required for Transport) qui est un composant du complexe de sortie de l'endosome requis pour le transport, dans le gène CHMP2B (CHarged Multivesicular body Protein 2B) qui participerait au complexe d'ESCRTIII (Cox et al., 2010), dans le gène VCP (Valosine Containing Protein) (Johnson et al., 2010) qui forme un complexe avec la clathrine, et dans le gène FIG4 qui code pour une phosphatase phosphoinositide qui contrôle l'abondance cellulaire d'un lipide impliqué dans le trafic rétrograde des vésicules endosomales vers le Golgi (Chow et al., 2009). La plupart de ces gènes sont encore assez peu étudiés, même si quelques modèles ont été développés à partir de ces mutations, (ALS2, VAPB). Un modèle murin surexprimant la protéine VAPB mutante P56S a été décrit mais les souris ne déclaraient pas de maladie du motoneurone, même si elles présentaient des inclusions contenant de l'ubiquitine et la protéine TDP43 (Tudor et al., 2010).

En conclusion, du fait de leurs longs axones qui nécessitent un fort renouvellement des composants membranaires, les motoneurones pourraient donc être particulièrement sensibles à des perturbations du réseau endosomal.

#### 3.4.6.1. Défaut de l'appareil de Golgi

Il a été observé sur des biopsies post-mortem de patients sSLA que l'appareil de Golgi était fréquemment fragmenté dans les motoneurones à un stade final de la maladie (Gonatas et al., 1992). Les neurones qui avaient un appareil de Golgi fragmenté présentaient un nucléole intact et localisé normalement dans le noyau, et leurs axones et leurs dendrites étaient normaux, suggérant que les cellules n'étaient pas en apoptose. Cette fragmentation a également été retrouvée chez les souris pré-symptomatiques surexprimant la protéine G93A SOD1 avec une accentuation au

cours de l'évolution de la pathologie (Nassif et al., 2010). Les éléments de l'appareil de Golgi qui étaient fragmentés formaient des citernes plus petites, mais ne présentaient pas les caractéristiques d'un appareil de Golgi de cellules en apoptose. Enfin, cette fragmentation a été associée à des dysfonctionnement de la voie de sécrétion (Gonatas et al., 2006).

#### 3.4.6.2. Rôles des cellules environnantes

Différentes études ont montré un rôle important des cellules environnantes des motoneurones dans la pathologie.

L'expression chez la souris de la forme mutante de SOD1 (G37R ou G93A) de manière sélective dans les motoneurones (Pramatarova et al., 2001; Lino et al., 2002) ou dans les astrocytes (forme G86R) n'a pas provoqué de pathologie (Gong et al., 2000).

Par contre l'analyse de souris chimériques composées de cellules normales et de cellules exprimant la protéine SOD1 mutante a montré que la mort des motoneurones n'était pas « cellule autonome ». En effet, il a été montré que les cellules non motoneuronales normales étaient capables de limiter ou d'éliminer la toxicité des cellules mutantes (Clement et al., 2003).

D'autre part, la délétion spécifique du transgène pathogénique de SOD1 dans différents types cellulaires chez des souris a montré que la suppression du transgène dans les motoneurones retardait le début de la maladie et que la suppression dans les microglies augmentait la durée de vie des animaux (Boillée et al., 2006b). L'implication des cellules gliales ou des astrocytes a également été mise en évidence avec des modèles cellulaires qui ont montré un effet toxique de ces cellules sur des motooneurones lorsqu'elles exprimaient la forme mutante de SOD1 (Giorgio et al., 2007; Di Giorgio et al., 2008; Marchetto et al., 2008).

Plus récemment, ces résultats ont été nuancés par une étude qui a montré que l'expression de la forme mutante G93A de SOD1 spécifiquement dans les neurones de souris était suffisante pour reproduire une pathologie du type de la SLA (Jaarsma et al., 2008).

L'ensemble de ces résultats a donc montré que l'environnement des motoneurones était vraisemblablement impliqué dans les processus pathologiques de la SLA.

### 3.4.7. Conclusion

Les travaux réalisés chez l'homme, dans les modèles murins mutant de SOD1, et dans les systèmes cellulaires, ont suggéré que de très nombreux processus cellulaires étaient altérés dans la SLA. En particulier, les études dans les modèles mutants de SOD1 ont permis de mieux comprendre les processus pathologiques déclenchés par les mutations du gène SOD1. Néanmoins, ces défauts peuvent différer en fonction du gène muté dans le cas des formes familiales. L'étude d'un seul modèle, comme celui des souris surexprimant une protéine SOD1 mutante, parfois jusqu'à 40 fois son niveau normal, ne fournira sans doute pas des réponses valables pour toutes les formes de SLA. Mais aujourd'hui ce modèle est le seul modèle reproduisant la pathologie humaine. En effet les autres modèles murins générés à ce jour ne reproduisent pas la pathologie observée chez l'homme (Swarup and Julien, 2011). Il apparait donc nécessaire d'étudier les conséquences physiopathologiques des différentes mutations dans les différents gènes afin de comprendre les diverses processus aboutissant à la mort des motoneurones.

De nouveaux modèles complémentaires de ceux déjà existants sont donc nécessaires pour l'étude des processus pathologiques de la SLA. Dans ce contexte, la génération d'iPS à partir de fibroblastes de patients atteints de SLA pourrait permettre de générer les neurones et motoneurones affectés dans la pathologie. Cela permettrait de disposer pour la première fois des cellules humaines affectées.

# 4. La forme ALS2/Alsine

## *4.1. Description*

Les mutations dans le gène ALS2 codant l'alsine sont responsables de plusieurs formes de maladies du motoneurone. Plus de vingt mutations récessives différentes ont pu être identifiées dans tous les domaines de la protéine. Les pathologies provoquées par ces mutations sont : une forme de SLA juvénile (JSLA) (Hadano et al., 2001; Yang et al., 2001; Kress et al., 2005), des scléroses latérales primaires juvéniles (JSLP) (Hadano et al., 2001; Yang et al., 2001; Panzeri et al., 2006) ou encore des paraplégies spastiques familiales ascendantes à début précoce (IAHSP : Infantile-onset Ascending Hereditary Spastic Paralysis) (Eymard-Pierre et al., 2002, 2006; Devon et al., 2003; Gros-Louis et al., 2003).

La forme de SLA juvénile (JSLA) se caractérise par une apparition des premiers signes durant l'enfance, vers 6 ans et demi en moyenne, mais pouvant s'échelonner

de 2 à 23 ans. La pathologie se traduit par une spasticité des muscles du visage avec un rire incontrôlé, une dysarthrie, une démarche spastique, accompagnée d'une atrophie variable des muscles mais sans fasciculations musculaires, et par des troubles urinaires et sensoriels. Certains patients sont totalement dépendants avant l'âge de 20 ans. La pathologie a néanmoins, en général, une progression lente et l'espérance de vie peut être normale. Au niveau cellulaire, la JSLA se caractérise par une dégénérescence progressive des motoneurones supérieurs et inférieurs (Hadano et al., 2001; Yang et al., 2001; Kress et al., 2005; Shirakawa et al., 2009).

La JSLP débute dès l'âge de 2 ans. Elle se caractérise par une faiblesse et une rigidité progressive des muscles des jambes, des bras et de la face. Les symptômes progressent pendant une période de 15 à 20 ans. Ils incluent maladresse, spasmes et faiblesse musculaire, rigidité des jambes, et problèmes d'équilibre. En progressant ils comprennent, une rigidité des bras et des mains, des troubles de l'élocution, une incontinence salivaire, une difficulté à avaler et une incapacité à marcher. Au niveau cellulaire, dans le cas de la JSLP, seuls les motoneurones supérieurs dégénèrent progressivement provoquant une dégénérescence des voie pyramidales cortico-spinale et cortico-bulbaire (Lesca et al., 2003).

La troisième pathologie provoquée par des mutations dans le gène ALS2 est l'IAHSP. Elle débute plus tôt que la JSLP. Son évolution est ascendante, à progression lente. Elle se caractérise par une sévère atteinte du tractus cortico-spinal, provoquée par la dégénérescence progressive des motoneurones supérieurs. Au niveau clinique, l'évolution est lente et progressive avec une paralysie spastique ascendante. La spasticité débute généralement par les membres inférieurs s'étendant aux membres supérieurs et aux muscles d'innervation cortico-bulbaire. Les premiers symptômes apparaissent durant les deux premières années et la plupart des patients sont en fauteuil roulant à partir de 10 ans. La maladie progresse vers une tétraplégie (paralysie complète des membres supérieurs et inférieurs), une anarthrie (perte partielle ou totale de l'articulation du langage), une dysphagie (difficulté à avaler) le tout accompagné par des mouvements lents des yeux à partir de la deuxième décennie. Malgré la nature progressive de la maladie, l'espérance de vie est assez longue (Eymard-Pierre et al., 2002, 2006; Devon et al., 2003; Gros-Louis et al., 2003; Lesca et al., 2003).

## *4.2. Le gène ALS2*

Le gène humain ALS2 code une protéine appelée alsine ou ALS2. Ce gène comporte 34 exons et 33 introns. Le transcrit du gène est formé de 6394 nucléotides et ne contient qu'une seule phase ouverte de lecture (ORF) de 4974 nucléotides codant l'alsine de 184 kDa constituée de 1675 acides aminés. Il existe un second

transcrit composé de 2651 nucléotides avec une seule ORF de 1191 nucléotides codant pour la forme courte de l'alsine (ALS2-s). Ce transcrit court est produit par épissage alternatif au niveau du site 5' donneur d'épissage après l'exon 4 qui résulte dans l'apparition d'un codon stop après 25 amino-acides dans l'intron 4. Ces deux transcrits sont exprimés de manière ubiquitaire, mais avec un niveau d'expression fort dans le système nerveux central (SNC) et en particulier dans le cervelet (Hadano et al., 2001; Yang et al., 2001; Yamanaka et al., 2003).

L'orthologue murin ALS2 est composé de 6349 nucléotides avec une seule ORF de 4956 nucléotides codant une protéine de 183 kDa formée de 1651 acides aminés. L'ORF entière est bien conservée entre l'homme et la souris avec 87% d'identité. Les protéines humaine et murine présentent une homologie de plus de 90% (Hadano et al., 2007).

Comme chez l'homme, il existe chez la souris un transcrit court produit par épissage alternatif, mais le site 5' donneur d'épissage se situe après l'exon 13. Il en résulte un codon stop prématuré après 74 amino-acides dans l'intron 13. Cette différence fait que l'alsine courte chez la souris a une structure différente de l'alsine courte humaine (Hadano et al., 2006).

## *4.3. La protéine Alsine (ALS2)*

Différents domaines et motifs particuliers ont pu être déduits par analyse de la séquence protéique de l'alsine. Elle serait composée de trois domaines facteurs d'échange de guanosine (GEF) (Hadano et al., 2001; Yang et al., 2001).

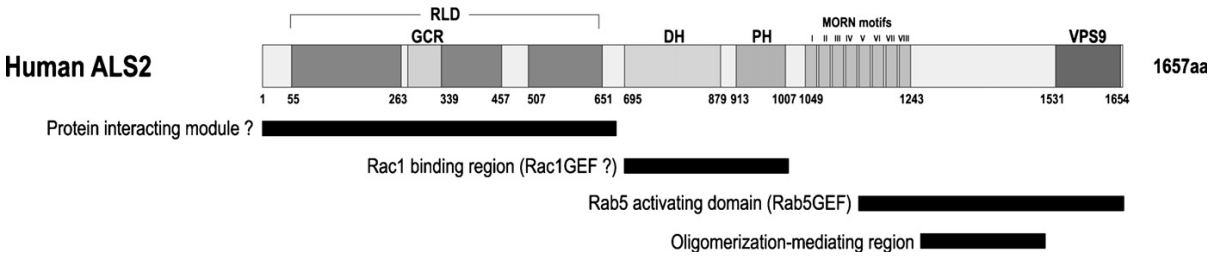



**Figure 7.** Représentation schématique de la forme longue de l'alsine avec ses différents domaines et motifs *(Hadano et al., 2007*).

En N-terminal de la protéine, on trouve un domaine hautement similaire aux protéines RCC1 (Regulator of Chromosome Condensation) et RPGR (Retinis Pigmentosa GTPase Regulator). Ce domaine est appelé domaine RCC1-like (RLD).

La protéine RCC1 est un GEF pour la « nuclear GTP binding protein Ran » (Ras-related nuclear) (Dasso, 2001). La forme courte de l'alsine humaine ne contient qu'une partie de ce domaine RLD (Hadano et al., 2001) alors que la forme courte murine contient le domaine RLD entier (Cai et al., 2008).

Dans la partie centrale de l'alsine, on trouve une organisation en tandem de type « Diffuse B cell lymphoma (Dbl) homology » (DH) et de « pleckstrin homology domains» (PH). Ce domaine PH/DH est la signature des GEFs pour les protéines GTPases de type Rho (Ras homology member) (Rossman et al., 2005).

Dans la partie C-terminale de la protéine, on trouve un domaine VPS9 (Vacuolar Protein Sorting 9 domain) qui est présent dans de nombreux GEFs de la protéine Rab5 (Ras-related in brain 5) (Zerial and McBride, 2001; Carney et al., 2006).

En plus de ces 3 domaines, on trouve une répétition en tandem de huit motifs MORN (Membrane Occupation and Recognition Nexus) formés de 23 acides aminés qui se situe entre les domaines DH/PH et VPS9 et qui serait impliquée dans la liaison de l'alsine avec des membranes (Takeshima et al., 2000).

L'alsine contient donc de multiples domaines GEFs putatifs (RLD, DH/PH et VPS9, Figure 7) suggérant que cette protéine agit comme régulateur et/ou activateur de multiples petites protéines G (GTPases) (Hadano et al., 2001; Yang et al., 2001). *In vitro* des essais de dissociation/fixation du GTP ont prouvé que l'alsine possédait une activité GEF pour certains membres de la famille des protéines Rab5 (Rab5A, Rab5B et Rab5C), mais pas pour d'autres Rab (Rab3, Rab4, Rab7, Rab9 and Rab11), ni pour les membres de la famille des protéines Rho (Rac1, Cdc42 and RhoA) ou Ran (Otomo et al., 2003; Topp et al., 2004).

Il a été montré que l'activité GEF vis-à-vis de la famille Rab5 (Rab5-GEF) requérait la moitié C-terminale de l'alsine qui contient les motifs MORN et le domaine VPS9 (Otomo et al., 2003) et que l'alsine formait un oligomère homophilique impliquant deux sous-régions distinctes en C-terminal placées entre les motifs MORN et VPS9, oligomérisation qui est cruciale pour l'activité Rab5-GEF de l'alsine (Kunita et al., 2004).

Plusieurs études ont montré que le domaine PH/DH (figure 7) fixe spécifiquement la protéine Rac1 *in vitro* (Topp et al., 2004; Kanekura et al., 2005; Kunita et al., 2007) et que la surexpression de l'alsine dans des cellules en culture augmentait le niveau de Rac1 activée, c'est-à-dire fixée au GTP (Topp et al., 2004; Kanekura et al., 2005; Tudor et al., 2005). Néanmoins, il a été rapporté aussi que l'alsine ne possédait pas d'activité GEF pour Rac1 *in vitro* (Otomo et al., 2003; Topp et al., 2004). Ces résultats semblent indiquer que l'alsine agirait plutôt comme un effecteur que comme un GEF pour la protéine Rac1.

Aucune activité GEF n'a été détectée *in vitro* pour les protéines de la famille Ran malgré la présence du domaine RLD en N-terminal (Otomo et al., 2003). Les domaines RLD ont été décrits dans de nombreuses protéines possédant diverses fonctions. Le domaine RLD de l'alsine pourrait avoir un rôle dans des interactions protéines-protéines ou protéines-lipides. Il a été montré que le domaine RLD de l'alsine modulait la localisation subcellulaire de celle-ci (Yamanaka et al., 2003; Kunita et al., 2007).

### 4.3.1. Les modèles murins

Six groupes indépendants ont généré des souris inactivées pour l'alsine (ALS2-/-) (Devon et al., 2006; Hadano et al., 2006; Yamanaka et al., 2006; Deng et al., 2007; Cai et al., 2008; Gros-Louis et al., 2008). Bien que la production de la forme longue de l'alsine ait été interrompue dans toutes les souris produites, aucune n'a développé de phénotypes correspondant à ceux observés chez les patients. Elles ne présentaient pas d'anomalies évidentes de développement, se reproduisaient normalement et leur durée de vie était normale. Néanmoins, elles présentaient tout de même quelques atteintes motrices et/ou comportementales, rapportées par une fraction significative de ces laboratoires. Ces troubles comprenaient des défauts de coordination motrice (Cai et al., 2005; Yamanaka et al., 2006; Deng et al., 2007; Gros-Louis et al., 2008), de l'apprentissage moteur (Cai et al., 2005) de la force d'agrippement (Gros-Louis et al., 2008), de la course (Yamanaka et al., 2006). Une plus grande anxiété ainsi qu'un léger surpoids ont également été observés (Cai et al., 2005).

Au niveau tissulaire et cellulaire certaines altérations phénotypiques ont tout de même pu être observées, mais là encore avec une grande variabilité selon les modèles murins. Certaines souris ont présenté une diminution de la taille du corps cellulaire des neurones du cortex moteur (Devon et al., 2006), une dégénérescence progressive des axones de la colonne latérale de la moelle épinière (Yamanaka et al., 2006) ou du tractus cortico-spinal (Gros-Louis et al., 2008). Parfois les souris ALS2-/- ont développé avec l'âge une perte progressive des cellules de Purkinje ainsi que des motoneurones spinaux. Ces pertes étaient associées à une astrogliose et à une activation de la microglie (Hadano et al., 2006). Dans la lignée développée par Cai et col. les souris ALS2-/- âgées ou des motoneurones dérivés de ces souris étaient un peu plus vulnérables au stress oxydatif (Cai et al., 2005).

En conclusion, la perte de l'alsine dans ces modèles murins n'a pas entrainé de phénotype sévère équivalent à ceux observés chez l'homme. Différentes raisons pourraient expliquer cette différence.

Une explication possible serait la différence d'organisation des voies motrices entre l'homme et la souris. Chez l'homme les mouvements volontaires sont contrôlés par les motoneurones supérieurs situés dans le cortex moteur. Ils innervent principalement (à près de 90%) les motoneurones spinaux de façon directe en réalisant avec eux une connexion synaptique dans la moelle épinière. Leurs axones forment la voie cortico-spinale directe ou latérale encore appelée faisceau pyramidal direct (ou latéral). D'autres voies reliant des motoneurones corticaux aux motoneurones spinaux existent, mais elles ne font pas de contact direct, elles sont polysynaptiques. Chez la souris, les motoneurones supérieurs envoient principalement leurs axones par le tractus cortico-spinal dorsale ou médian. Les motoneurones supérieurs font alors synapse avec des interneurones dans la moelle épinière, et non pas directement avec les motoneurones. Cette voie représente 80% des axones du tractus cortico-spinal chez la souris. Les 20% restant innervent la moelle épinière en passant par le tractus cortico-spinal ventral ou latéral. Chez l'homme, les mutations dans le gène ALS2 entrainent principalement une atteinte des motoneurones supérieurs, cette différence d'organisation pourrait donc expliquer que les souris ne soient que peu atteintes. Les résultats de l'équipe de Yamanaka soutiennent cette hypothèse, puisqu'ils ont observé, chez les souris ALS2-/-, une atteinte des axones des motoneurones supérieurs du tractus cortico-spinal latéral, et pas du dorsal, c'est-à-dire du tractus correspondant aux 20% d'axones des motoneurones supérieurs qui connectent directement les motoneurones spinaux.

Une autre explication pourrait être la présence chez la souris de protéines ayant des fonctions similaires à celle de l'alsine. De telles protéines ont pu être identifiées. Une protéine ALS2CL également présente chez l'homme, présentant une séquence homologue à la partie C-terminale de l'alsine, allant des motifs MORN au domaine VPS9, pourrait être impliquée dans une éventuelle compensation (Hadano et al., 2004). Il a été montré que cette protéine était capable de fixer Rab5 plus fortement que l'alsine, mais qu'elle ne présentait qu'une faible activité GEF pour Rab5. La co-expression d'ALS2CL et de Rab5 dans des cellules HeLa a entraîné une réorganisation des endosomes n'exprimant pas EEA1 en structure tubulaire (Hadano et al., 2004) alors que la co-expression de l'alsine et de Rab5 a conduit à un élargissement des endosomes positifs pour EEA1 (Otomo et al., 2003). Le rôle d'ALS2CL reste mal connu. Il a été aussi montré que cette protéine était principalement présente sous forme de dimères dans le cytosol et qu'elle était capable d'interagir avec les homo-oligomères d'alsine *in vitro* (Hadano et al., 2004). Un des rôles potentiel de la protéine ALS2CL serait de réguler l'action de l'alsine sur Rab5 soit en séquestrant Rab5, soit en se fixant aux homo-oligomères d'alsine. Son implication dans les processus cellulaires reste donc mal définie et son rôle lorsque l'alsine est absente reste inconnu. De plus, le fait que cette protéine soit présente chez l'homme semble indiqué que l'ALS2CL ne peut compensée l'absence de la protéine alsine, sauf si l'ALS2CL possède des rôles différents chez la souris et chez l'homme.

Une autre hypothèse permettant d'expliquer le phénotype des souris ALS2$^{-/-}$ pourrait être l'expression d'une isoforme de l'alsine. En effet, Gros-Louis et col. ont montré que les souris générées par leur groupe exprimaient une isoforme de l'alsine dont l'origine pourrait être soit un ATG de départ alternatif soit un variant d'épissage. Il a été montré que cette isoforme contenait les domaines VPS9, DH/PH et les motifs MORNs et qu'elle était exprimée aussi bien par les souris ALS2$^{-/-}$ que par les souris normales. Un fait intéressant est que chez des poissons zèbres inactivés pour le gène de l'alsine à l'aide de morpholino anti-sens, l'expression de cette isoforme a permis de corriger partiellement, tout comme l'alsine entière, le phénotype développé par les animaux. En l'absence de cette correction, les poissons ont présenté des anomalies de projections des motoneurones, une diminution du nombre de motoneurones dans la moelle épinière, des troubles de la nage et une espérance de vie de moins de cinq jours, alors qu'en présence de l'alsine ou de son isoforme, ces phénotypes étaient dans l'ensemble corrigés (Gros-Louis et al., 2008).

### 4.3.2. Localisation subcellulaire et rôles de l'alsine.

#### 4.3.2.1. Localisation subcellulaire

Dans des cultures de neurones embryonnaires (corticaux, hippocampaux, motoneurones), l'alsine a été localisée principalement dans de petites structures vésiculaires présentes dans le corps cellulaire et dans les neurites somato-dendritiques (Otomo et al., 2003; Topp et al., 2004; Jacquier et al., 2006). L'alsine a également été trouvée dans le cytosol (Otomo et al., 2003; Topp et al., 2004).

Dans les neurones matures *in vitro* l'alsine a été décrite comme étant présente aussi bien dans les dendrites, l'axone, et le corps cellulaire (Topp et al., 2004) que dans le compartiment endosomal (Otomo et al., 2003).

Il a été montré que l'alsine vésiculaire co-localisait partiellement avec les protéines Rab5 et EEA1 qui sont des marqueurs des endosomes (Yamanaka et al., 2003; Topp et al., 2004; Devon et al., 2005). Elle a également été localisée au niveau du front de migration cellulaire et dans les replis membranaires en co-localisation avec Rac1 (Topp et al., 2004). La protéine a également été décrite au niveau du centrosome (Millecamps et al., 2005).

La localisation subcellulaire de l'alsine est déterminée par ses différents domaines. La partie C-terminale contenant les domaines MORN et VPS9, est impliquée dans la localisation endosomale de l'alsine (Otomo et al., 2003). Le domaine N-terminal qui comprend le domaine RLD va favoriser une localisation cytosolique de la protéine. Il

serait également responsable de la localisation de l'alsine dans les replis membranaires en interagissant avec Rac1 (Yamanaka et al., 2003; Chandran et al., 2007; Kunita et al., 2007). De façon surprenante, alors que ce domaine semblait limiter la présence de l'alsine au niveau des endosomes, une mutation faux-sens dans RLD na pas entrainé uniquement des problèmes de localisation au niveau cytosolique ou membranaire, mais a provoqué une perte de l'alsine endosomale (Panzeri et al., 2006).

#### 4.3.2.2. Trafic vésiculaire/endosome

Différentes études ont montré que l'alsine pouvait se localiser au niveau des endosomes, qu'elle interagissait avec la protéine Rab5 et qu'elle était capable de l'activer. Il a été montré que la partie C-terminale de l'alsine contenant uniquement les domaines MORN et VPS9 activait Rab5 *in vitro*, et que si cette partie comprenait en plus le domaine PH/DH, ce fragment allait alors activer de manière constitutive Rab5 *in vivo* (Otomo et al., 2003). De manière intéressante, il a aussi été montré que pour activer Rab5 et provoquer la fusion endosomale et l'élargissement des endosomes, l'alsine devait former un homo-oligomère par l'intermédiaire de sa région C-terminale (Kunita et al., 2004).

Rab5 est impliquée dans la dynamique endosomale et contrôle la fusion des vésicules d'endocytose avec les endosomes précoces (Zerial and McBride, 2001). Il a été montré que l'alsine était impliquée via l'activation de Rab5 dans la dynamique et la fusion des endosomes. Ces défauts ont été observés par différents groupes sur des cellules ou des extraits cellulaires issus de ces souris ALS2-/-et notamment dans le modèle étudié par Devon et col. (Devon et al., 2006). Dans les neurones extraits de ces souris ALS2-/- il a été montré des perturbations du transport endosomal de certains récepteurs de facteurs trophiques comme ceux à l'IGF1 (Insulin-like Growth Factor 1) et au BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) (Devon et al., 2006). Chez ces souris l'activité de la fusion endosomale impliquant Rab5 était réduite dans des extraits cytosoliques de cerveau de souris $ALS2^{-/-}$ par rapport à des souris non mutées (Devon et al., 2006). Il a été également montré dans des fibroblastes murins embryonnaires invalidés pour le gène ALS2, que la fusion des endosomes dépendante de Rab5 était retardée (Hadano et al., 2006). Par ailleurs, la déplétion de l'alsine par des siRNA dans des motoneurones de rats a entrainé une diminution de la taille des endosomes (Jacquier et al., 2006). Enfin, la surexpression de l'alsine a entrainé des élargissement des endosomes dans des cellules COS7 (Millecamps et al., 2005).

Ces éléments dans leur ensemble ont montré que l'alsine participait à la voie endosomale et était impliquée dans la fusion et la dynamique des endosomes par l'intermédiaire de Rab5.

#### 4.3.2.3. Croissance axonale

La protéine Rac1 a été impliquée dans la croissance des neurites (Li et al., 2000; Nikolic, 2002) et plusieurs études ont montré que l'alsine interagissait avec cette protéine. En effet, il a été montré que le domaine PH/DH de l'alsine fixait spécifiquement la protéine Rac1 *in vitro* et que la surexpression de l'alsine entrainait une augmentation du niveau de Rac1 activée. L'alsine serait un effecteur de Rac1 (Kunita et al., 2007).

Il a été montré que dans des neurones immatures embryonnaires corticaux et d'hippocampe que l'alsine était présente au niveau du cône de croissance de l'axone dans des zones présentant une forte densité en Rac1 et en actine (Tudor et al., 2005). Par ailleurs, plusieurs études ont montré que l'alsine était impliquée dans la croissance neuritique. En effet, il a été montré que dans des cultures de neurones hippocampaux, la surexpression de l'alsine entraînait un allongement des neurites (Tudor et al., 2005), alors que l'extinction de son expression à l'aide de ARNsi entraînait une diminution de la longueur de l'axone (Jacquier et al., 2006). Enfin, des neurones issus de souris inactivées pour le gène de l'alsine ont également des axones plus courts (Otomo et al., 2008).

Ces différents travaux suggèrent donc que l'alsine serait impliquée dans la croissance des neurites par l'intermédiaire de Rac1.

#### 4.3.2.4. Autre rôles de l'alsine

L'alsine semble également impliquée dans l'excitotoxicité en participant au transport de la sous-unité GluR2 des récepteurs AMPA. En effet, Lai et col. ont montré que le domaine RLD de l'alsine interagissait avec la protéine GRIP1 (glutamate receptor interacting protein 1) (Lai et al., 2006). GRIP1 est un des régulateurs du trafic de la sous-unité GluR2 du récepteur AMPA au glutamate (AMPA-R). Ce récepteur est impliqué dans les phénomènes d'excitotoxicité induits par le glutamate dans les neurones. Le récepteur AMPA est un tétramère composé de différentes combinaisons de sous unités (GluR1, 2, 3 ou 4). Parmi ces sous unités, GluR2 joue un rôle particulièrement important puisque les récepteurs AMPA qui la contiennent sont imperméables au calcium. Or c'est l'afflux trop important de calcium via les

récepteurs au glutamate qui est responsable de l'excitotoxicité. Il a été montré que les neurones qui présentaient un défaut en GluR2 dans leurs récepteurs AMPA étaient particulièrement vulnérables à l'excitotoxicité (Kwak and Weiss, 2006). D'autre part dans des neurones ALS2-/-, il a été montré que la perte de l'alsine altérait la localisation subcellulaire de GRIP1, corrélée à une réduction de GluR2 à la surface synaptique. Il en a résulté une plus grande sensibilité de ces neurones mutants à l'excitotoxicité (Lai et al., 2006).

D'autre part, il a été montré que la surexpression de l'alsine entraînait une fragmentation de l'appareil de Golgi, ce qui sous-entend qu'elle pourrait avoir un rôle au niveau de celui-ci (Millecamps et al., 2005). L'alsine a également été localisée au niveau du centrosome, ce qui pourrait impliquer un rôle de l'alsine dans l'organisation des microtubules (Millecamps et al., 2005).

La protéine alsine est donc une protéine qui possède de multiples domaines et qui présente une localisation subcellulaire variée. Ces caractéristiques suggèrent que l'alsine pourrait avoir de multiples et importantes fonctions, les mieux déterminées à ce stade sont liées au trafic vésiculaire et à la croissance neuritique.

### 4.3.3. Conclusion

Les mutations dans le gène ALS2 entraînent des manifestations cliniques variables d'atteintes des motoneurones. Les souris modèles ne reproduisent pas la pathologie observée chez l'homme. Deux rôles principaux de l'alsine ont tout de même pu être identifiés à partir des différents modèles : un rôle dans le trafic des endosomes et un rôle dans la croissance neuritique. De plus, quelques éléments indiquent des processus pathologiques communs entre les formes précoces ALS2 et les autres formes de SLA plus tardives : 1) les souris ALS2-/- comme les souris mutantes dans SOD1 sont plus sensibles au stress oxydatif (Wong et al., 1995; Cai et al., 2005), 2) les défauts d'endocytoses dépendante de Rab5 dans l'ALS2 (Devon et al., 2006; Hadano et al., 2006) peuvent être mis en parallèle avec d'une part les anomalies du transport axonal dans les motoneurones de souris mutante SOD1(Kieran et al., 2005) et d'autre part les mutations dans le gène VAPB qui code une protéine impliquée dans le transport vésiculaire (Nishimura et al., 2004) et 3) le lien entre l'alsine et GLUR2 (Lai et al., 2006) qui implique des mécanismes d'excitotoxicité liée au glutamate comme observés dans les sSLA (Rothstein et al., 1995) ou chez les souris mutante dans SOD1 (Van Damme et al., 2005).

# 5. Organite et trafic intracellulaire

## *5.1. L'appareil de Golgi*

### 5.1.1. Structure

L'appareil de Golgi a été découvert en 1898. Depuis cette date, son organisation et sa structure ont été largement décrites (Farquhar and Palade, 1981, 1998; Farquhar, 1985). L'appareil de Golgi est un organite intracellulaire péri-nucléaire qui est en contact étroit avec le réticulum endoplasmique (RE). Il assure des modifications post-traductionnelles des protéines comme la glycosylation, il est également le siège de la synthèse des protéoglycanes. Enfin, c'est également une station de tri et de répartition des produits issus du RE. Ces diverses fonctions le placent au cœur des voies de sécrétion. Il présente une organisation bien définie : il est composé de disques de membrane appelés citernes qui forment des piles ordonnées de 3 à 6 éléments. Ces empilements de citernes sont appelés dictyosomes. Ils se subdivisent en trois régions : le *cis*-golgi, le golgi médian et le *trans*-golgi (Figure 8). Cette structure caractéristique est conservée chez tous les eucaryotes. Contrairement aux eucaryotes dits inférieurs qui ne contiennent qu'une ou quelques piles de Golgi, les cellules de mammifères contiennent plusieurs piles de Golgi qui sont connectées latéralement par des tubules de membranes reliant les citernes équivalentes formant, ainsi, un seul complexe. Des tubules peuvent aussi connecter des citernes différentes. Par exemple des tubules peuvent connecter des citernes du Golgi médian avec des citernes du trans-Golgi. De telles connexions pourraient faciliter le déplacement des molécules au travers de l'appareil de Golgi.

Comme décrit précédemment les dictyosomes présentent une face *cis* (ou face d'entrée) et une face *trans* (ou face de sortie). Les faces *cis* et *trans* sont associées à des compartiments spécifiques et chacun de ces compartiments est composé d'un réseau de structures interconnectées de type citernes et tubules. Ce sont respectivement le réseau *cis*-golgien (encore appelé compartiment intermédiaire) et le réseau *trans*-golgien (Figure 8). Les protéines et les lipides entrent dans le réseau *cis*-golgien par des vésicules provenant du RE et sortent par le réseau *trans*-golgien. Ces deux réseaux sont considérés comme importants dans le tri protéique. Au cours de leur traversée de l'appareil de Golgi, les molécules subissent une série ordonnée de modifications covalentes. Les protéines qui entrent dans le réseau *cis*-golgien peuvent soit continuer leur déplacement dans l'appareil de Golgi, soit être renvoyées dans le RE. De même, les protéines qui sortent du réseau *trans*-golgien peuvent continuer plus avant et être adressées, selon leur destinée, aux lysosomes, aux vésicules sécrétoires ou à la surface cellulaire, soit renvoyées à un compartiment

précédent. Les vésicules intra-golgiennes sont pour la plupart recouvertes d'un complexe protéique COP (coatamer protein) et font de 50 à 60 nm de diamètre. Les vésicules les plus larges émanent du réseau *trans*-golgien et sont couvertes de clathrine.

L'appareil de Golgi est un organite fortement dynamique et auto-organisé. Il peut changer rapidement de morphologie et même se fragmenter ou se réassembler en fonction de conditions physiologiques ou pathologiques. Par exemple le Golgi se dissocie en petites vésicules durant la mitose. Les vésicules sont alors réparties entre les cellules filles puis se réassemblent pour produire un appareil de Golgi fonctionnel à la fin de la mitose.

L'appareil de Golgi possède deux fonctions clés. Il contient les enzymes responsables de la maturation des protéines et des lipides nouvellement synthétisés et il assure le tri et l'adressage de ces molécules.

### 5.1.2. Glycosylation des protéines

Comme pour sa structure, ses principales fonctions sont aujourd'hui bien connues (Farquhar and Palade, 1981, 1998; Farquhar, 1985). La principale fonction de l'appareil de Golgi est de modifier et de trier les glycoprotéines, les protéoglycanes et les glycolipides. La première étape de la glycosilation des protéines est effectuée dans le RE, mais la plus grande partie des glycosilations se fait au sein de l'appareil de Golgi où vont être ajoutées des chaînes d'oligosaccharides aux protéines.

L'appareil de Golgi des mammifères contient plus de 200 glycotransférases. Ces enzymes sont principalement membranaires. Elles sont réparties dans les différentes citernes et elles forment en général un gradient le long des piles de saccules. Cette répartition est nécessaire pour assurer une glycosylation correcte des protéines. Les différentes étapes du traitement des protéines se produisent sous forme d'une séquence organisée, chaque citerne contenant une quantité et un ensemble caractéristique d'enzymes. Les protéines sont modifiées par étapes successives tandis qu'elles se déplacent d'une citerne à l'autre au travers du dictyosome qui forme une unité de traitement multi-étapes. Le traitement des molécules se produit selon une séquence ordonnée à la fois spatialement et biochimiquement. Les enzymes qui catalysent les premières étapes du traitement sont concentrées dans les citernes proches de la face *cis* alors que celles qui catalysent les étapes ultérieures sont concentrées dans les citernes proches de la face *trans*.

Cette division fonctionnelle et structurelle de l'appareil de Golgi soulève deux questions. La première relative au transport des molécules d'une citerne à l'autre et la seconde aux mécanismes assurant le maintien des enzymes golgiennes au sein

de cet organite. Ces deux points amènent à s'intéresser au transport au sein de l'appareil de Golgi.

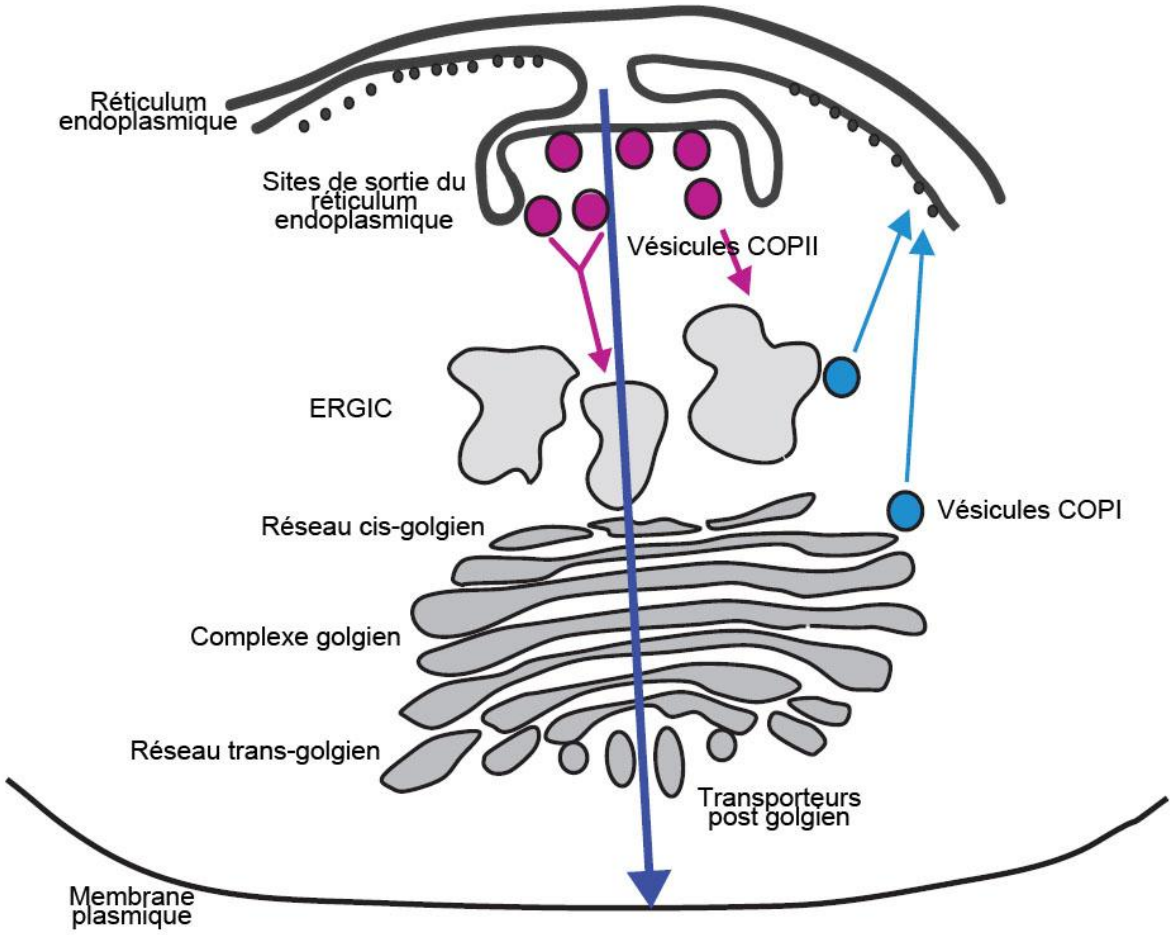



**Figure 8.** Organisation de l'appareil de Golgi. Les vésicules COPII contenant les molécules à sécréter provenant du RE fusionnent avec l'ERGIC (Endoplasmic Reticulum/Golgi Intermediate compartment) et le réseau cis-Golgien. Les vésicules COPI permettent le retour des protéines du RE depuis l'appareil de Golgi. Les molécules apportées au cis-Golgi vont traverser le complexe puis être adressées via les vésicules post golgiennes aux sous-compartiments cellulaires relevants. La flèche bleue indique le sens de la voie de sécrétion. Adapté de (Farhan and Rabouille, 2011).

### 5.1.3. Transport

#### 5.1.3.1. Transport du RE au Golgi

Les protéines nouvellement synthétisées sont internalisées dans des vésicules recouvertes de COPII (COat Protein complex) dans des sites de sortie spécialisés du RE. Les vésicules COPII peuvent ensuite fusionner soit avec le *cis*-Golgi, soit les unes avec les autres, soit avec un compartiment intermédiaire entre le RE et le Golgi, appelé ERGIC (ER-to-Golgi Intermediate Compartment). Sur la membrane de l'ERGIC des vésicules couvertes de COPI peuvent se former. Ces vésicules peuvent bourgeonner du Golgi et de l'ERGIC pour aller fusionner avec le RE et ainsi recycler les protéines résidentes du RE (Figure 8).

#### 5.1.3.2. Transport à travers le Golgi

Il existe aujourd'hui plusieurs modèles permettant d'expliquer les mouvements des molécules au travers de l'appareil de Golgi (Glick and Luini, 2011).

Le premier modèle est basé sur un transport vésiculaire des molécules entre les citernes qui sont stables (Farquhar and Palade, 1981)(Figure 9, A). Dans ce modèle l'appareil de Golgi est une structure relativement statique, dont les enzymes sont maintenues en place, tandis que les molécules en transit sont véhiculées au sein de vésicules d'une citerne à l'autre. Le flux rétrograde assure la « récupération » des protéines échappées prématurément du RE ou d'un sous compartiment de l'appareil de Golgi et les rapporte aux compartiments précédents. Les vésicules antérogrades comme les vésicules rétrogrades seraient recouvertes de COPI, mais ce manteau pourrait contenir des protéines adaptatrices différentes conférant la sélectivité de l'entrée des molécules dans les vésicules. Le mouvement des vésicules qui partent de chaque citerne et qui vont vers celle qui lui est adjacente serait favorisé par des protéines filamenteuses qui restreignent leur mouvement et qui facilite leur fusion avec la bonne membrane cible. Une des limites de ce modèle est que les vésicules COPI effectueraient uniquement le transport rétrograde dans l'appareil de Golgi (Marsh and Howell, 2002).

Le second modèle est basé sur la maturation des citernes golgiennes (Glick et al., 1997) (Figure 9, B). Dans ce modèle, l'appareil de Golgi est une structure dynamique dans laquelle les citernes elles-mêmes se déplacent au travers du dictyosome. Les agrégats tubulo-vésiculaires qui proviennent du RE fusionnent les uns aux autres pour devenir le réseau *cis*-golgien. Celui-ci subit alors une maturation progressive

pour devenir une citerne *cis*, puis une citerne médiane et ainsi de suite. Par conséquent, à la face *cis* d'un dictyosome golgien, de nouvelles citernes se forment continuellement puis migrent à travers le Golgi tandis qu'elles maturent. Selon ce modèle, la distribution caractéristique des enzymes golgiennes s'explique par un flux rétrograde. Les vésicules COPI qui bourgeonnent recueillent continuellement les enzymes et les transportent de façon rétrograde dans les citernes précédentes. Une citerne *cis* néoformée recevrait ainsi ses enzymes de la citerne qui lui est antérieure et les transmettrait ensuite de façon rétrograde.

Un troisième modèle qui reprend le modèle de maturation des citernes (Figure 9B) décrit en plus des connexions tubulaires entre les citernes qui forment des jonctions entre les citernes adjacentes (Glick and Luini, 2011) (Figure 9C). Ces tubules seraient, de plus, impliqués dans le trafic antérograde et rétrograde entre le RE et le Golgi. Ces connexions tubulaires hétéro-typiques permettraient un trafic antérograde rapide des petites molécules et/ou un trafic rétrograde des protéines résidentes du Golgi. Ce modèle permet d'expliquer le trafic rapide des petites molécules, mais pas des grosses molécules. Il permet également d'expliquer le rôle des jonctions tubulaires hétéro-typiques. Néanmoins, la présence de ce type de connexion entre les citernes golgiennes comme un évènement fréquent ou rare dans les cellules de mammifères est toujours débattue.

Un nouveau modèle baptisé « modèle de partitionnement rapide » a été proposé (Figure 9, D). Dans ce modèle, l'appareil de Golgi opère comme un compartiment unique qui contient différents domaines de traitements et d'exports. Les molécules à sécréter qui arrivent depuis le RE sont partitionnées entre les deux domaines. Elles peuvent alors être adressées à leur destination finale depuis les différents niveaux de l'appareil de Golgi et ce de manière aléatoire. Ce modèle a été inspiré par la découverte que de multiples molécules à sécréter étaient adressées à la membrane plasmique par l'appareil de Golgi avec une vitesse exponentielle (Patterson et al., 2008). Le concept des différents domaines au sein de l'appareil de Golgi est basé sur des études par fluorescence du cheminement golgien de la protéine VSV-G, qui est une protéine transmembranaire. Ces expériences ont montré que VSV-G était partiellement spatialement séparée des enzymes golgiennes de glycosilation, qui sont principalement des protéines transmembranaires (Patterson et al., 2008). Les protéines membranaires à sécréter seraient donc séparées des enzymes membranaires golgiennes, ce qui implique la présence de différents domaines. Ce modèle présente l'avantage d'expliquer le transport des grosses molécules, la mobilité des enzymes golgiennes, la présence de connexions hétéro-typiques, le rapide transport intra-golgien des petites molécules. Néanmoins, ce modèle présente tout de même certaines faiblesses, comme par exemple la supposition que les molécules à sécréter soient immédiatement réparties dans l'ensemble de l'appareil de Golgi alors que les protéines golgiennes présentent une distribution conservée.

Enfin, un dernier modèle repose sur des compartiments stables qui seraient des progéniteurs de citernes (Figure 9, E). Dans ce modèle, l'appareil de Golgi est vu comme un ensemble de compartiments stables qui sont séparés dans des domaines définis par des Rab GTPases (Pfeffer, 2010). Cette idée s'est construite sur des études qui ont montré que dans les endosomes les protéines Rab peuvent établir des domaines distincts au sein de la membrane et qu'elles peuvent conduire à des transformations biochimiques d'un compartiment par un processus appelé « conversion de Rab » (échange d'une protéine Rab par une autre, voir Chapitre 6.3.1). Les protéines Rab peuvent également promouvoir la fusion homotypique des endosomes (Rink et al., 2005). Par analogie, un domaine de citerne golgienne pourrait subir une conversion de protéine Rab suivie d'une fusion homotypique antérograde avec un domaine présentant une protéine Rab correspondante sur une citerne antérograde adjacente. Les molécules à sécréter pourraient progresser en étant transférées d'une citerne à l'autre de cette manière. Alternativement, un domaine Rab pourrait se scinder et former une méga-vésicule qui pourrait aller fusionner avec une citerne antérograde. Ce modèle permet de répondre à de nombreuses questions sur le transport au sein de l'appareil de Golgi, comme l'existence des connexions hétéro-typiques, le trafic rapide des petites molécules ou encore le transport de grosses molécules. Néanmoins, il n'a pas été identifié pour l'heure de protéines Rab ayant ce rôle au sein de l'appareil de Golgi. Ce modèle nécessite donc de plus amples recherches.

Il existe donc plusieurs modèles pour expliquer le trafic des molécules au sein de l'appareil de Golgi. Le modèle de maturation des citernes reste sans doute le mieux accepté aujourd'hui (Figure 9B). Néanmoins, certains éléments ne peuvent être expliqués par ce modèle. Les nouveaux modèles développés peuvent participer à une meilleure compréhension du trafic intra-golgien.

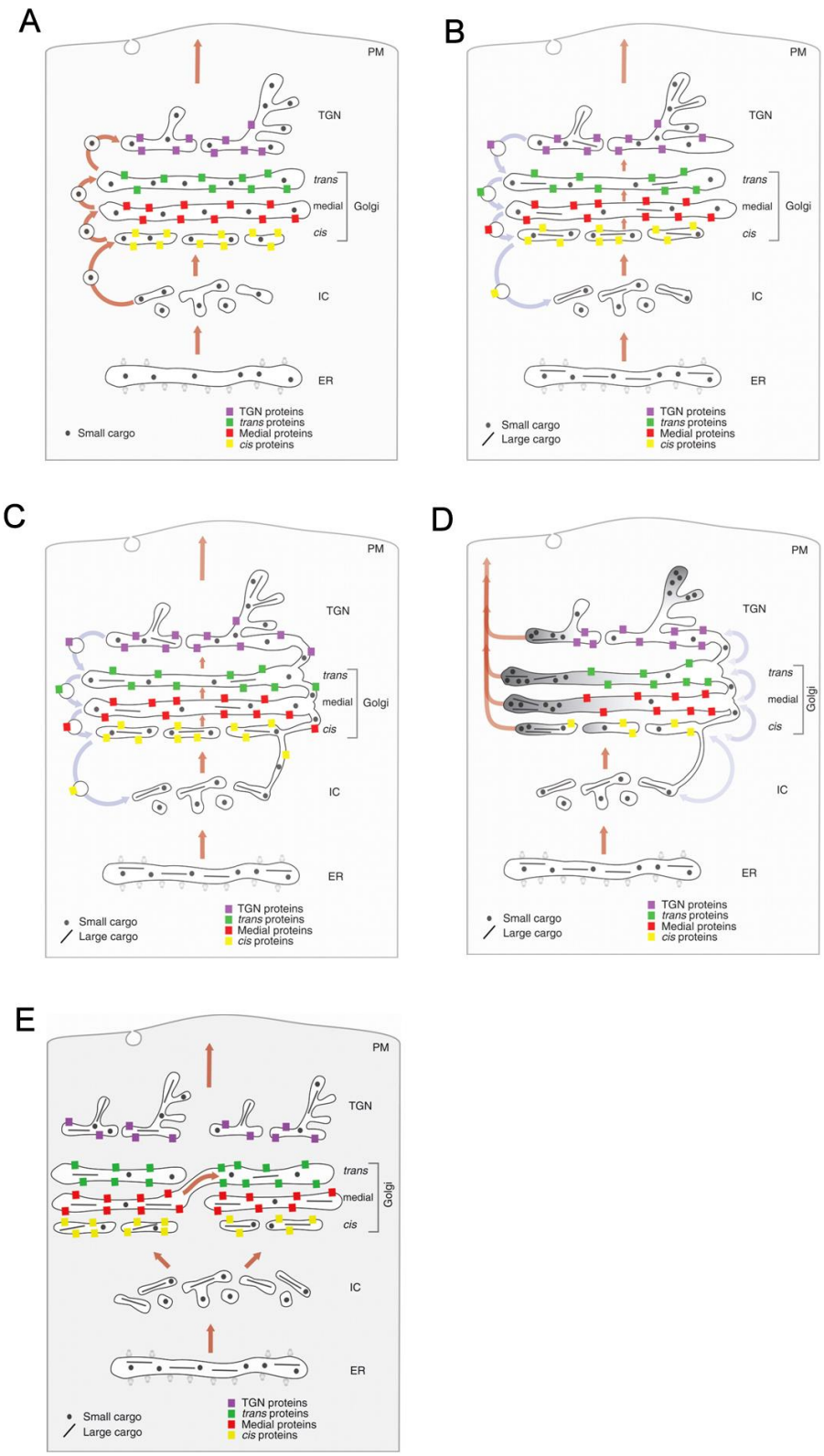



**Figure 9.** Différents modèles de trafic des molécules au sein de l'appareil de Golgi. A. Modèle basé sur des citernes stables. B. Modèle basé sur la maturation des citernes. C. Modèle de maturation des citernes avec des tubules hétéro-typiques. D. Modèle de partitionnement rapide. E. Modèle de compartiments stables comme progéniteurs de citernes (Glick and Luini, 2011).

#### 5.1.3.3. Adressage et tri depuis le Golgi

Les faces *cis* et *trans* de l'appareil de Golgi sont toutes les deux des sites de tri des protéines et des lipides qu'elles adressent à leurs localisations cellulaires spécifiques.

##### 5.1.3.3.1. Tri depuis le réseau *cis*-golgien

Le tri au niveau du réseau *cis*-golgien est impliqué dans le recyclage et dans le transport de différentes molécules vers le RE. La majorité des protéines résidentes du RE contiennent à l'extrémité C-terminale une séquence d'aminoacides KDEL (Lysine-Acide aspartique-Acide glutamique-Leucine) qui est reconnue par des récepteurs présents dans le Golgi. Ces molécules sont alors internalisées dans des vésicules COPI et transportées de manière rétrograde vers le RE (Farquhar and Palade, 1998).

##### 5.1.3.3.2. Tri depuis le réseau *trans*-golgien

Le réseau *trans*-golgien est une station de tri des protéines destinées aux différents domaines de la membrane plasmique ou aux compartiments endo-lysosomaux. Pour chacune de ces destinations, différents signaux de tri existent. Diverses machineries moléculaires vont reconnaître ces signaux et assurer l'incorporation des protéines dans les différents itinéraires d'adressages post-golgiens. Les signaux de sortie sont contenus dans la partie cytoplasmique des molécules et parfois dans des récepteurs spécifiques de ces molécules. Les molécules qui ne possèdent pas de signaux d'adressage sont par défaut internalisées dans des vésicules de la voie de sécrétion constitutive. Les différentes voies sont détaillées par la suite.

##### 5.1.3.3.3. Adressage aux les lysosomes

Les enzymes lysosomales sont synthétisées dans le RE, puis transportées et modifiées au niveau de l'appareil de Golgi. Elles sont triées au niveau du réseau *trans*-golgien pour être adressées aux compartiments endo-lysosomaux par des vésicules de transport. Ces dernières incorporent les enzymes lysosomales et excluent les autres protéines. Une partie des enzymes lysosomales portent un

marqueur sous forme de groupement mannose-6-phosphate (M6P). Ce marqueur est reconnu par un récepteur protéique membranaire, le récepteur au mannose-6-phosphate (M6PR) qui se trouve dans le réseau *trans*-golgien. Ces récepteurs fixent les hydrolases lysosomales du côté luminal de la membrane. Les adaptines reconnaissent la portion cytosolique de ces récepteurs et capturent d'autre part les molécules de clathrine aboutissant ainsi à la formation de vésicules à manteau de clathrine contenant les hydrolases lysosomales (Braulke and Bonifacino, 2009). Les mécanismes de transports des enzymes lysosomales impliquent également l'adressage à la membrane plasmique qui est décrit plus loin (chapitre 2.3.3.5). Enfin, une partie des enzymes lysosomales est sécrétée dans le milieu extracellulaire et va être recaptée par les récepteurs M6PR présents à la membrane plasmique (Coutinho et al., 2012). Cette propriété est utilisée pour les traitements des maladies lysosomales par enzymothérapie ou par thérapie génique.

#### 5.1.3.3.4. Adressage à la membrane plasmique

La plupart des protéines sont transportées directement à la membrane cellulaire par la voie de sécrétion constitutive non sélective. Cette voie ne nécessite pas de signal particulier et est donc appelée voie par défaut. Dans les cellules non polarisées comme les leucocytes ou les fibroblastes, il semble que toutes les protéines de la lumière de l'appareil de Golgi soient automatiquement transportées à la surface cellulaire par cette voie sauf si elles sont spécifiquement ramenées au RE, maintenues sous forme de protéines résidentes dans l'appareil de Golgi ou destinées à des voies de sécrétions régulées ou aux lysosomes. Dans les cellules polarisées, où les différents produits doivent être apportés dans des domaines distincts de la surface cellulaire, les options sont plus complexes (Burgess and Kelly, 1987).

#### 5.1.3.3.5. Adressage à la membrane plasmique dans les cellules polarisées

Les cellules polarisées, telles que les neurones, ont deux (parfois plus) domaines distincts dans leurs membranes plasmiques vers lesquels les protéines doivent être dirigées. Les protéines membranaires destinées à la membrane basolatérale (dendrites et soma dans les cellules nerveuses) contiennent des signaux de tri dans leurs parties C-terminales. Ces séquences sont soit basées sur des motifs contenant des tyrosines (NPXY ou YXX∅ ou Y sont des tyrosines, N une asparagine, X représente n'importe quel amino-acide et ∅ est un amino-acide hydrophobe) ou des leucines ([DE]XXXL ou DXXLL, ou D est un acide aspartique, E est un acide

glutamique, L est une leucine et X n'importe quel acide aminé). Ces séquences ont également été identifiées pour des protéines dirigées vers le compartiment endo-lysosomal. Le fait que les motifs soient communs à ces deux destinations n'est pas surprenant puisque la voie indirecte d'adressage aux endo-lysosomes implique un intermédiaire qui est la membrane plasmique basolatérale.

Un autre motif qui participe à l'adressage à la membrane basolatérale est un motif di-leucine (LL). Ce motif est également impliqué dans l'endocytose. Ces deux compartiments sont ciblés par interaction avec des complexes protéiques AP (Adaptator protein complex) composés d'adaptines. Alors que le transport vers la membrane basolatérale est géré par les complexes protéiques AP-1B, AP-3 et AP-4 celui du compartiment endo-lysosomal est géré par AP-1A, AP-3 et GGAs (Golgi-localized gamma ear containing, ADP ribosylation factor binding proteins). Ces complexes, hormis AP-4, vont fixer des molécules de clathrine. Le blocage d'AP-1, GGA, AP-3 et de la machinerie de bourgeonnement des vésicules de clathrine n'affecte pas la sécrétion constitutive, mais interfère avec la livraison normale des protéines aux lysosomes (Rodriguez-Boulan and Müsch, 2005).

Les signaux d'adressage au compartiment apical (ou axonal dans les neurones) comprennent des lipides (ancre GPI (glycosyl-phosphatidyl-inositol)), des sucres (N et O–glycanes) ou des motifs peptidiques. D'autre part, les protéines N- et/ou O-glycanées et les glycolipides peuvent être reconnues par des récepteurs lectines comme la galectine.

Un mécanisme non conventionnel du transport apical est l'association avec les radeaux lipidiques. De nombreuses protéines ont des affinités pour des microdomaines lipidiques assemblés dans le Golgi qui sont ultérieurement adressés à la membrane apicale. Ces associations seraient le principal mécanisme permettant de ségréger les protéines associées aux radeaux lipidiques.

La présence de différentes machineries de tri implique que les molécules sont activement ségrégées dans différents microdomaines du réseau *trans*-golgien en fonction de leur destination cellulaire finale. Il a été montré que le réseau tubulaire qui caractérise le réseau trans-golgien n'émane pas seulement de la dernière citerne *trans*-golgienne. Les tubules peuvent aussi provenir des deux citernes *trans*-golgiennes précédentes (Rodriguez-Boulan and Müsch, 2005).

#### 5.1.3.3.6. Mécanismes moléculaires du transport vésiculaire

Les protéines qui entourent les vésicules sont recrutées et assemblées à des sites spécifiques de la membrane donneuse par des petites protéines fixant le GTP. Le complexe ainsi formé va déformer la membrane et éventuellement permettre la

scission de la membrane pour produire une vésicule. La vésicule va se déplacer vers le compartiment accepteur soit par diffusion, soit en étant aidée par des moteurs cyto-squelettiques. La vésicule est alors attachée à la membrane cible par un processus impliquant les golgines. Cet attachement de la vésicule est suivi par le désassemblage de la couverture de la vésicule et sa fusion avec la membrane receveuse. La fusion est contrôlée par les SNARE (Soluble NSF (N-ethyl-maleimide Sensitive Factor) Attachment protein REceptor) qui se trouvent sur les deux membranes. Les SNARE présents sur les vésicules (v-SNARE) vont reconnaître spécifiquement des SNARE présents sur la membrane cible (t-SNARE) formant ainsi un complexe qui va apposer les membranes et favoriser leur fusion (Cai et al., 2007).

### 5.1.4. La matrice golgienne

L'architecture de l'appareil de Golgi dépend à la fois des microtubules et de protéines de la matrice golgienne cytoplasmique. Ces protéines forment un échafaudage entre les citernes adjacentes et donnent au dictyosome son intégrité structurale. Les protéines qui composent la matrice golgienne ont été identifiées comme des membres des familles des golgines et des GRASP (Golgi ReAssembly and Stacking Protein).

Les golgines sont principalement des protéines avec une structure en super-hélice (coiled-coil) qui ont parfois une partie ancrée dans la face cytosolique de la membrane du Golgi. Les différentes golgines sont localisées dans des régions différentes du Golgi. Par exemple la golgine GM130 (Golgi Matrix protein 130) est principalement localisée au niveau du *cis*-Golgi alors que la giantine est associé avec le Golgi-median et la golgine 97 avec le *trans*-Golgi (Barinaga-Rementeria Ramirez and Lowe, 2009). Leur différente localisation implique des rôles différents. La plupart des golgines sont régulées par des interactions avec de petites GTPases de la famille Rab (Barinaga-Rementeria Ramirez and Lowe, 2009). Les protéines Rab peuvent réguler la localisation des golgines à la membrane du Golgi et induire des changements conformationnels et ainsi moduler leurs activités. Leur structure en super-hélice procure aux golgines une architecture fibrillaire. Cette architecture les rend très adaptées à des liaisons intermembranaires. Par exemple, il a été montré qu'elles retenaient les vésicules de transport golgiennes proches de cet organite, et participaient au maintien des piles de citernes (Diao et al., 2003). D'autre part certaines golgines ont été impliquées dans les interactions de l'appareil de Golgi avec les microtubules et participeraient ainsi à sa localisation subcellulaire (Rivero et al., 2009).

La matrice golgienne est également composée de protéines GRASP. Cette famille de protéines régule la formation et le maintien des piles de saccules Golgiens. Chez les

vertébrés il existe deux protéines GRASPs qui sont GRASP 65 et 55 (Sütterlin et al., 2005). Elles sont localisées respectivement aux citernes *cis* et médiane. Ces protéines sont capables de former des homo-oligomères. Les GRASP de deux citernes adjacentes pourraient ainsi former des dimères entre les deux citernes et ainsi les maintenir proches (Barinaga-Rementeria Ramirez and Lowe, 2009).

### 5.1.5. Golgi et microtubules

Dans la plupart des cellules de vertébrés, les citernes golgiennes sont connectées et forment un dictyosome. Celui-ci est situé à proximité du centrosome, qui est le centre organisateur des microtubules dans la cellule. Le centrosome est composé d'une paire de centrioles entourée d'un matériel dense aux électrons appelé matrice péricentriolaire. Le complexe péricentriolaire de γ-tubuline (γ-TuRSC, γ-Tubuline Ring Small Complex) interagit avec la protéine AKAP450 (A Kinase Anchoring Protein) et favorise la nucléation des microtubules. L'extrémité « moins » des microtubules (capable de décroître rapidement) se situe au niveau du centrosome et l'extrémité « plus » (capable de croître rapidement) vers la périphérie des cellules. Il a été montré qu'après un traitement de cellules avec une drogue induisant la dépolymérisation des microtubules, les piles de Golgi se déconnectaient les unes des autres et se dispersaient dans le cytoplasme au niveau des sites de sortie du RE (Cole et al., 1996). L'inhibition du moteur moléculaire la dynéine a induit le même phénotype dans des cellules HeLa (Palmer et al., 2009). Ces résultats ont montré que le réseau de microtubules, ainsi que la dynéine, étaient impliqués dans le maintien de la structure de l'appareil Golgi.

Bien que le centrosome soit le principal centre de nucléation des microtubules, l'appareil de Golgi peut également fonctionner comme un centre organisateur des microtubules capable de nucléer ceux-ci via un pool de γ-tubulines localisé à son niveau (Nakamura, 2010). Il est capable de nucléer des microtubules au niveau du *cis*-Golgi mais aussi au niveau du *trans*-Golgi. La formation des microtubules au niveau du *cis*-Golgi se fait par un mécanisme impliquant AKAP450. La localisation d'AKAP450 au niveau du *cis*-Golgi est dépendante de GM130. Les microtubules nucléés à ce niveau sont importants pour la sécrétion polarisée. Au niveau de *trans*-Golgi la formation des microtubules est dépendante des protéines CLASPs [CLIP (Cytoplasmic LInker Protein)-ASsociated Proteins)]. Les protéines CLASPs vont couvrir les microtubules nucléés dans le *cis*-Golgi, favoriser leur stabilisation puis promouvoir leur polymérisation vers la périphérie des cellules (Efimov et al., 2007).

Les microtubules provenant du Golgi forment un réseau asymétrique qui est préférentiellement orienté vers le front de migration des cellules. Ce réseau est

important pour la livraison polarisée depuis le Golgi à cette région de la membrane plasmique (Miller et al., 2009).

En plus de leur rôle dans le trafic polarisé les microtubules nucléés au niveau du Golgi via CLASP sont impliqués dans l'assemblage des dictyosomes. Durant la formation du Golgi, ils agissent en cherchant et en fixant les saccules de Golgi individuels qui sont alors transportés de la périphérie vers le centre cellulaire par un trafic sous contrôle de la dynéine le long du réseau de microtubules provenant du centrosome. La formation des piles de saccules nécessite deux lots de microtubules nucléés de manière indépendante mais agissant de concert. Les microtubules formés au Golgi sont également impliqués dans le maintien des piles de saccules, probablement en gardant ceux-ci les uns contre les autres pour former des liaisons tubulaires (Kodani and Sütterlin, 2009).

### 5.1.6. La protéine GM130

La protéine GM130 est une protéine de la matrice golgienne. Elle aurait une structure en super-hélice (coiled-coil) à l'exception de ses extrémités N et C-terminales (Nakamura, 2010). Sa conformation lui confèrerait un aspect en forme de tige qui serait approprié à un élément structural ou à un facteur d'ancrage des vésicules. Elle est localisée au niveau du *cis*-Golgi (Nakamura et al., 1995).

GM130 est impliquée dans de très nombreux processus cellulaires schématisés sur la Figure 10 et dont certains rôles sont détaillés ci-après.

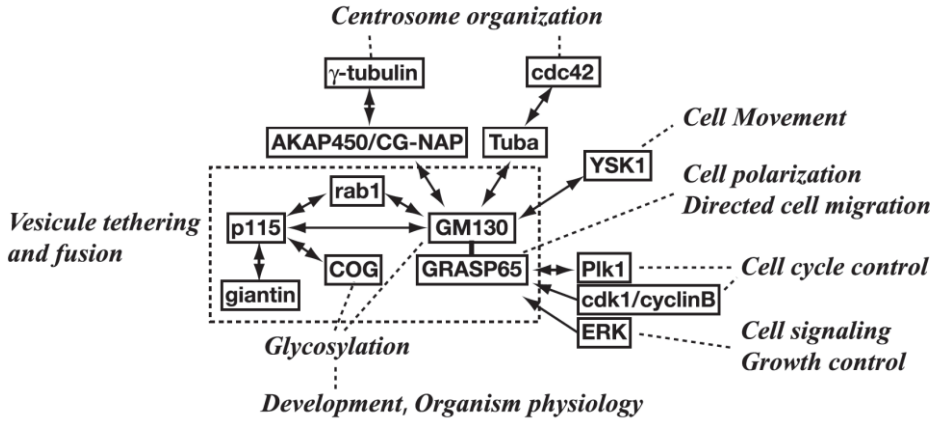



**Figure 10.** Rôles de GM130 (Nakamura, 2010).
GM130 et GRASP65, avec p115, giantine et rab1 sont impliquées dans l'ancrage des vésicules et dans leur fusion (indiqué dans le rectangle en pointillés). GM130 est de plus impliquée dans l'organisation du centrosome via ses interactions avec AKAP450/CG-NAP et Tuba. Elle est également impliquée dans le contrôle du mouvement cellulaire via YSK1. Par ses interactions avec p115, GM130 serait impliquée dans la glycosilation. Enfin, par la phosphorylation de GRASP65, GM130 est impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire, dans la signalisation cellulaire, le contrôle de la croissance cellulaire, dans la polarisation et dans la migration cellulaire.

### 5.1.6.1. GM130 et p115

La protéine p115 est le partenaire protéique le plus important de GM130. p115 est impliquée dans le transport du RE vers le Golgi et dans la fusion vésiculaire.

Elle interagit par sa partie C-terminale avec la partie N-terminale de GM130. Au début de la mitose, la région N-terminale de GM130 est phosphorylée par cdk1/cyclinB ce qui inhibe les interactions entre GM130 et p115 et aboutit à une réduction de la fusion des vésicules COPI avec l'appareil de Golgi et au désassemblage de celui-ci durant la mitose (Lowe et al., 2000). La partie C-terminale de p115 fixe également la giantine, qui est une protéine golgienne transmembranaire possédant une longue partie N-terminale cytoplasmique qui aurait une structure en super-hélice. Elle est principalement localisée sur les bords de l'appareil de Golgi, ce qui pourrait impliquer un rôle dans la formation des vésicules COPI. La giantine se retrouve en grande quantité dans les vésicules COPI, ce qui pourrait impliquer que le complexe giantine-p115-GM130 participe à l'ancrage des vésicules aux citernes golgiennes et pourrait ainsi faciliter la fusion des vésicules durant le transport inter-citerne (Figure 11) (Nakamura, 2010). De plus, p115 interagit avec la syntaxine 5 (une t-SNARE) et avec son partenaire GOS28 (une v-SNARE) et favoriserait la formation du complexe SNAREpin (complexe de t-SNARE et v-SNARE) et ainsi la fusion vésiculaire (Shorter et al., 2002). Il a été montré que la syntaxine 5 se fixait aussi à G130 mais que cette fixation était inhibée par la fixation de p115 à GM130 (Diao et al., 2008). La syntaxine 5 pourrait ainsi être transférée de GM130 à p115 après la formation du complexe d'ancrage.

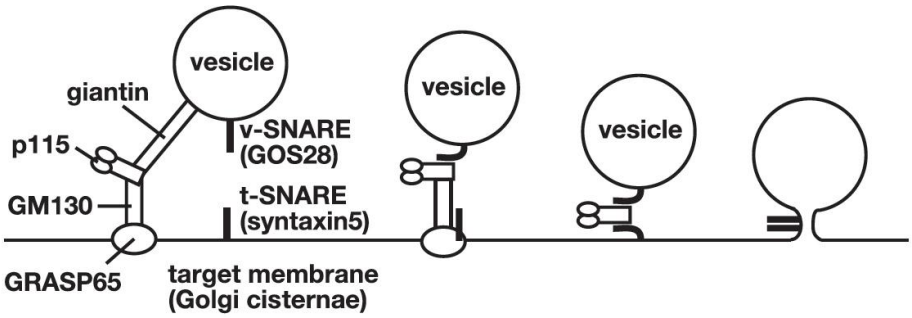



**Figure 11.** Interaction de la protéine GM130 avec ses partenaires protéiques et implication dans la fusion des vésicules (Nakamura, 2010). L'ancrage des vésicules facilite la formation du complexe SNAREpin et la fusion. A gauche, la vésicule est ancrée à la membrane cible d'une citerne golgienne par la formation d'un complexe tertiaire entre la giantin, GM130 et p115. Au milieu à gauche, la v-SNARE (GOS28) fixe p115 alors que la t-SNARE (syntaxine 5) fixe GM130. Au milieu à droite, la tSNARE (syntaxine) est transférée à p115. A droite, p115 facilite la formation du complexe SNAREpin et la fusion qui s'en suit.

#### 5.1.6.2. GM130 et GRASP65

C'est le second partenaire protéique de GM130. C'est une protéine membranaire impliquée dans l'empilage des citernes. Elle est concentrée au côté *cis* de l'appareil de Golgi et dans l'espace inter-citerne. Elle forme un homo-oligomère à la membrane golgienne. Elle permettrait ainsi d'accrocher deux citernes adjacentes et favoriserait ainsi la formation de la pile de saccules (Wang et al., 2003). La partie C-terminale de GRASP65 est phosphorylée durant la mitose par cdk1/cyclinB ce qui inhibe l'oligo-dimérisation de GRASP65 et favorise le désassemblage des piles de saccules. GRASP65 serait le récepteur de GM130 à la membrane golgienne (Yoshimura et al., 2001) et les deux protéines coopèreraient pour maintenir la structure de l'appareil de Golgi.

#### 5.1.6.3. GM130 et Rab GTPases

Les protéines Rab GTPases sont des protéines de la famille des petites GTPases et sont impliquées dans le contrôle de diverses étapes du transport vésiculaire et en particulier, dans l'ancrage et dans la fusion. Plus de 60 protéines Rab ont été décrites. Deux protéines Rab (Rab1 et Rab33b) sont capables de fixer GM130 et de réguler l'ancrage des vésicules en provenance du RE (Nakamura, 2010). Néanmoins leur rôle précis reste à définir. Il a été montré que la fixation de Rab1 à GM130 était inhibée par la fixation de p115 à GM130 mais que Rab1 était également capable de fixer p115. Une hypothèse est que Rab1 régulerait la fixation de p115 et de GM130 et contrôlerait ainsi la fusion des vésicules (Nakamura, 2010).

#### 5.1.6.4. Autres fonctions de GM130

La protéine GM130 serait également impliquée, en association avec d'autres partenaires, dans la division cellulaire, la polarisation et dans la migration cellulaire dirigée, ainsi que dans l'organisation du centrosome (Figure 10).

Il a été montré que GM130 se fixait à YSK1 (Yeast Sps1/Ste20–related Kinase 1), qui est l'homologue mammifère de la kinase Ste20 de levure, et l'activait. Cette kinase est impliquée dans la transduction des signaux et dans le mouvement cellulaire (Preisinger et al., 2004). Suite à son activation, YSK1 activée phosphoryle son substrat 14-3-3ζ qui est un activateur des RhoGTPases Rac1 et Cdc42

(Bialkowska et al., 2003). Ces deux RhoGTPases sont impliquées dans la polarisation et dans la migration des cellules (Watanabe et al., 2004).

Il a également été montré que les interactions entre GM130 et YSK1 sont importantes pour la polarisation des neurones et dans l'établissement d'un seul axone et de multiples dendrites (Matsuki et al., 2010). GM130 et YSK1 sont impliquées dans une voie de signalisation qui comprend également la kinase LKB1 et qui régule l'initiation de l'axone.

GM130 contrôlerait l'organisation du centrosome en fixant la protéine Tuba qui est une GEF de cdc42. Il a été montré que GM130 pouvait également recruter AKAP450 qui interagit avec le complexe de γ-tubuline de l'appareil de Golgi et allonge des microtubules depuis celui-ci. Comme décrit dans le paragraphe 5.5, les microtubules ont un rôle dans la formation des dictyosomes du Golgi et établissent également la polarité et la migration dirigée des cellules (Lowe et al., 2000; Kodani et al., 2009).

## *5.2. La voie endo-lysosomale*

### 5.2.1. Introduction

La première étape de la voie endo-lysosomale est la formation de vésicules d'endocytose. Ces vésicules formées à la membrane plasmique vont fusionner avec des endosomes précoces. A ce stade, les molécules peuvent soit être recyclées vers la membrane plasmique, soit être dirigées vers le système de dégradation en étant adressées aux endosomes tardifs puis aux lysosomes.

La majorité des molécules internalisées par endocytose sont recyclées à la membrane plasmique par les endosomes précoces. Le transport au lysosome est limité à une faible portion des fluides et des composants membranaires internalisés.

Les endosomes tardifs vont assurer les premières étapes de la dégradation des molécules. Ils fonctionnent également comme intermédiaires entre le réseau *trans*-golgien et le lysosome, car c'est aux endosomes tardifs qu'est adressée la plupart des protéines lysosomales nouvellement synthétisées (Figure 12).

D'autre part, le cytosol peut être inclus parmi les éléments essentiels de cette voie puisqu'il fournit un ensemble de composants moléculaires qui interagissent transitoirement au niveau de la face cytosolique de la membrane endosomale. Ces constituants supportent, régulent et définissent la voie de recyclage ou de dégradation (Huotari and Helenius, 2011).

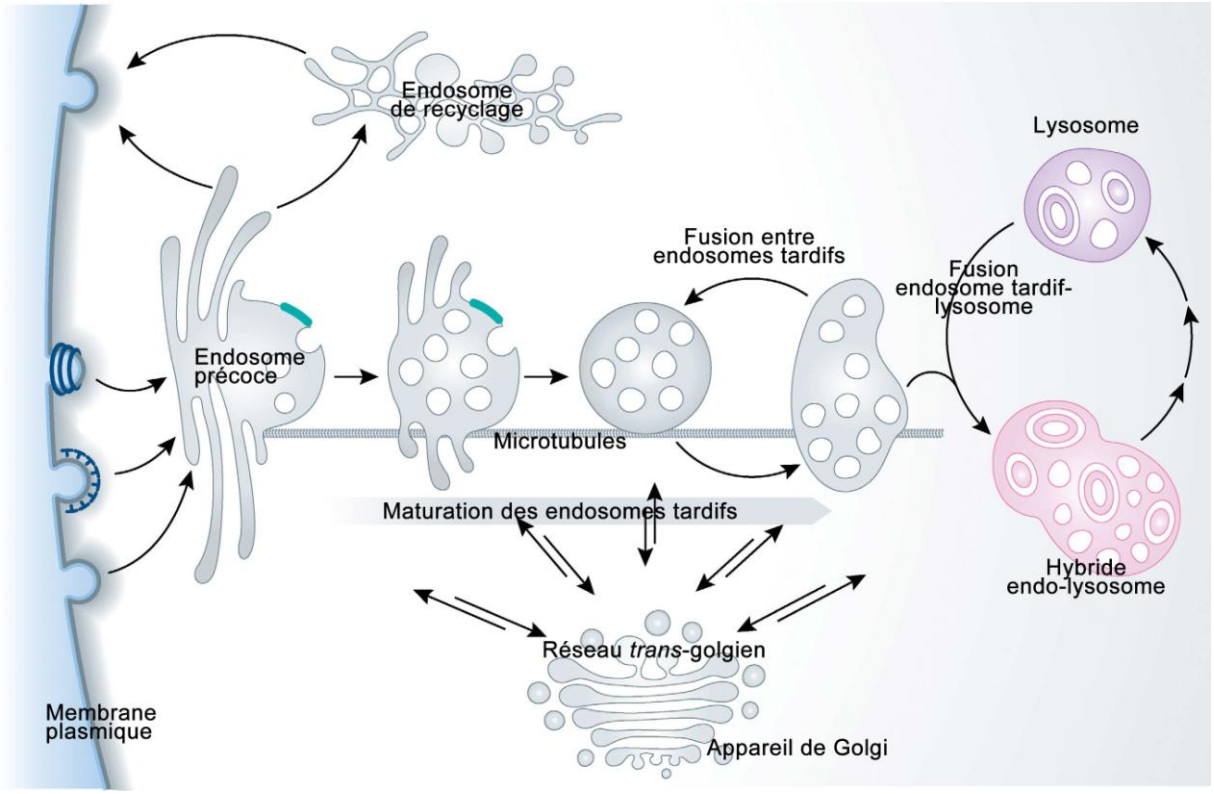



**Figure 12.** Voie endo-lysosomale (Huotari and Helenius, 2011).
Les vésicules d'endocytose vont délivrer leur contenu et leurs membranes aux endosomes précoces à la périphérie du cytoplasme. Après environ 10 à 15 minutes durant lesquelles les endosomes précoces accumulent le contenu et les membranes de vésicules endosomales et recyclent une partie de ces composants, la conversion des endosomes précoces en endosomes tardifs se produit. Lors de cette transition, les endosomes migrent le long des microtubules. Les endosomes tardifs se forment depuis la partie vacuolaire des endosomes précoces. Ils contiennent une sélection des molécules endocytées, de plus ils récupèrent en route les hydrolases lysosomales nouvellement synthétisées. Par la suite, les endosomes tardifs réalisent des fusions homotypiques, grossissent et accumulent des vésicules intraluminales. Ils vont continuer le processus de maturation pour aller fusionner avec les lysosomes. La fusion d'un endosome tardif avec un lysosome donne naissance à un organite hybride temporaire : l'endolysosome au sein duquel se déroule la dégradation. Par la suite, l'endolysosome est converti en un lysosome classique.

### 5.2.2. Les endosomes précoces (EE, early endosomes)

Les endosomes précoces ont été initialement définis comme étant le compartiment recevant les fluides et les molécules entrants (Helenius et al., 1983). Ils sont aujourd'hui décrits comme étant la principale station de tri de la voie d'endocytose (recyclage ou dégradation) des molécules internalisées. Leur formation n'est pas complètement élucidée, mais leur membrane et leur volume sont essentiellement dérivés des vésicules d'endocytose. Ils sont hétérogènes en termes de morphologie, de localisation, de composition et de fonction.

Les endosomes précoces ont des structures associant des domaines tubulaires et vésiculaires. Les domaines tubulaires contiennent l'essentiel de la surface membranaire des endosomes précoces. Ils assurent le tri des molécules à recycler. Leur membrane contient une mosaïque de sous-domaines qui varient dans leur composition et dans leur fonction. Ce sont ces sous-domaines qui vont assurer le tri des protéines et générer les transporteurs vésiculaires ciblant différents organites cellulaires comme la membrane plasmique et le réseau trans-golgien via les endosomes de recyclage. Les domaines vésiculaires contiennent l'essentiel des fluides internalisés. Ils vont assurer le tri des molécules destinées au compartiment lysosomal : protéines lysosomales nouvellement synthétisées et molécules à dégrader. Par ailleurs, c'est au sein de ces domaines que vont se former des vésicules intraluminales. Ces vésicules sont considérées comme facilitant la dégradation des protéines membranaires ubiquitinilées dans le lysosome ainsi que celle des lipides, sans doute en augmentant la surface membranaire en contact avec les enzymes lysosomales.

Les échanges avec le réseau trans-golgien sont bi-directionnels. Ils se font en continu au niveau des endosomes précoces, des endosomes tardifs et même peut être après la fusion des endosomes avec le lysosome. Ce processus est responsable de la livraison des hydrolases au lysosome. L'arrivée de ces enzymes au sein de l'endosome précoce lui confère une première identité de dégradation, même si son pH n'est que légèrement acide (de l'ordre de 6).

Les endosomes précoces présentent un certain nombre de marqueurs moléculaires qui les différencient des endosomes tardifs. Ils sont par exemple porteurs des protéines Rab5 et EEA1. Rab5 est une GTPase qui régule de nombreux processus de la voie d'endocytose. Elle régule la fusion des vésicules d'endocytose avec les endosomes précoces, la fusion homotypique des endosomes précoces et est impliquée dans le processus de maturation en endosomes tardifs (Jovic et al., 2010). EEA1 est un effecteur de Rab5 impliqué dans la fusion homotypique des endosomes précoces. C'est le marqueur le plus utilisé d'identification des endosomes précoces (Jovic et al., 2010).

### 5.2.3. Les endosomes tardifs

#### 5.2.3.1. Formation

Les endosomes tardifs se forment à partir des domaines vésiculaires des endosomes précoces qui se séparent de la partie tubulaire. Cette scission est précédée par le remplacement de la protéine Rab5 présente à la membrane de l'endosome précoce par Rab7 (conversion de Rab) avec un passage par un endosome hybride exprimant à la fois Rab5 et Rab7. Cet échange est contrôlé par un complexe protéique HOPS (HOmotypic fusion and vacuole Protein Sorting complex) qui interagit avec Rab5 liée au GTP. Ce complexe contient la protéine VPS39 (Vacuolar Protein Sorting 39) qui possède une activité de facteur d'échange de nucléotides guanyliques (GEF pour Guanine nucleotide Exchange Factor) pour Rab7. Le mécanisme aboutissant au remplacement de Rab5 par Rab7 sur les endosomes se ferait par l'activation et le recrutement de Rab7 par Rab5-GTP via le complexe HOPS jusqu'à un niveau seuil de Rab7 activée à partir duquel un rétrocontrôle négatif s'enclenche. Ce rétrocontrôle impliquerait une protéine d'activation de la GTPase (GAP pour GTPase activation protein) pour Rab5 qui inactiverait Rab5 par hydrolyse du GTP. Une fois inactive, Rab5-GDP se dissocierait alors de ces effecteurs et donc de l'endosome qui n'exprimerait plus que Rab7 (Rink et al., 2005; Stenmark, 2009).

La manière dont la partie vésiculaire se dissocie du reste de l'endosome n'est pas clairement établie, mais il semble que ce soit par un mécanisme de fission soutenu par des moteurs moléculaires (la dynamine) associés aux microtubules (Huotari and Helenius, 2011).

Une fois cette partie vésiculaire décrochée de l'endosome précoce, elle migrerait le long des microtubules vers l'intérieur des cellules. Ces endosomes en migration renferment de grandes quantités de vésicules intraluminales et de membranes invaginées. La formation des endosomes tardifs à partir de ces vésicules n'est pas totalement élucidée. Deux hypothèses existent. Dans la première, les vésicules fusionneraient directement avec des endosomes tardifs stables. Dans la seconde, les vésicules fusionneraient entre elles pour devenir des endosomes tardifs (Huotari and Helenius, 2011).

#### 5.2.3.2. Rôle des endosomes tardifs

Les endosomes tardifs fonctionnent à la fois comme intermédiaires dans la voie de recyclage de molécules et comme intermédiaires dans le transport des composants du lysosome depuis le réseau *trans*-golgien. Ils participent au maintien, à la diversification et à l'expansion des systèmes de recyclage et de dégradation.

Ils contiennent peu de protéines destinées à être recyclées. Par contre ils contiennent un niveau élevé de molécules destinées aux lysosomes, qui sont soit de nouvelles protéines lysosomales (hydrolases, protéines membranaires) soit des molécules destinées à être dégradées. Enfin, ils contiennent plus de vésicules internes que les endosomes précoces et sont souvent décrits comme des corps multivésiculaires.

Ils sont typiquement ronds ou ovales et contiennent des protéines qui les différencient des endosomes précoces comme Rab7 et Rab11. Leur membrane contient des protéines lysosomales comme les protéines LAMPs (Lysosomal Associated Membrane Protein) et leur lumen contient des hydrolases acides. Leur pH est plus acide que celui des endosomes précoces, il est compris entre 5 et 6 (Huotari and Helenius, 2011).

#### 5.2.3.3. Fusion avec le lysosome

La livraison du matériel contenu dans les endosomes tardifs aux lysosomes demeure mécanistiquement incomplètement comprise et différentes théories ont été proposées (Figure 13). Elles incluent 1) la maturation des endosomes tardifs en lysosomes, 2) le transport vésiculaire depuis les endosomes vers les lysosomes, 3) des fusions transitoires (modèle dit du « kiss-and-run ») entre les lysosomes et les endosomes durant lesquels du matériel est transféré, 4) la fusion de l'endosome et du lysosome en un organite hybride et 5) la fusion-fission qui est une variante de la fusion directe et de la fusion transitoire dans lequel le lysosome se reforme à partir de l'organite hybride par fission (Luzio et al., 2007). Il semble toutefois que les échanges de matériel entre les endosomes et les lysosomes nécessitent un contact direct entre les deux organites et ne soient pas assurés par l'intermédiaire de vésicules (Huotari and Helenius, 2011). Des études utilisant la microscopie confocale sur cellules vivantes soutiennent à la fois le modèle de fusion transitoire (« kiss-and-run ») et le modèle de la fusion permanente. La fusion transitoire précèderait la fusion permanente des organites. De plus, des échanges de matériel entre les organites pourraient se faire via des tubules formés entre les endosomes tardifs et le lysosome (Bright et al., 2005).

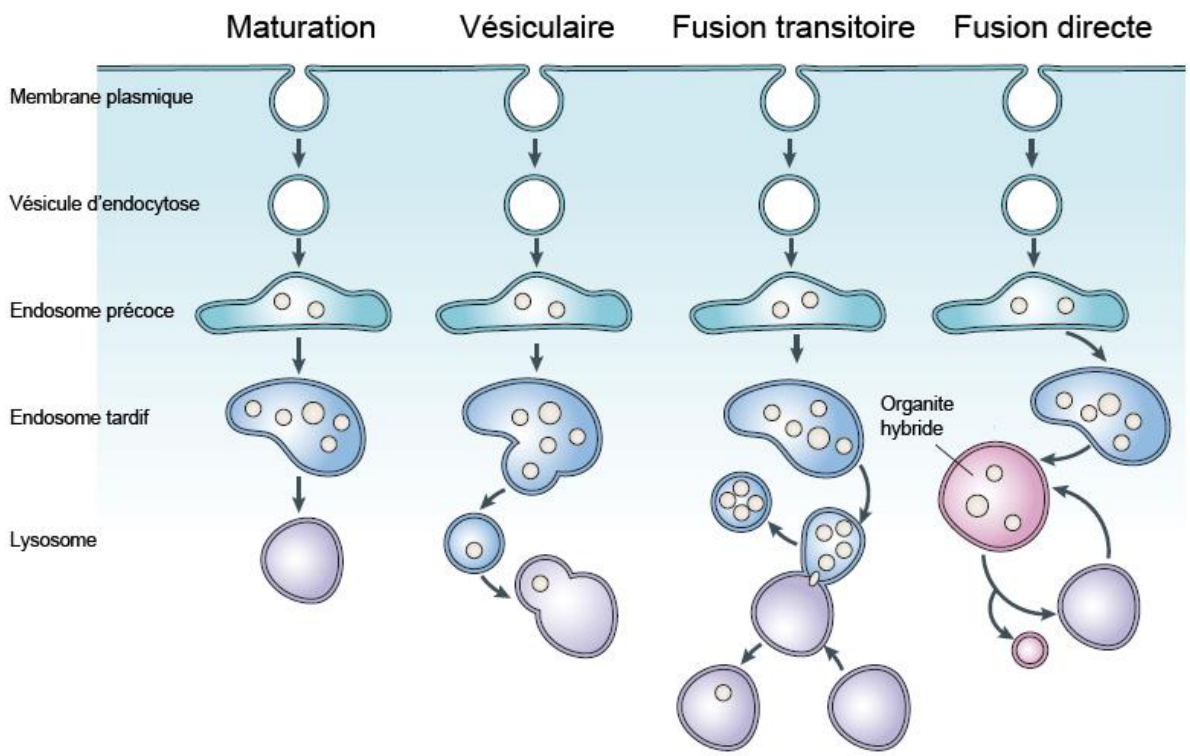



**Figure 13.** Fusion endo-lysosomale (Luzio et al., 2007).
Les endosomes tardifs vont délivrer leur contenu au lysosome pour qu'il soit dégradé. Différents modèles existent pour expliquer comment se fait cette livraison. Dans le premier modèle (maturation), les endosomes tardifs deviennent des lysosomes par un apport continu de composants lysosomiaux et par une disparition/récupération des composants de l'endosome. Dans le second modèle (vésiculaire), des vésicules bourgeonnent, depuis l'endosome tardif, qui vont apporter les molécules à dégrader au lysosome. Dans le troisième modèle (fusion transitoire), l'endosome tardif peut fusionner de manière transitoire et échanger une partie de son contenu avec le lysosome avant de se séparer puis de recommencer. Dans le dernier modèle, l'endosome et le lysosome peuvent fusionner pour former un hybride qui contient à la fois des composants du lysosome et de l'endosome. Par la suite, le lysosome se reforme par une exclusion sélective des composants de l'endosome.

### 5.2.4. Le lysosome

#### 5.2.4.1. Généralités

Les lysosomes sont des compartiments cellulaires séparés du cytoplasme par une membrane. Ils sont présents dans toutes les cellules eucaryotes. Ces organelles contiennent des hydrolases acides qui sont responsables de la dégradation des macromolécules. Les lysosomes se distinguent des endosomes par l'absence de récepteur au mannose-6-phosphate (M6PR) à leur surface. Ils ont été découverts en 1955 (De Duve et al., 1955) par des techniques de fractionnement, lors d'études sur la répartition des enzymes intracellulaires. La microscopie électronique a par la suite permis de mieux caractériser ces organelles. Elle a permis de savoir que les lysosomes constituent plus de 5% du volume intracellulaire et qu'ils ont des tailles, des morphologies et des contenus hétérogènes. Les lysosomes sont le compartiment terminal de dégradation de la voie d'endocytose. Ils sont également impliqués dans la dégradation de matériel cellulaire durant l'autophagie (Luzio et al., 2007).

#### 5.2.4.2. Fonctionnement

Ils contiennent 40 types d'hydrolases acides dont des protéases, des nucléases, des glycosidases, des lipases, des phospholipases, des phosphatases et des sulfatases. Pour que ces enzymes aient une efficacité optimale, elles nécessitent un environnement acide. Le pH du lysosome est maintenu entre 4.6 et 5 par des pompes ATPases présentes à la membrane. Cette nécessité d'un pH acide permet aux cellules d'être protégées des protéases puisque même en cas de rupture de la membrane du lysosome, les enzymes se retrouveraient dans le cytoplasme à un pH de 7.2 et leurs capacités de dégradation seraient limitées. La livraison des hydrolases acides aux lysosomes se fait après leur marquage dans le *cis*-Golgi avec un mannose-6-phosphate et leur fixation au récepteur de mannose-6-phosphate (M6PR) dans le réseau *trans*-golgien. Les hydrolases liées au M6PR sont alors délivrées aux endosomes tardifs, où l'acidité va provoquer leur dissociation du récepteur. Le récepteur est recyclé vers le réseau *trans*-golgien alors que les hydrolases sont dirigées vers le lysosome. Les protéines membranaires lysosomales nouvellement synthétisées ne nécessitent pas la fixation au M6PR pour transiter du réseau *trans*-golgien aux lysosomes. Elles peuvent être acheminées indirectement via la membrane plasmique ou directement en intracellulaire (Luzio et al., 2007).

Le transport des protéines destinées à la dégradation dans les lysosomes permet d'obtenir les produits de la digestion finale des macromolécules comme les acides

aminés, les sucres ou les nucléotides. Ces produits peuvent alors être transportés dans le cytosol où ils peuvent être réutilisés ou être excrétés par la cellule.

Le pH acide du lysosome nécessaire au fonctionnement des hydrolases est maintenu par une pompe à proton ($H^+$) située dans la membrane du lysosome. Elle utilise l'énergie produite par l'hydrolyse de l'ATP pour faire entrer les ions $H^+$ dans le lysosome. La plupart des protéines de la membrane lysosomale sont très fortement glycosylées ce qui les protège de l'action des protéases lysosomales.

Les lysosomes présentent une grande diversité morphologique. Cette diversité reflète la grande variété des fonctions digestives qu'ils assurent : destruction des débris intra et extracellulaires, destruction de micro-organismes phagocytés et production de nutriments. Pour toutes ces raisons, les lysosomes sont parfois vus comme une collection hétérogène d'organelles distinctes qui ont comme caractéristique commune une grande concentration d'enzymes hydrolytiques (Luzio et al., 2007).

#### 5.2.4.3. Voies de dégradation

Les lysosomes sont un point de convergence de plusieurs voies de trafic intracellulaire. Les enzymes de digestions sont acheminées au lysosome par une route partant du RE, passant par l'appareil de Golgi, puis par les endosomes. Les substances devant être digérées peuvent suivre différentes voies en fonction de leurs origines.

La mieux étudiée de ces trois voies de dégradation dans le lysosome est celle qui suit l'endocytose des macromolécules du milieu extracellulaire détaillée précédemment. Les molécules endocytées sont initialement délivrées par des vésicules aux endosomes précoces. Quelques unes de ces molécules internalisées sont sélectivement redirigées et recyclées vers la membrane plasmique alors que les autres passent dans les endosomes tardifs. C'est là que le matériel endocyté rencontre pour la première fois les hydrolases lysosomales qui sont délivrées à l'endosome en provenance de l'appareil de Golgi. L'intérieur de l'endosome a un pH moyennement acide (pH~6) et c'est un lieu où débute la digestion des molécules endocytées. La formation des lysosomes matures à partir des endosomes tardifs s'accompagne d'une diminution du pH interne. Les lysosomes se formeraient par un processus de maturation progressif durant lequel les protéines de la membrane endosomale sont progressivement redirigées par des vésicules vers les endosomes ou vers le réseau *trans*-golgien depuis le lysosome en développement.

Une seconde voie de dégradation impliquant le lysosome, utilisée dans tous les types cellulaires pour disposer du matériel cellulaire obsolète, est un processus

appelé autophagie. Dans les cellules du foie par exemple, les mitochondries ont une demi-vie d'environ dix jours et des images de microscopie électronique de cellules normales montrent que les lysosomes contiennent des mitochondries en cours de digestion ainsi que d'autres organelles. Ce processus commence par l'enfermement des organelles dans des membranes créant ainsi un autophagosome qui fusionne ensuite avec un lysosome (ou avec un endosome tardif). Ce processus est fortement régulé dans les cellules et les composants cellulaires à éliminer doivent être en quelque sorte marqués pour une destruction par le lysosome. Par exemple pour la l'autophagie des mitochondries, celles-ci doivent être marquées par la protéine BNIP3L (BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3-like)/Nix (Wirawan et al., 2012).

La troisième voie de dégradation se produit dans des cellules spécialisées. Il s'agit de la phagocytose. Les cellules (macrophages ou neutrophiles) vont endocyter des microorganismes dans un phagosome qui fusionnera par la suite avec les lysosomes afin de digérer les objets phagocytés.

Après la fusion du lysosome avec un autre organite qui donne naissance à un hybride, le lysosome pourrait se reformer.

#### 5.2.4.4. Conclusion

La voie endo-lysosomale est particulièrement importante pour le fonctionnement normal des cellules. Sa dérégulation est associée avec de nombreuses pathologies. A côté des maladies lysosomales qui ont été décrites au Chapitre 2, un certain nombre d'éléments indiquent que les lysosomes sont également impliqués dans les cancers (Fehrenbacher and Jäättelä, 2005), dans les maladies auto-immunes (De Carvalho Bittencourt et al., 2005), dans l'arthrite (Salminen-Mankonen et al., 2007), ou dans la maladie d'Alzheimer (Nixon and Cataldo, 2006).

# 6. Les cellules souches pluripotentes induites.

## *6.1. Les cellules souches – définition*

Les cellules souches sont définies par deux caractéristiques principales. La première est leur capacité à s'auto-renouveler, c'est à dire que les cellules souches ont théoriquement la capacité de se diviser de manière illimitée et ce physiologiquement contrairement aux cellules cancéreuses qui acquièrent cette propriété au cours d'un processus pathologique. Ce mécanisme implique que les cellules souches se divisent de façon à donner au moins une cellule fille identique à la cellule d'origine c'est-à-dire en conservant les propriétés génétiques et épigénétiques de la cellule mère. La seconde caractéristique des cellules souches est leur capacité à former des cellules spécialisées par un processus de différenciation. Leur potentiel de différenciation est généralement utilisé afin de définir différents types de cellules souches.

Il existe donc différentes catégories de cellules souches (Figure 14). Celles qui ont la plus grande capacité de différenciation sont dites totipotentes. Ce sont les cellules qui sont capables de produire tous les lignages embryonnaires (endoderme, mésoderme et ectoderme) ainsi que les lignages extra-embryonnaires (placenta et cordon ombilical). Ces cellules ne sont présentes que lors des tout premiers stades du développement et elles correspondent au zygote ou aux cellules de la morula.

Les cellules dites pluripotentes sont capables de produire l'ensemble des lignages embryonnaires, y compris les lignées germinales, mais pas les annexes extra-embryonnaires. Ce sont typiquement les cellules souches embryonnaires qui sont isolées à partir de la masse cellulaire interne du blastocyste.

Ces deux types de cellules souches totipotentes et pluripotentes sont capables de générer l'ensemble des cellules d'un organisme, plus de 200 types différents chez l'homme. Mais cet important potentiel de différenciation est rapidement restreint au cours du développement.

Les cellules souches présentes chez l'embryon après le stade de blastocyste, chez le fœtus ou chez l'adulte sont capables de s'auto-renouveler, mais elles sont déjà engagées dans une voie de différenciation. Chez l'adulte, ces cellules constituent un réservoir permettant de renouveler un tissu, ou de le réparer après une lésion. Chez le fœtus, elles participent à l'organogénèse et sont déjà orientées. Ces cellules sont, en général, dites multipotentes lorsqu'elles sont capables de produire au moins quatre progénies cellulaires distinctes. Les termes unis, bi ou tripotentes sont parfois utilisés pour définir des cellules souches présentant des capacités de différenciation restreintes à une, deux ou trois progénies cellulaires. Parmi les cellules multipotentes

on peut citer les cellules souches mésenchymateuses ou les cellules souches hématopoïétiques chez l'adulte, et les cellules de la crête neurale chez l'embryon ou encore les cellules de la zone sous ventriculaire (ZSV). Par exemple, les cellules de la ZSV qui sont présentent chez l'adulte sont capables *in vitro* de former des neurones, des astrocytes ou des oligodendrocytes (Reynolds and Weiss, 1992). Un point important est que ces cellules multipotentes sont déjà engagées dans une voie de différenciation au sein de l'un des trois feuillets embryonnaires et qu'elles restent dans cette voie.

D'autres cellules souches ont des capacités de différenciation plus restreintes, c'est-à-dire capables de donner deux ou trois progénies cellulaires. C'est par exemple le cas des cellules souches chondro-ostéogéniques de la moelle osseuse ou des cellules souches du bulbe folliculaire du cheveu. Enfin, certaines cellules souches sont appelées unipotentes, celles-ci ne sont capables de former qu'un seul type de cellules spécialisées. C'est le cas par exemple des cellules satellites du muscle squelettique qui permettent la régénération partielle du muscle ou encore des cellules de l'épithélium basal de la muqueuse intestinale responsables de l'auto-renouvellement rapide du tissu tapissant le tube digestif.

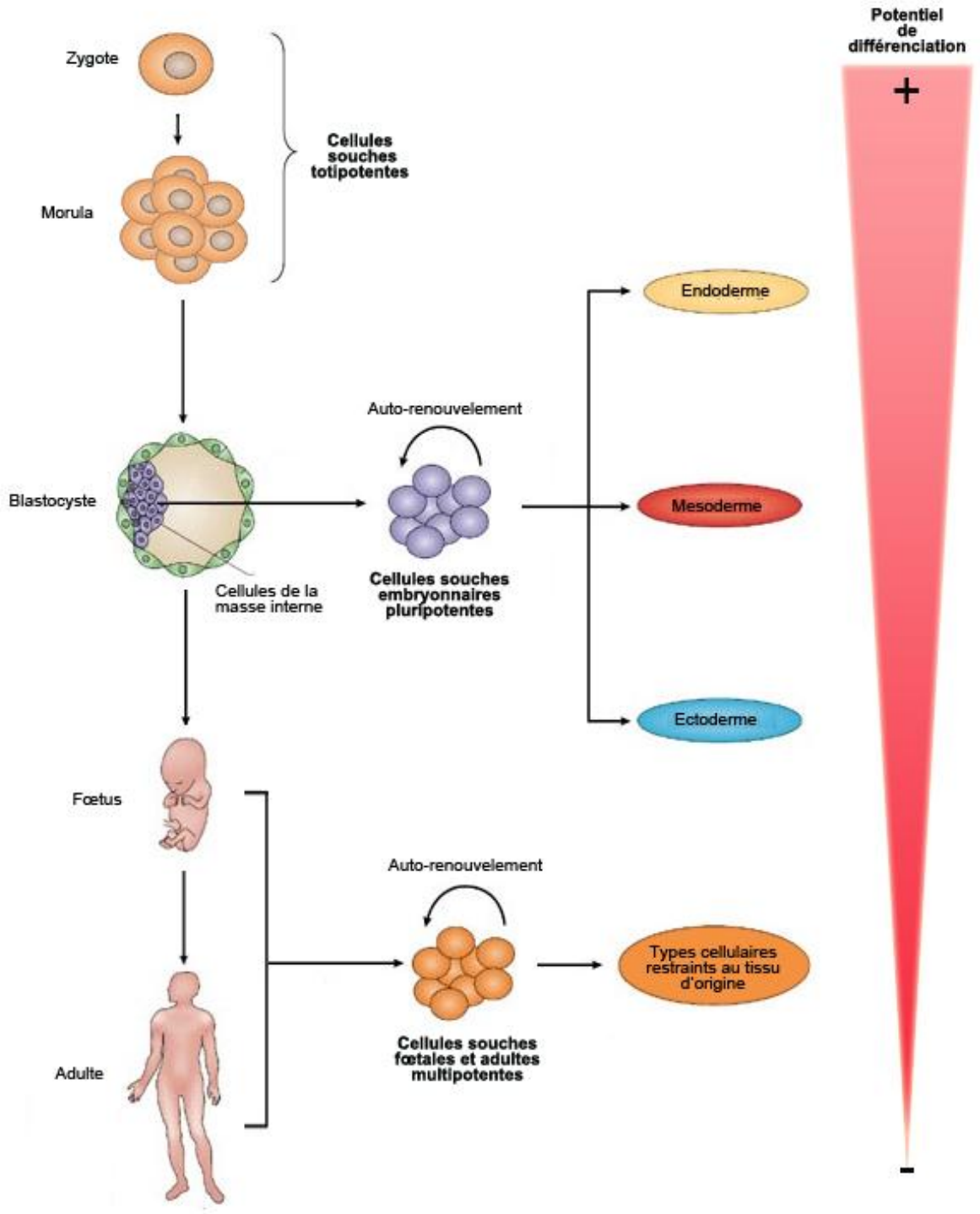



**Figure 14.** Les différents types de cellules souches et leur capacité de différenciation (adapté de http://svt.ac-dijon.fr). Les cellules totipotentes ne sont présentes qu'aux tout premiers stades du développement (du zygote à la morula). Dès le stade blastocyste, les cellules ont commencé à perdre un peu de leur capacité de différenciation. C'est à ce stade que sont isolées les cellules de la masse interne qui vont donner les cellules ES. Ces cellules sont pluripotentes. Au cours du développement, la capacité de différenciation des cellules se restreint encore. Chez les fœtus comme chez l'adulte, on trouve des cellules multipotentes mais plus pluripotentes.

## *6.2. Les cellules souches embryonnaires (cellules ES)*

### 6.2.1. Historique et contexte

Les premières lignées de cellules ES ont été établies chez la souris. Elles ont été dérivées de la masse cellulaire interne de l'embryon au stade blastocyste (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981). Elles sont communément utilisées pour générer des lignées de souris génétiquement modifiées et pour étudier le développement des mammifères.

La première lignée humaine a été établie en 1998 (Thomson et al., 1998) et a tout de suite suscité de nombreux espoirs en termes d'applications biologiques et médicales. Depuis 1998, la recherche sur ces cellules n'a cessé de se développer notamment en raison de leur potentiel thérapeutique et de leur intérêt en recherche en biologie du développement.

Néanmoins, les problèmes éthiques soulevés par l'utilisation expérimentale de ces cellules ont fait que de nombreux pays ont mis en place des législations limitant voire interdisant l'exploitation en recherche de ces cellules. En France, ce n'est qu'en 2004 que quelques équipes ont pu bénéficier de dérogations afin de pouvoir travailler avec ces cellules. Aujourd'hui, la recherche sur ces cellules reste interdite en France, sauf dérogation et uniquement « lorsqu'elles sont susceptibles de permettre des progrès thérapeutiques majeurs et à la condition que ces recherches ne puissent être poursuivies par une méthode alternative d'efficacité comparable, en l'état des connaissances scientifiques » (Loi de bioéthique du 7 juillet 2011).

Cette législation très contraignante limite fortement la possibilité d'utiliser ces cellules dans le cadre de projets de recherche.

### 6.2.2. Comparaison des cellules ES murines et humaines

#### 6.2.2.1. Caractéristiques moléculaires

Les cellules ES murines et humaines partagent de nombreuses caractéristiques. Elles présentent toutes les deux de fortes activités de certaines enzymes comme celle de la phosphatase alcaline et de la télomérase. De nombreux marqueurs ont pu être définis afin de caractériser les cellules ES. Ces marqueurs peuvent être des molécules de surface ou des protéines impliquées dans le maintien de la

pluripotence des cellules. Ces marqueurs sont exprimés dans la masse cellulaire interne du blastocyte ainsi que dans les cellules ES. Mais certains d'entre eux peuvent être ré-exprimés au cours du développement dans d'autres types cellulaires. Néanmoins ils permettent de bien caractériser les cellules ES. Bien que les cellules murines et humaines partagent l'expression de nombre de ces marqueurs, certains sont spécifiques d'espèce.

#### 6.2.2.2. Marqueurs de surface

Depuis l'isolement des cellules ES murines, de nombreux marqueurs membranaires ont pu être identifiés. Ils permettent de distinguer les cellules ES d'autres types cellulaires comme les cellules différenciées qu'elles peuvent former.

Parmi les marqueurs fréquemment utilisés pour identifier les cellules ES murines on peut citer le glycolipide SSEA-1 (Stage-Specific Embryonic Antigen-1) ainsi que diverses protéines comme l'ostéopontine, ou le CD9 (voir Tableau 4). Le glycolipide SSEA-1 est retrouvé sur la membrane des cellules de la masse cellulaire interne du blastocyste de souris et jouerait un rôle dans l'adhésion cellule-cellule (Koestenbauer et al., 2006). Il est sans doute le marqueur membranaire le plus utilisé. Une autre protéine fortement exprimée dans les cellules ES est l'ostéopontine. Cette protéine est également exprimée dans le tissu osseux. L'expression de l'ostéopontine est détectée dans les cellules de la masse cellulaire interne du blastocyste, puis diminue lorsque les cellules commencent à se différencier (Koestenbauer et al., 2006). Il a été montré que le gène codant cette protéine était l'une des cibles des facteurs de transcription OCT4 (Octamer-Binding Transcription factor 4) et SOX2 (SRY-Sex determining region Y-box2) qui sont particulièrement importants dans le maintien de la pluripotence des cellules ES. Cette protéine serait impliquée dans l'adhérence et la migration des cellules (Koestenbauer et al., 2006).

Alors que les cellules ES murines expriment le glycolipide SSEA-1 à leur membrane, les ES humaines ne l'expriment pas et expriment les glycolipides SSEA-3 et SSEA-4. Chez l'homme SSEA-1 est un marqueur associé à la différenciation trophoblastique. Les molécules SSEA-3 et SSEA-4 sont exprimées par les cellules de la masse cellulaire interne du blastocyste humain mais leurs fonctions restent indéterminées. L'expression de ces marqueurs est détectée chez la souris (mais à des stades plus précoces que chez l'homme) sur les ovocytes non fécondées et chez l'embryon durant les premières divisions.

D'autres marqueurs ont été détectés à la surface des cellules ES humaines et notamment, les antigènes TRA-1-60 et TRA-1-81 (Tumor Rejection Antigen). Ces marqueurs sont des kératanes sulfates associés à la membrane de la cellule

(Badcock et al., 1999). Ils sont exprimés dans la masse cellulaire interne du blastocyste. Leurs fonctions restent mal connues. Les anticorps dirigés contre TRA-1-60 et TRA-1-81 ne marquent pas les cellules ES murines. Il n'est pas clairement défini si cette absence de marquage est due à l'absence de ces protéoglycanes à la surface cellulaire, ou si les anticorps présentent une spécificité d'espèce (Friel et al., 2005; Koestenbauer et al., 2006). Les cellules ES humaines expriment également d'autres marqueurs comme le CD9, GTCM2 ou l'ostéopontine (voir Tableau 4).

#### 6.2.2.3. Facteurs de transcription

De nombreux facteurs de transcription sont exprimés par les cellules ES murines et humaines tels que Oct4, Sox2, Nanog, Rex1, FoxD3 ou encore Crypto (voir Tableau 4) (Friel et al., 2005; Koestenbauer et al., 2006).

Le facteur de transcription Oct4 (Oct3/4, Oct3 ou POU5f1) est l'un des plus utilisé afin d'identifier les cellules ES, notamment car c'est l'un des facteurs de transcription les plus important dans le maintien de la pluripotence des cellules (Friel et al., 2005). Cette protéine fait partie de la famille des facteurs de transcription POU. Oct4 influence de nombreux gènes exprimés au cours du développement comme Sox2, Fgf4, Rex1, hCG et Utf1. Son expression durant le développement débute au stade 4 à 8 cellules. Par la suite, il est exprimé par les cellules de la masse cellulaire interne puis dans les cellules de la lignée germinale (Koestenbauer et al., 2006).

Un autre facteur de transcription très important pour le maintien de la pluripotence des cellules ES est SOX2. Le gène de SOX2 fait partie de la famille des gènes SOY (Sry related HMG box containing). Cette famille de gènes contient un domaine HMG permettant des interactions avec les domaines POU. Il est exprimé dans les cellules des embryons murins aux stades préimplantatoires et dans les cellules ES murines. Plus tard dans le développement, SOX2 est co-exprimé avec Oct4 dans les cellules germinales. Les facteurs de transcription SOX2 et Oct4 agissent de manière synergique. Suivant les cas, SOX2 va favoriser ou réprimer l'expression de gènes contrôlés par Oct4. Par exemple, dans le cas de l'ostéopontine, il a été montré que SOX2 réprimait la transactivation du gène de l'osteopontine par Oct4 alors que dans le cas du Fgf4, SOX2 favorisait la transactivation du gène Fgf4 par Oct4 (Koestenbauer et al., 2006).

Le facteur de transcription Nanog fait également partie des gènes dont l'expression est utilisée pour définir les cellules ES. L'expression de Nanog dans l'embryon commence au stade morula, puis se poursuit dans les cellules de la masse cellulaire interne du blastocyste. Elle est également observée dans les cellules germinales

précoces. Nanog, comme Oct4 participe au maintien de l'état indifférencié des cellules (Friel et al., 2005).

| | | ES murines | ES humaines |
|---|---|---|---|
| Marqueur membranaire | SSEA-1 | + | - |
| | SSEA-3 | - | + |
| | SSEA-4 | - | + |
| | TRA-1-60 | - | + |
| | TRA-1-81 | - | + |
| | GCTM2 | - | + |
| | CD9 | + | + |
| | Ostéopontir | + | + |
| | | ES murines | ES humaines |
| Gène et facteurs de transcritions | Oct-4 | + | + |
| | Sox2 | + | + |
| | Fgf4 | + | + |
| | Utf1 | + | + |
| | Rex-1 | + | + |
| | Fox-D3 | + | + |
| | Cripto | + | + |
| | Nanog | + | + |
| | mGDF3 | + | + |
| | Fbx15 | + | |

**Tableau 4.** Les caractéristiques moléculaires des cellules ES murines et humaines.

#### 6.2.2.4. Caractéristiques fonctionnelles

Au niveau fonctionnel, les cellules ES murines et humaines ont la capacité de former l'intégralité des cellules de l'organisme.

Elles peuvent former *in vitro* les trois feuillets embryonnaires ce qui en général consiste à induire la formation de corps embryonnaires (Embryoid Bodies : EB). Les EB sont au départ des agrégats tridimensionnels de cellules ES au sein desquels elles vont se différencier spontanément. Ce procédé est fréquemment utilisé pour vérifier la pluripotence des cellules utilisées, ainsi que dans des protocoles de différenciation contrôlée, comme par exemple la différenciation en neurones.

Les cellules ES peuvent également former les trois feuillets embryonnaires *in vivo*. L'un des procédé utilisé pour obtenir cette différenciation est la greffe de cellules ES dans des souris immunodéficientes. Après quelques semaines, les cellules ES se différencient et forment un tératome contenant les trois feuillets. Ce processus est généralement utilisé afin de s'assurer du caractère pluripotent d'une lignée de

cellules. Ce test fonctionnel est le meilleur test possible pour les cellules ES humaines.

Pour les cellules ES murines, d'autre tests de pluripotence sont possibles. Ils consistent à injecter les cellules à l'intérieur de la masse cellulaire interne de blastocystes. Dans ces conditions, les cellules ES vont participer au développement de souris chimères, et peuvent participer à la formation de la lignée germinale. Cette méthode peut non seulement être utilisée afin de contrôler le caractère pluripotent d'une lignée, mais elle est également utilisée afin de générer des souris transgéniques.

#### 6.2.2.5. Cellules epiSC murines et cellules ES humaines.

Récemment des lignées de cellules souches pluripotentes murines ont été établies à partir de l'épiblaste après l'implantation des embryons (stade embryonnaire E5,5 à E6,5). Elles sont appelées EpiSC (epiblast stem cell). Ces cellules différent de manière significative des ES murines mais partagent des caractéristiques clés avec les cellules ES humaines (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007). La dérivation des EpiSC échoue en présence de LIF et de BMP4, deux facteurs nécessaires à la dérivation et à l'auto-renouvellement des ES murines. Par contre, comme pour les cellules ES ou iPS humaines, les voies de signalisation du bFGF et de l'Activine/Nodal sont nécessaires pour leur dérivation. De plus, tout comme les cellules ES humaines, leur taux de survie en unicellulaire est très faible et, elles forment des colonies qui sont morphologiquement très proches de celles formées par les cellules ES humaines (Figure 15) (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007). Le patron d'expression génique des EpiSC reflète leur origine post-implantatoire épiblastique et diffère de celui des ES murines. Bien que les cellules EpiSC soient capables de s'auto-renouveler et capables de former les trois feuillets embryonnaires *in vitro* comme *in vivo* en formant des tératomes, aucune souris chimérique n'a été obtenue en injectant ces cellules dans des blastocystes (Tesar et al., 2007), suggérant que leur degré de pluripotence est moindre que celui des cellules ES murines.

Un point intéressant est que des cellules ES humaines et des cellules iPS humaines ont pu être « ramenées » à un stade équivalent à celui des cellules ES murines (Hanna et al., 2010). Il semble que les cellules ES murines soient à un stade de cellules souches naïves contrairement aux cellules EpiSC et aux cellules ES et iPS humaines. Les cellules ES ou iPS humaines « ramenées » au stade des cellules ES murines sont maintenant définies comme des cellules ES ou iPS humaines naïves. Ces résultats viennent d'être confirmés par deux autres groupes (Hirai et al., 2012; Nishishita et al., 2012).

Le fait que les EpiSC murines semblent être à un même stade de pluripotence que les cellules ES ou iPS humaines indiquerait que les cellules ES humaines ont une pluripotentialité moindre que les cellules ES murines. De plus amples études des cellules ES naïves pourraient permettre de déterminer si effectivement leur pluripotentialité est plus élevée que celles de cellules ES « engagées ». Une compréhesion plus complète des éléments distinguant cellules ES naïves et engagées pourrait avoir des conséquences importantes en vue d'utilisation médicale future de ces cellules.

### 6.2.3. Intérêts en recherche des cellules ES humaines

L'un des intérêts des cellules ES humaines est leur capacité à former des cellules différenciées. Il est possible d'obtenir *in vitro* des cellules humaines à des stades différents de différenciation jusqu'à des cellules spécialisées comme des neurones. Il existe aujourd'hui de nombreux protocoles permettant la différenciation contrôlée de ces cellules. Ils permettent d'obtenir des populations enrichies dans les cellules d'intérêt et donc de disposer en culture de cellules autrement inaccessibles chez l'homme, comme les neurones.

Il a donc été envisagé très vite de modéliser des maladies génétiques humaines à partir de cellules ES présentant une mutation. Ces modèles permettraient d'étudier la physiopathologie de la maladie, de pouvoir mettre au point des systèmes de criblage de drogues sur des cellules humaines ou encore de rechercher des biomarqueurs de la maladie. Mais pour générer de tels modèles, il faut obtenir des embryons présentant des mutations génétiques. En France les embryons dont l'utilisation est autorisée pour générer une lignée de cellules ES humaines sont ceux issus de diagnostic préimplantatoire (DPI). Les maladies génétiques pouvant être modélisées sont donc limitées aux maladies pour lesquelles un DPI est effectué, ce qui limite fortement le nombre de maladies pouvant être modélisées. A défaut, des techniques permettant de modifier génétiquement les lignées de cellules ES ont été développées. Mais, bien que ces techniques fonctionnent, elles restent difficiles à mettre en œuvre et sont peu efficaces. Aujourd'hui, 14 maladies ont pu être modélisées à l'aide des cellules ES humaines, pour trois d'entre elles un phénotype a pu être décrit (Maury et al., 2012)

### 6.2.4. Conclusion

Les cellules ES humaines présentent donc un grand intérêt pour étudier le développement de l'embryon, ainsi que pour développer des modèles de pathologie. Néanmoins les problèmes éthiques qu'elles soulèvent et les législations qui en découlent limitent aujourd'hui fortement leur utilisation. Le besoin de pouvoir accéder à des cellules souches pluripotentes présentant des défauts génétiques a poussé à rechercher des sources alternatives de cellules pluripotentes.

De nouvelles méthodes permettant d'obtenir des cellules souches pluripotentes à partir de cellules somatiques ont été développées (Figure 16). La première méthode est celle du transfert nucléaire. Elle consiste à transférer le noyau d'une cellule somatique dans un ovule. Ce procédé permet d'obtenir des cellules souches pluripotentes (Byrne et al., 2007) mais, à ce jour, ce procédé ne fonctionne que chez la souris. De plus, cette technique s'apparentant au clonage, son application avec des cellules humaines est interdite dans de nombreux pays.

La seconde technique consiste à fusionner une cellule somatique avec une cellule souche embryonnaire. Les cellules obtenues sont alors pluripotentes, mais celles-ci sont tétraploïdes (Cowan et al., 2005; Yu et al., 2006). De plus cette méthode nécessitant des cellules ES soulève donc les mêmes problèmes éthiques.

Enfin, une troisième technique a été développée en 2006 chez la souris, puis appliquée en 2007 à des cellules humaines. En 2006, l'équipe du Professeur Shinya Yamanaka (Takahashi and Yamanaka, 2006) a mis au point une technique permettant de faire revenir des cellules différenciées à l'état de cellules souches pluripotentes. Ces cellules ont été baptisées cellules souches pluripotentes induites (cellules iPS : induced pluripotent stem cells). En 2007, deux groupes, dont le leur, ont appliqué la même méthode avec succès à des cellules humaines (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007). Cette technique a permis de reprogrammer des cellules somatiques humaines adultes en cellule souches pluripotentes. Le procédé utilisé ne nécessite ni embryon, ni ovule. Il n'implique donc pas la destruction d'embryons, ni l'utilisation de techniques se rapprochant du clonage. Les problèmes éthiques liés à ces cellules sont donc moins nombreux, même si la potentielle génération de gamètes à partir de ces cellules soulève certains problèmes, tout comme la protection des informations potentiellement acquises relatives au patrimoine génétique des patients. Ces cellules iPS présentent des caractéristiques similaires à celle des cellules souches embryonnaires (ES) : capacité de s'auto-renouveler et de former tous les types cellulaires de l'organisme.

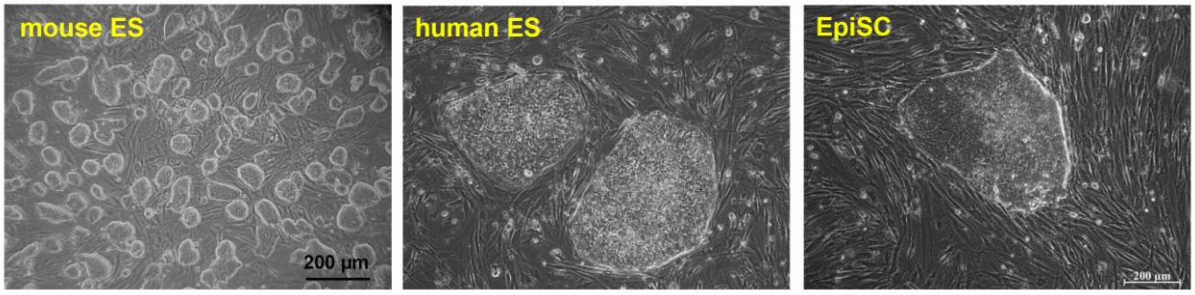



**Figure 15.** Morphologie des colonies de cellules ES murines (mouse ES), de cellules ES humaines (human ES) et de cellules épiblastiques murines (EpiSC) (Tesar et al., 2007).

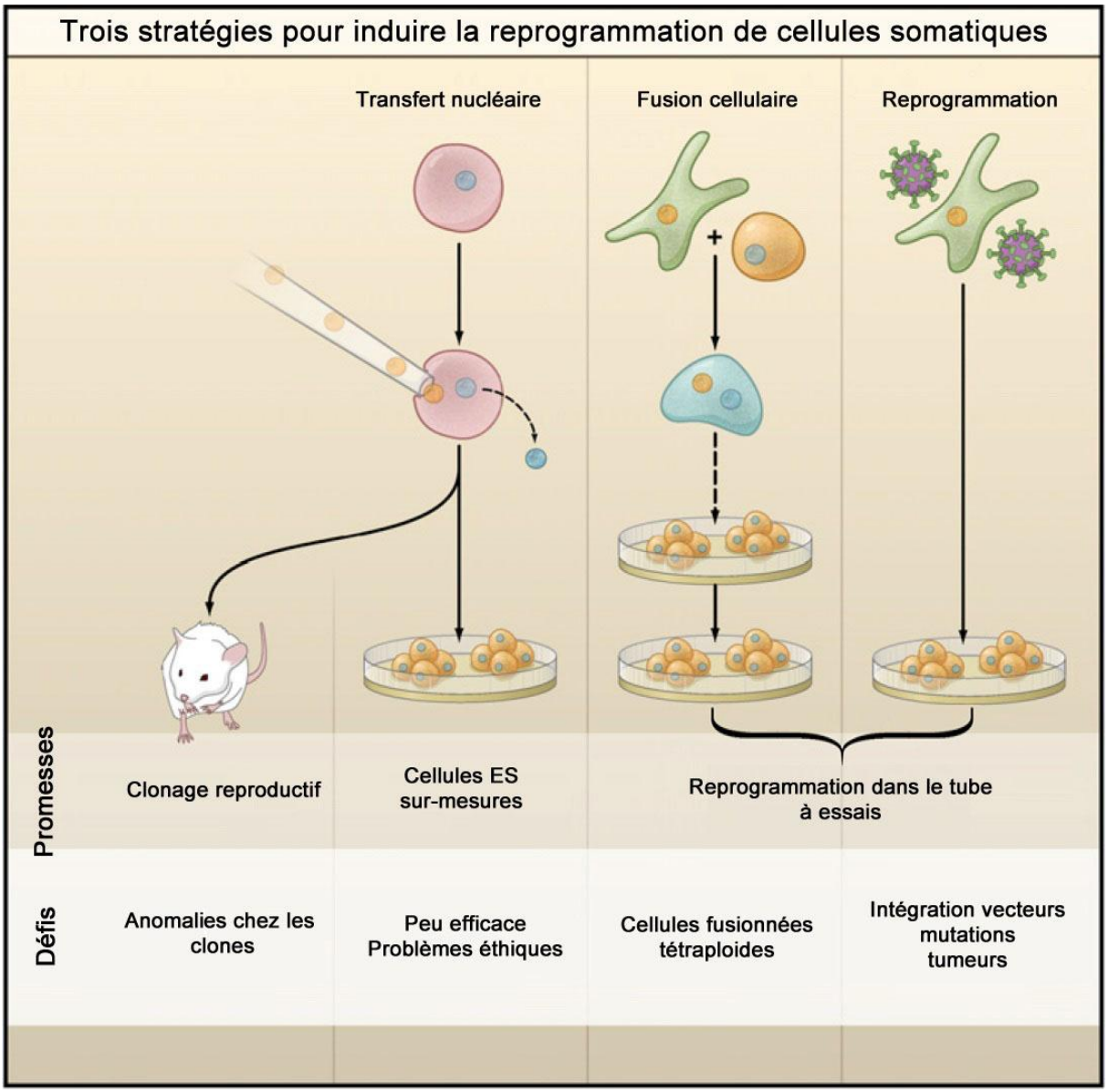



**Figure 16.** Les différentes techniques permettant l'obtention de cellules souches pluripotentes (Jaenisch and Young, 2008). Ces différentes stratégies comprennent le transfert nucléaire, la fusion cellulaire et la reprogrammation cellulaire.

## *6.3. Les cellules souches pluripotentes induites*

### 6.3.1. Origine/Découverte

Les cellules souches pluripotentes induites ont été générées pour la première fois en 2006 à partir de fibroblastes murins embryonnaires et adultes par le groupe du professeur Shinya Yamanaka (Takahashi and Yamanaka, 2006). Afin de faire « revenir » des cellules somatiques au stade de cellules souches pluripotentes, cette équipe a tout d'abord cherché à identifier les gènes impliqués dans le maintien de la pluripotence et dans l'auto-renouvellement des cellules ES murines. Cette étude a permis de sélectionner 24 gènes. L'expression individuelle de ces gènes dans des fibroblastes murins n'a pas permis d'obtenir la reprogrammation de ces cellules. Par contre, l'expression simultanée de ces 24 gènes a conduit à l'apparition de cellules présentant une morphologie similaire à des cellules ES murines et qui exprimaient le facteur de transcription Fbx15 qui est spécifique de ces cellules. Finalement, quatre gènes ont pu être identifiés comme étant suffisants pour induire le processus de reprogrammation, ce sont les gènes Oct4, Sox2, Klf4 et C-Myc.

Les cellules obtenues par cette technique présentaient des caractéristiques similaires à celles des cellules ES en terme de morphologie, d'expression de marqueurs de surface et de facteurs de transcription. Elles étaient capables tout comme les cellules ES, de s'auto-renouveler, et surtout de se différencier *in vitro* et *in vivo* vers les trois feuillets embryonnaires (Takahashi and Yamanaka, 2006). De plus ces cellules étaient capables de participer au développement de souris chimériques lorsqu'elles étaient injectées dans la masse cellulaire interne d'un blastocyste de souris et pouvaient participer à la génération des cellules de la lignée germinale (Okita et al., 2007).

En 2007, plusieurs autres groupes ont reproduit ces expériences et ont généré des cellules iPS à partir de fibroblastes murins (Blelloch et al., 2007; Maherali et al., 2007a; Meissner et al., 2007; Wernig et al., 2007). Parmi ces groupes, celui de Maherali et col. a montré que les iPS générées à partir de souris femelles réactivaient leur chromosome X au cours de la reprogrammation, puis, qu'il y avait une inactivation au hasard de l'un de leurs chromosomes X lorsque les iPS étaient différenciées, indiquant que la reprogrammation s'était faite de manière efficace au niveau épigénétique.

Cette technique de reprogrammation en cellule iPS a été appliquée en 2007 à des cellules humaines (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007). De la même manière que chez la souris, les iPS humaines présentaient les mêmes caractéristiques que les cellules ES humaines au niveau morphologique, dans leur expression de marqueurs membranaires ou de facteurs de transcription. Enfin, elles étaient capables de former

les trois feuillets embryonnaires *in vitro* comme *in vivo* après injection dans des souris immunodéficientes.

### 6.3.2. Caractéristiques

Les cellules iPS murines ou humaines présentent des caractéristiques similaires à celles des cellules ES murines ou humaines, respectivement, aux niveaux morphologique, moléculaire et fonctionnel. Ces caractéristiques permettent de les définir comme cellules souches pluripotentes et sont utilisées pour valider les clones d'iPS isolés suite à la reprogrammation.

Au niveau morphologique, comme les cellules ES de souris, les cellules iPS murines forment des colonies rondes en forme de dôme qui sont fortement réfringents (Figure 17). Elles présentent un gros nucléole et ont un cytoplasme peu abondant. Au niveau moléculaire, elles expriment le marqueur membranaire SSEA1 ainsi que les facteurs de transcription spécifiques des cellules ES comme Oct4, Nanog ou encore Sox2. Ces cellules expriment également fortement la phosphatase alcaline et la télomérase. Enfin, au niveau fonctionnel elles sont capables de se différencier vers les trois feuillets embryonnaires (Takahashi and Yamanaka, 2006). Les cellules iPS murines peuvent, une fois injectées dans un blastocyste, participer au développement de souris chimériques . Elles peuvent au sein de ces souris participer à la formation des cellules germinales. Le croisement de telles souris peut permettre d'obtenir des animaux qui possèdent un génome issu uniquement des cellules iPS de départ, montrant que ces cellules sont réellement pluripotentes (Okita et al., 2007). Néanmoins, il a été montré que ces souris avaient tendance à développer des tumeurs, sans doute provoquées par la réactivation des gènes de facteurs transcriptionnels intégrés dans le génome des cellules iPS et notamment de c-Myc (Okita et al., 2007). Enfin, des souris ont été générées à partir de cellules iPS par compensation tétraploïde (Zhao et al., 2009). Pour ce faire, les cellules iPS ont été injectées dans un blastocyste tétraploïde, qui n'est pas capable de former les cellules de la masse interne. Les cellules iPS injectées dans ces blastocystes sont capables de former un embryon si elles sont pluripotentes. Cette expérience a montré que les cellules iPS murines étaient réellement pluripotentes et capables de former un nouvel organisme.

Au niveau morphologique les cellules iPS humaines forment des colonies rondes plus aplaties que les colonies de cellules ES murins (Figure 17). Elles présentent un gros noyau avec un nucléole important et un cytoplasme peu abondant. Au niveau moléculaire, elles expriment les marqueurs de surface SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 et TRA-1-81. Les cellules expriment également les facteurs de transcription qui sont caractéristiques des cellules ES humaines comme OCT4, SOX2 et NANOG. De plus,

ces cellules expriment fortement la phosphatase alcaline et la télomérase. Enfin, au niveau fonctionnel les iPS humaines sont capables de former l'ensemble des types cellulaires de l'organisme *in vitro* comme *in vivo* après injection dans des souris immunodéficientes (Takahashi et al., 2007).

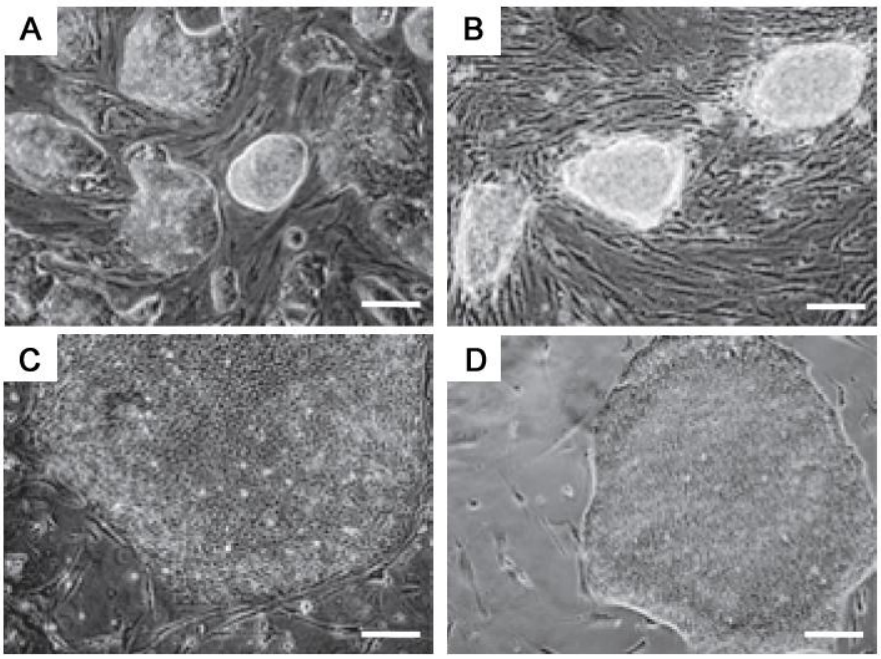



**Figure 17.** Morphologie des cellules ES et iPS (Robinton and Daley, 2012). A : colonie de cellules ES murines. B : colonie de cellules iPS murines. C : colonie de cellules ES humaines. D : colonie de cellules iPS humaines.

### 6.3.3. Génération

Dans les études originales, pour induire le processus de reprogrammation, les fibroblastes ont été transduits à l'aide de vecteurs rétroviraux dérivés du virus de la leucémie murine de Moloney (MMLV : Moloney murine leukemia virus). Les MMLV sont des rétrovirus. Une fois qu'ils ont infecté les cellules, le génome qu'ils contiennent sous forme d'ARN va être rétrotranscrit en ADN puis intégré dans le génome des cellules infectées lorsque celles-ci se divisent. Pour reprogrammer les cellules, quatre vecteurs rétroviraux défectifs pour la réplication ont été utilisés. Ils ont permis d'induire l'expression des facteurs OCT4, SOX2, KLF4 et c-MYC. Après la transduction, les cellules ont été cultivées dans les conditions de culture des cellules ES, c'est-à-dire sur des cellules nourricières, en présence de LIF pour les cellules murines ou de bFGF pour les cellules humaines. Après 10 à 15 jours chez la souris

et trois semaines à un mois chez l'homme, des clones présentant la morphologie de cellules ES ont commencé à apparaître et ont pu ensuite être amplifiés et clonés.

L'efficacité et la cinétique de reprogrammation dépendent de nombreux facteurs tels que le type cellulaire utilisé, l'âge du donneur lors du prélèvement, la méthode de reprogrammation (voir plus loin) mais aussi de la méthode utilisée pour identifier les clones reprogrammés. En effet, l'efficacité peut être déterminée sur des critères morphologiques ou sur des critères plus stricts prenant en compte l'expression de marqueurs de cellules pluripotentes. La diversité des paramètres pris en compte rend difficile la comparaison de l'efficacité de reprogrammation entre différents laboratoires. Néanmoins, pour des fibroblastes reprogrammés avec des vecteurs rétroviraux, elle est généralement de l'ordre de 0,01 à 0,1% (González et al., 2011).

Après isolement et amplification des clones de cellules iPS, ces derniers doivent être caractérisés afin de s'assurer de leur pluripotence. Les cellules clonales ainsi isolées doivent présenter les caractéristiques moléculaires et fonctionnelles des cellules ES.

### 6.3.4. La cellule reprogrammée

De nombreux types cellulaires ont été reprogrammés depuis l'utilisation initiale de fibroblastes. Chez la souris ou chez l'homme ont été utilisés par exemple les kératinocytes, les lymphocytes ou les hépatocytes (voir Table 5). La diversité des cellules qui ont été reprogrammées semble indiquer que la plupart des types cellulaires pourraient être reprogrammés. Mais encore maintenant les fibroblastes restent le type cellulaire de choix car ces cellules sont accessibles facilement par biopsies cutanées, sont facilement amplifiables et cultivables, et faciles à modifier génétiquement.

Il a été montré que le type cellulaire de départ influait sur l'efficacité et la cinétique de la reprogrammation. Par exemple la reprogrammation de kératinocytes humains avec les quatre vecteurs rétroviraux a une efficacité de l'ordre de 1% contre 0,01 à 0,1% pour les fibroblastes (Aasen et al., 2008). Pour la génération d'iPS humaines, après les fibroblastes, les kératinocytes sont donc considérés comme un type cellulaire de choix d'autant plus que le prélèvement de cheveux n'est pas invasif. Malgré ces avantages leur mise en culture reste plus compliquée que celle des fibroblastes.

Contrairement aux cellules somatiques qui le plus souvent ont un potentiel de prolifération limité et pour lesquelles un stress peut induire la sénescence, les cellules ES peuvent s'auto-renouveler indéfiniment en culture. Elles sont considérées comme immortelles. La sénescence semble incompatible avec la reprogrammation vers la pluripotence. Dans ce sens, l'accumulation de nombreux passages est associée avec une diminution drastique de l'efficacité de la reprogrammation (Utikal

et al., 2009). Des cellules sénescentes ont tout de même pu être reprogrammées mais uniquement en forçant l'expression de six facteurs (OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC, LIN28 et NANOG). Des cellules de donneurs particulièrement âgés, autour de cent ans, ont également pu être reprogrammées avec la même méthode (Lapasset et al., 2011). De manière intéressante, une fois ces cellules reprogrammées en cellules iPS, les auteurs ont montré que la reprogrammation permettait de faire « rajeunir » les cellules, avec notamment, un allongement des télomères et un métabolisme mitochondrial correspondant à celui des cellules ES.

D'autre part, la sous-expression de gènes suppresseurs de tumeurs tels que p53, p21 (CdknIa), p16 (Ink4a) et p19 (Arf) dans les fibroblastes accroît l'efficacité et la cinétique de la reprogrammation à la fois en induisant l'immortalisation des cellules et en interférant avec l'apoptose. Cependant, il a été montré que la reprogrammation en l'absence de p53 entrainait un enrichissement en cellules présentant des altérations génétiques (Ho et al., 2011b).

Mouse and human iPS cells have been generated in a variety of ways

| Cell type | Reprogramming factors | Method of delivery | Timeline (wk) | Efficiency | Genomic integration | Genomic integration removed | Refs. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Mouse** | | | | | | | |
| MEFs | O,S,K,M | Retroviral vectors | 2–3 | 0.01%–0.050% | Yes | No | 10, 12–15 |
| MEFs | O,S,K | Retroviral vectors | 3–4 | 0.001%–0.01% | Yes | No | 56, 65, 98 |
| Hepatocytes and stomach cells | O,S,K,M or O,S,K | Retroviral vectors | 2–3 | 0.5%–3% | Yes | No | 46 |
| Neural stem cells | O,S,K,M or O,S,K or O,K,M or O,S,M | Retroviral vectors | 1–4 | 0.1%–5% | Yes | No | 48, 99 |
| Neural stem cells | O,K or O,M or O | Retroviral vectors | 2–4 | 0.1%–0.2% | Yes | No | 32, 100 |
| B lymphocytes | O,S,K,M | Lentiviral vectors[A] | 2–3 | 0.01%–0.1% | Yes | No | 34 |
| Hepatocytes | O,S,K,M | Adenoviral vectors | 4–5 | 0.0001%–0.001% | No | – | 29 |
| MEFs | O,S,K,M | Plasmid transient transfection | 3–4 | 0.0001%–0.001% | No | – | 30 |
| MEFs | O,S,K,M | piggyBac transposon[A] | 2 | NR | Yes | Yes | 67 |
| MEFs | O,S,K,M | Nonviral plasmid transfection | 2 | 2.5% | Yes | Yes | 66 |
| MEFs | O,S,K,M or O,S,K + VPA | Recombinant proteins | 4–5 | 0.002%–0.008% | No | – | 31 |
| MEFs | O,K + Bix and BayK | Retroviral vectors | 2–3 | 0.007%–0.02% | Yes | No | 60 |
| MEFs | O,S,K,M | Plasmid nucleofection | 2–3 | NR | No | – | 68 |
| MEFs, TTFs | O,S,K,M | Single lentiviral vector[A] | 2–3 | 0.5% | Yes | No | 63 |
| MEFs, TTFs | O,K,M + RepSox or O,K + RepSox | Retroviral vectors | 2 | ~1% | Yes | No | 61 |
| **Human** | | | | | | | |
| Skin fibroblasts and bone marrow mesenchymal cells | O,S,K,M or O,S,K,M,T,SV or O,S,K,M,N or O,S,K | Retroviral vectors | 2–5 | 0.001%–1% | Yes | No | 2, 16, 18, 19 |
| Skin fibroblasts | O,S,K or O,S + VPA | Retroviral vectors | 4 | 0.001%–0.01% | Yes | No | 57 |
| Keratinocytes | O,S,K,M or O,S,K | Retroviral vectors | 1–2 | 1% | Yes | No | 49 |
| Peripheral blood cells | O,S,K,M | Retroviral vectors | 2 | 0.01%–0.02% | Yes | No | 50 |
| Skin fibroblasts and keratinocytes | O,S,K,M or O,S,K,M,N | Lentiviral vectors[A] | 3–4 | 0.002% | Yes | No | 101 |
| Skin fibroblasts | O,S,N,L or O,S,N,L,M,K | Lentiviral vectors | 2–3 | 0.01%–1% | Yes | No | 17, 20, 33 |
| Skin fibroblasts | O,S,K,M or O,S,K | Lentiviral vectors[A] | 3–5 | NR | Yes | Partial[B] | 36 |
| Embryonic fibroblasts | O,S,K,M | piggyBac transposon[A] | 2–4 | NR | Yes | No | 67 |
| Embryonic fibroblasts | O,S,K,M | piggyBac transposon[A] | 2–4 | 0.005%–0.01% | Yes | No | 66 |
| Skin fibroblasts | O,S,N,L,M,K,SV | Episomal vectors | NR | 0.003%–0.006% | No | – | 33 |
| Adipose stem cells | O,S,K,M | Lentiviral vectors | 2–3 | 0.2% | Yes | No | 51 |
| Skin fibroblasts | O,S,K,M | Recombinant proteins[C] | 8 | 0.001% | No | – | 32 |

[A]Dox-inducible systems. [B]Viral LTR is not excised. [C]Proteins were delivered in the form of whole cell extracts. O, Oct4; S, Sox2; K, Klf4; M, c-Myc; N, Nanog; L, Lin28; SV, SV40LT; T, hTert; MEF, mouse embryonic fibroblast; TTF, tail tip fibroblast; NR, not reported; –, not relevant.

**Tableau 5.** Type cellulaire et efficacité de reprogrammation (Kiskinis & Eggan 2010)

### 6.3.5. Méthodes de reprogrammation

- Les vecteurs rétroviraux.

Les vecteurs rétroviraux dérivés du virus MMLV ont été les premiers outils utilisés pour apporter les gènes de reprogrammation dans les cellules (Tableau 6) (Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi et al., 2007). Ces vecteurs permettent un transfert de gènes efficace à condition que les cellules se divisent et permettent après intégration une expression élevée et durable des facteurs introduits. Un autre intérêt de ces vecteurs est lié au fait que dans les cellules souches pluripotentes l'expression à partir des promoteurs rétroviraux est ensuite inactivée. Cette extinction se produit de manière spécifique et plutôt efficace (Maherali et al., 2007b), sans doute via des méthylations de l'ADN et des histones (Matsui et al., 2010). Cette propriété confère un avantage pour la reprogrammation, puisqu'une fois les cellules reprogrammées, l'expression des facteurs exogènes s'éteint. De plus il a été montré qu'une expression des facteurs exogènes d'environ deux semaines était nécessaire et suffisante à la mise en place de la reprogrammation (Stadtfeld et al., 2008b).

Néanmoins, l'intégration permanente dans le génome des cellules de ces vecteurs pose un certain nombre de problèmes. En premier lieu, elle présente un risque de mutagenèse insertionnelle. D'autre part l'extinction des vecteurs, même si elle est généralement efficace, n'est pas toujours complète et il peut persister à bas bruit une expression résiduelle qui peut limiter la capacité de différenciation des cellules reprogrammées (González et al., 2011). Enfin, l'expression à partir des vecteurs peut éventuellement être ultérieurement réactivée et affecter la prolifération ou la différenciation des cellules. Par exemple, la réactivation de c-Myc dans des souris chimériques serait responsable de la formation de tumeurs (Okita et al., 2007).

D'autre méthodes d'apport des facteurs de dédifférenciation ont été développées, avec comme objectif soit d'améliorer l'efficacité du processus, soit de le rendre plus sûr.

- Les vecteurs lentiviraux.

Une première alternative est l'utilisation de vecteurs lentiviraux (Tableau 6) (Blelloch et al., 2007; Yu et al., 2007). Ces vecteurs dérivés des lentivirus sont capables d'intégrer leur génome dans des cellules qui ne se divisent pas. Ainsi le transfert de gène avec ces vecteurs a permis de transduire des types cellulaires en division ou non, telles que des cellules post-mitotiques. Néanmoins, contrairement aux vecteurs rétroviraux dérivés des virus MMLV, l'expression des vecteurs lentiviraux n'est que peu diminuée dans les cellules ES et ceci peut altérer la différenciation des iPS. Afin de palier à ce défaut, des vecteurs lentiviraux inductibles ont été développés (Stadtfeld et al., 2008a; Sun et al., 2009). Ces vecteurs permettent de s'affranchir des problèmes d'expression persistante des gènes introduits. Néanmoins, ce type de

vecteurs présente toujours des risques de mutation suite à leur intégration dans le génome des cellules (Brambrink et al., 2008; Maherali et al., 2008). Même lorsque des vecteurs polycistroniques sont utilisés, le risque lié à l'intégration persiste (Carey et al., 2009).

L'utilisation de ces vecteurs viraux pour générer les cellules iPS est apparue rapidement comme une barrière à leur éventuelle utilisation en thérapie. En effet, la possibilité de mutagénèse insertionnelle ainsi que la réactivation des transgènes qui seraient responsables de l'apparition de tumeurs chez les souris chimériques (Nakagawa et al., 2008) rendent leurs utilisation impossible en thérapie cellulaire. Ces problèmes sont également apparus comme pouvant être gênant pour l'utilisation des iPS et des cellules différenciées à partir des iPS comme outil de modélisation.

- Les vecteurs viraux non intégratifs.

D'autres types de vecteurs viraux ont été utilisés afin de reprogrammer des cellules en iPS (Tableau 6), comme les vecteurs adénoviraux (Stadtfeld et al., 2008c). Ces vecteurs présentent en effet l'avantage de ne pas intégrer leur génome dans les cellules transduites. Malheureusement ces vecteurs sont plus difficiles à produire que les vecteurs rétroviraux ou lentiviraux et de plus il a été montré que la reprogrammation avec ces vecteurs était très peu efficace (0,0002%) (Zhou and Freed, 2009).

Plus récemment, un autre type de vecteur viral a été utilisé afin de générer des cellules iPS : des vecteurs dérivés du virus de Sendaï (Fusaki et al., 2009; Ban et al., 2011; Nishimura et al., 2011). Cette méthode s'est révélée aussi efficace que les vecteurs intégratifs et a été utilisée sur cellules murines et humaines. Ces vecteurs permettent l'expression des ARNm des différents facteurs dans les cellules cibles et ne présentent pas de risque d'intégration dans le génome cellulaire (Tableau 6). De plus ces vecteurs peuvent être facilement éliminés après la reprogrammation, soit par des système de sélection basés sur la température (Ban et al., 2011), ou à l'aide d'ARNsi spécifique des vecteurs (Nishimura et al., 2011).

- Autres méthodes.

Des cellules iPS ont été obtenues sans intégration de matériel exogène en transfectant ou electroporant des plasmides codant pour les facteurs de reprogrammation (Okita et al., 2008). L'efficacité de reprogrammation était très faible et cette technique n'a pas été testée avec des cellules humaines.

Des vecteurs contenant des sites LoxP et des transposons ont été utilisés pour reprogrammer des cellules somatiques car ils présentent l'avantage de pouvoir être excisés après la reprogrammation (Tableau 6). Cependant il a été montré que ces systèmes peuvent laisser des traces insertionnelles lors de leur excision (Chang et la. 2009; Gonzalez et al., 2009; Kaji et al., 2009). Le transposon « PiggyBac » a été

décrit pour générer des cellules iPS à partir de fibroblastes murins et humains (Woltjen et al., 2009; Yusa et al., 2009). Ce transposon présente la particularité de ne pas laisser de traces après son excision. L'efficacité de cette technique serait similaire à celle obtenue avec les vecteurs rétroviraux pour les fibroblastes murins.

Une autre technique décrite a utilisé des épisomes non intégratifs (Yu et al., 2009) dérivant du virus d'Epstein-Barr (EBV) et qui présentent la particularité de se répliquer lors des cycles de division des cellules et de ne pas être perdus aussi rapidement que des plasmides classiques (Tableau 6). Cette technique a permis d'obtenir des iPS dans lesquelles aucune intégration dans le génome n'a été trouvée. Après la reprogrammation, les épisomes étaient perdus au fur et à mesure de la multiplication des cellules (Yu et al., 2009). L'efficacité de cette méthode était faible mais a pu être améliorée après ajout de molécules capables de réaliser des modifications épigénétiques favorisant la reprogrammation (Yu et al., 2011).

Récemment des méthodes n'utilisant pas d'ADN ont été mises au point. Une technique, relativement efficace, est basée sur l'utilisation d'ARNm modifiés (Tableau 6) codant pour les facteurs et qui sont apportés aux cellules par des transfections répétitives (Warren et al., 2010).

Des cellules iPS ont également été obtenues en utilisant des protéines recombinantes (Kim et al., 2009a; Zhou et al., 2009) mais avec une efficacité de reprogrammation extrêmement faible. Cette méthode n'a pas été reproduite avec des cellules humaines.

Aujourd'hui, la technique de reprogrammation utilisant les vecteurs rétroviraux reste la plus utilisée. Sans doute car elle reste l'une des techniques les plus efficaces et que la production de ce type de vecteurs peut être réalisée assez facilement par de nombreux laboratoires. Les techniques non intégratives les plus prometteuses sont sans doute celles utilisant les vecteurs dérivés du virus de Sendaï ou celle utilisant les épisomes. Les vecteurs dérivés du virus de Sendaï offrent une forte efficacité de reprogrammation, mais la production des vecteurs semblent plus complexe que celle des vecteurs rétroviraux ce qui pourrait limiter son utilisation. La technique reposant sur les épisomes est elle relativement aisée à mettre en place, puisqu'elle repose sur l'utilisation de plasmides devant être électroporés mais cette technique reste peu efficace.

| type of vector | method | genomic integration | factors[d] | reprogramming efficiency in human fibroblasts [e] |
|---|---|---|---|---|
| virus | retrovirus | + | OSKM | ++++ |
| | lentivirus | + | OSNL | +++ |
| | adenovirus | −[a] | OSKM | + |
| | Sendai virus | −[b] | OSKM | ++++ |
| DNA | episomal plasmid | −[a] | OSKMNLT | + |
| | transposon | −[a,c] | OSKM | ++ |
| | minicircle | −[a] | OSNL | + |
| RNA | RNA | − | OSKM | +++ |
| protein | cell transparent protein | − | OSKM | + |

[a]Absence of genomic integration should be experimentally examined.
[b]Absence of virus RNA genome should be experimentally examined.
[c]Transposon vector is integrated into genome, but it can be removed.
[d]O, OCT3/4; S, SOX2; K, KLF4; M, C-MYC; N, NANOG; L, LIN28; T, SV40-large T antigen.
[e]+, <0.001%; ++, <0.01%; +++, <0.1%; ++++, >0.1%.

**Tableau 6.** Les différentes méthodes de reprogrammation (Okita and Yamanaka, 2011). Les différentes méthodes d'apport des facteurs, le potentiel d'intégration, les facteurs utilisés et l'efficacité sont indiqués dans le tableau.

### 6.3.6. Mécanismes de reprogrammation

Les mécanismes impliqués dans la reprogrammation sont encore mal connus. Leur compréhension passe par celle du rôle des facteurs de reprogrammation et les conséquences moléculaires qu'entraine leur expression dans les cellules, ou encore des modifications épigénétiques qui ont lieu au cours du processus.

#### 6.3.6.1. Facteurs de reprogrammation

En 2007, le premier cocktail de facteurs de reprogrammation décrit pour générer des cellules iPS était composé des produits de quatre gènes : OCT4, SOX2, KLF4 et c-MYC. Ces facteurs sont fréquemment nommés « facteurs de Yamanaka » (Yamanaka's factors) (Huang et al., 2009). La même année un autre cocktail de gènes a été décrit comme permettant la reprogrammation des fibroblastes humains. Il est composé des gènes OCT4, SOX2, NANOG et LIN28 (Yu et al., 2007). Mais par la suite, la majorité des études publiées ont été réalisées avec « les facteurs de Yamanaka ».

Le facteur c-MYC n'est pas indispensable à la reprogrammation, que ce soit pour les fibroblastes, les kératinocytes ou encore pour les cellules souches neurales, mais il a été montré que son absence réduisait fortement l'efficacité du processus et augmentait le temps nécessaire à la reprogrammation (Kiskinis and Eggan, 2010).

Suivant le type cellulaire de départ, le processus de reprogrammation peut être effectué en l'absence de certains de ces facteurs. Par exemple il a été montré que les cellules souches neurales murines qui expriment un niveau modéré de c-Myc et Klf4, et un haut niveau de Sox2, pouvaient être reprogrammées uniquement avec Oct4. Mais, la vitesse de reprogrammation était beaucoup plus lente et l'efficacité plus faible (Kim et al., 2009b).

Parmi les facteurs de reprogrammation, Oct4 semble être le plus déterminant dans le processus de reprogrammation et ce quelque soit le type cellulaire de départ. Il a été montré que le facteur codé par le gène Nr5a2 (orphan nuclear receptor) pouvait le remplacer et permettre d'obtenir la reprogrammation de cellules somatiques murines en l'absence d'Oct4. Le facteur de transcription codé par le gène Nr5a2 est impliqué dans l'activation de la transcription d'Oct4. De plus il possède de nombreuses cibles géniques communes avec Sox2 et Klf4. Enfin il serait également impliqué dans l'activation de la transcription de Nanog (Heng et al., 2010).

Le processus de reprogrammation peut à l'inverse être optimisé en forçant l'expression d'autres facteurs en plus des 4 facteurs de Yamanaka. Par exemple, les ajouts de l'antigène T du virus SV40 et de la télomérase humaine (hTERT) aux quatre facteurs de Yamanaka ont augmenté l'efficacité de reprogrammation (Park et al., 2008c). De même que l'utilisation simultanée des 6 facteurs OCT4, SOX2, KLF4, C-MYC, LIN28 ET NANOG peut améliorer l'efficacité et la cinétique de reprogrammation (Liao et al., 2008).

#### 6.3.6.2. Conséquences de l'expression des facteurs de reprogrammation

L'enchaînement des évènements moléculaires qui se produisent entre l'exposition des cellules aux facteurs de reprogrammation et l'établissement de colonies de cellules iPS, reste encore mal connu. Néanmoins, une partie des évènements qui se déroulent durant les deux à trois premières semaines après l'exposition à ces facteurs dans des fibroblastes murins ont pu être décrits.

Les premières modifications se produisent au niveau de l'expression de certains gènes avec une sous-régulation des marqueurs somatiques comme les marqueurs mésenchymateux (Ho et al., 2011b). De manière concomitante, des gènes épithéliaux tels que celui codant pour la E-cadhérine ou ceux codant pour des molécules d'adhésions des cellules épithéliales (Epcam), sont sur-exprimés comme si les cellules subissaient une transition mésenchymo-épithéliale (Li et al., 2010a). Cette transition semble être une étape essentielle de la reprogrammation. En effet, il a été montré que l'activation de la voie de signalisation du TGFβ, qui bloque la

transition mésenchymo-épithéliale, ou l'inhibition de la voie de signalisation des BMP, qui favorise cette transition, ou encore la réduction du niveau de la transcription de gènes impliqués dans cette transition comme la E-cadhérine, interféraient avec la reprogrammation (Ho et al., 2011b). Il a été également montré que cette transition mésenchymo-épithéliale était accompagnée d'une augmentation de la prolifération et d'une diminution de la taille des cellules suivies quelques jours après par la formation de colonies ressemblant à des colonies de cellules ES (Smith et al., 2010).

Il a été montré que des marqueurs exprimés dans les cellules ES vont être exprimés de manière précoce dans certaines des colonies qui apparaissent, comme la phosphatase alcaline et SSEA-1. Puis au sein de ces cellules, quelques unes vont activer l'expression d'Oct4, Sox2 et Nanog. Enfin de nombreux autres gènes de pluripotence vont être exprimés dans les cellules correctement reprogrammées (Ho et al., 2011b). Le fait que les colonies négatives pour SSEA-1 le soient aussi pour Oct4, Sox2 et Nanog a suggéré que le processus de reprogrammation se déroulait dans un ordre bien défini avec 1) la transition mésenchymo-épithéliale, 2) l'expression de l'alcaline phosphatase et de SSEA1 et 3) l'expression des gènes codant pour les facteurs de transcription Oct4, Sox2 et Nanog.

Il a été montré que l'expression des facteurs exogènes était indispensable pendant un laps de temps défini (10-12 jours chez la souris) et qu'ensuite les cellules se maintenaient dans un état pluripotent indépendamment des facteurs de reprogrammation, indiquant une conversion stable. Si les facteurs de reprogrammation sont supprimés avant la fin du processus, il a été montré que cela entrainait une réversion vers l'état différencié des cellules (Stadtfeld et al., 2008b).

#### 6.3.6.3. Barrière à la reprogrammation

L'efficacité de reprogrammation étant faible, il est établi que la plus grande partie des cellules qui ont reçu les facteurs ne se reprogramment pas. Les mécanismes qui limitent cette reprogrammation restent mal connus.

Des expériences menées sur des populations clonales de lymphocytes ou de monocytes (Hanna et al., 2009) ont apporté des éléments de réponse intéressants. Dans ces expériences, les cellules ont été transduites puis amplifiées de façon clonale. Les premières cellules reprogrammées sont apparues en 8 à 10 jours pour 3 à 5 % des cellules filles. Mais, au bout de 18 semaines, environ 92% des cellules avaient produit des cellules filles positives pour Nanog après des intervalles de temps différents. Le fait que le temps nécessaire à une reprogrammation complète soit variable d'une cellule de départ à l'autre au sein d'une population clonale a suggéré qu'au moins un des évènements du processus était de nature stochastique.

Ces observations ont mis en lumière l'existence de barrières épigénétiques importantes qui interfèreraient avec la reprogrammation et qui ne seraient franchies que rarement suite à des évènements stochastiques.

Afin d'améliorer la reprogrammation, il est nécessaire de connaître les évènements moléculaires qui se produisent au cours de la reprogrammation et de déterminer quelles sont les barrières limitantes. L'étude de ces barrières nécessite de disposer d'une population de cellules en cours de reprogrammation. Or, l'efficacité du processus étant très faible et le fait qu'il soit impossible de prévoir quelles seront les cellules qui vont se reprogrammer complique l'analyse de ce processus et l'identification des barrières moléculaires qui l'entravent.

L'isolement de cellules partiellement reprogrammées pouvant être considérées comme des intermédiaires entre les cellules de départ et les cellules iPS a permis que des études soient menées dans ce sens. En effet, plusieurs groupes ont isolés des populations relativement stables de ce type de cellules qui sont aujourd'hui appelées pré-iPS (Mikkelsen et al., 2008; Silva et al., 2008a; Sridharan et al., 2009). Chez la souris, il a été montré que ces cellules pré-iPS proliféraient comme des cellules ES, qu'elles exprimaient le marqueur SSEA-1 et présentaient une morphologie proche des colonies de cellules ES (Mikkelsen et al., 2008; Silva et al., 2008a; Sridharan et al., 2009). Mais il a été montré aussi que ces pré-iPS étaient bloquées à un stade intermédiaire de reprogrammation. Des comparaisons des profils d'expression génique entre les cellules pré-iPS et les cellules ES ou iPS ont indiqué que de nombreux gènes de pluripotence comme Oct4 ou Nanog n'étaient pas réactivés dans ces cellules alors que de nombreux gènes somatiques étaient déjà inactivés (Mikkelsen et al., 2008; Sridharan et al., 2009). Le fait qu'un traitement de ces cellules avec des inhibiteurs des kinases ERK et GSK, appelé 2i, et qui favoriserait le maintien dans un état de pluripotence des cellules ES murines, ait permis de convertir ces cellules pré-iPS en iPS, a démontré que ces colonies étaient bien des intermédiaires entre les cellules somatiques et les cellules iPS. De la même manière, les agents de déméthylation de l'ADN, ou l'inhibition du TGFβ a favorisé la conversion des cellules pré-iPS en iPS (Mikkelsen et al., 2008; Silva et al., 2008a; Ichida et al., 2009).

#### 6.3.6.4. Rôle des facteurs de reprogrammation

Ces cellules pré-iPS ont pu être utilisées afin d'étudier le rôle des quatre facteurs de reprogrammation les plus utilisés (OCT4, SOX2, KLF4 et c-MYC). En comparant la fixation de ces facteurs à leurs cibles géniques dans des cellules iPS et pré-iPS, leurs rôles dans le processus de dédifférenciation a pu être mieux compris (Sridharan et al., 2009). Dans un premier temps, l'étude des cibles géniques de ces

facteurs dans les iPS et dans les ES a montré que c-MYC et les trois autres facteurs (OCT4, SOX2 et KLF4) présentaient des fonctions de régulation transcriptionnelle fortement différentes. En effet, leurs gènes cibles ne sont pas les mêmes. Les cibles de c-MYC sont principalement des promoteurs de gènes impliqués dans le métabolisme, le cycle cellulaire et dans les voies de biosynthèses, alors que celles de Oct4, SOX2 et KLF4 sont impliquées dans la régulation de gènes contrôlant le développement et la transcription (Ho et al., 2011b)

La comparaison de la fixation des facteurs entre iPS et pré-iPS a montré que dans les cellules pré-iPS, OCT4, SOX2 et KLF4 n'étaient pas fixés sur les promoteurs de leurs cibles géniques (Sridharan et al., 2009). De plus, dans ces cellules, les gènes cibles de ces facteurs n'étaient pas réactivés, ce qui pourrait être provoqué par l'absence de fixation des facteurs. Par contre, dans ces mêmes cellules pré-iPS, il a été montré que c-MYC était lié aux promoteurs de ses gènes cibles et ces gènes étaient déjà fortement exprimés. Ces résultats ont donc suggéré que lors du processus de reprogrammation, c-MYC activerait très tôt ses gènes cibles alors que les trois autres facteurs agiraient plus tardivement (Ho et al., 2011b). La faible efficacité du processus de reprogrammation pourrait être en partie due à une faible capacité de fixation des facteurs OCT4, SOX2 et KLF4 à leurs cibles génétiques qui pourrait être provoquée par la nécessité d'interaction avec d'autres facteurs de transcription, tel que NANOG, ou à l'état de la chromatine encore trop méthylée.

#### 6.3.6.5. Statut de la chromatine

La reprogrammation en cellules pluripotentes implique de nombreuses modifications épigénétiques qui sont indispensables à l'activation du programme transcriptionnel spécifique aux cellules souches associée à l'arrêt de l'expression des gènes spécifiques du tissu d'origine. Ce processus est associé à une « remise à zéro » de l'état de la chromatine ce qui correspond à un retour à un état épigénétique des cellules équivalent à celui des cellules souches pluripotentes.

Les analyses des états de méthylation des histones et de l'ADN dans les fibroblastes, dans les cellules pré-iPS et dans les cellules iPS ont indiqué que d'importants changements avaient lieu durant le processus de reprogrammation. Il a été montré que ces modifications conduisaient à un retour à un état de méthylation semblable à celui des cellules ES (Ho et al., 2011b), c'est-à-dire un état principalement déméthylé.

Par exemple, des analyses ont montré que les promoteurs des gènes Oct4 et Nanog étaient hyperméthylés dans les fibroblastes et dans les pré-iPS alors que dans les cellules ES et iPS, ces promoteurs étaient déméthylés. La déméthylation de l'ADN

semble être un processus important dans la reprogrammation. En effet il a été montré que l'addition de molécules inhibitrices de la méthylation de l'ADN ou la déplétion de protéines impliquées dans le maintien de la méthylation (par exemple DnmtI) augmentait l'efficacité de la reprogrammation (Mikkelsen et al., 2008).

De manière similaire à la méthylation de l'ADN, les modifications des histones semblent avoir un impact important sur le processus de reprogrammation (Figure 18). En effet, l'utilisation d'histone déacétylases ou d'inhibiteurs de méthyltransférase a augmenté l'efficacité de la reprogrammation en cellules iPS (Ho et al., 2011b).

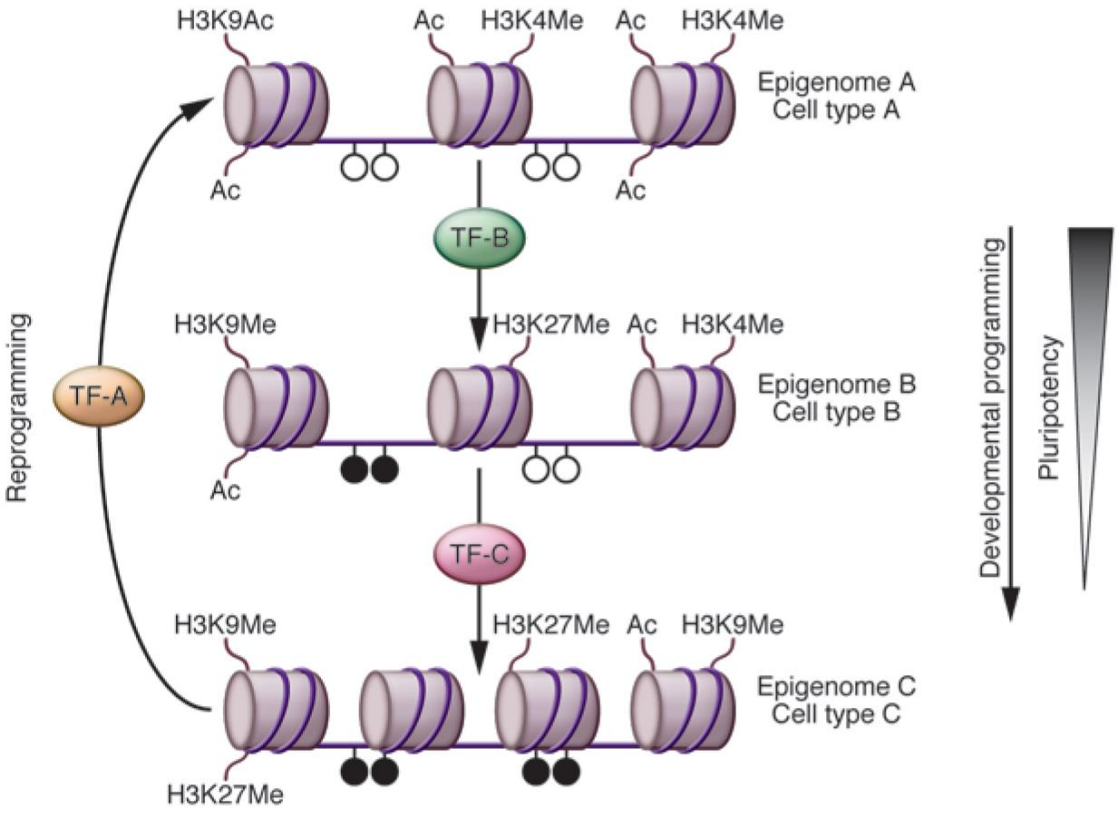



**Figure 18.** Modification épigénétique des histones lors de la reprogrammation (Kiskinis and Eggan, 2010). Le programme développemental conduit à une diminution de pluripotence des cellules avec modifications des histones. La reprogrammation avec les facteurs de transcription (TF-A) permet de revenir vers un état épigénétique de pluripotence. Les cercles noirs représentent les îlots CpGs de l'ADN méthylés, les cercles blancs représentent les îlots CpG déméthylés. Le code épigénétique est représenté par les modifications des histones associés à l'activation des gènes (Ac : Acétylation, H3K9Ac : acétylation de l'histone H3 sur la lysine 9, H3K4Me : méthylation de l'histone 3 sur la lysine 4) ou à leur répression (H3K9Me et H3K27Me : méthylation de l'histone H3 sur les lysines 9 et 27). L'épigénome A représente celui de cellules pluripotentes, le C celui de cellules différenciées.

### 6.3.6.6. Molécules d'aide à la reprogrammation

Différentes études ont été menées dans le but d'isoler des composés chimiques pouvant soit améliorer l'efficacité, soit remplacer les facteurs de reprogrammation. Les composés identifiés agissent sur les mécanismes impliqués dans le processus de reprogrammation. Parmi ces composés (Tableau 7), on trouve des inhibiteurs des histones déacétylases, des inhibiteurs des histones méthyltransférases ou encore des inhibiteurs de diverses voies métaboliques impliquées dans la reprogrammation comme des inhibiteurs du récepteur au TGFβ.

Il a été montré que certaines molécules pouvaient remplacer certains facteurs de reprogrammation. Par exemple, la molécule Repsox (inhibiteur de la voie TGFβ) a pu remplacer le facteur SOX2 en induisant l'expression de Nanog dans des fibroblastes murins (Ichida et al., 2009), et la kenpaullone a pu compenser l'absence de KLF4 (Lyssiotis et al., 2009).

Malgré toutes ces études, il n'est pas encore possible aujourd'hui de générer des iPS uniquement avec des molécules.

| **Molécule** | **Type** | **Origine des cellules reprogrammées** |
|---|---|---|
| BIX-01294 | Inhibiteur d'histone méthyltransférase | Murine |
| Parnate | Inhibieteur de la H3K4 déméthylase | Humaine |
| 5-azacitidine | Inhibiteur de méthyltransférase de l'ADN | Murine |
| RG108 | Inhibiteur de méthyltransférase de l'ADN | Murine |
| Trichostatine A (TSA) | Inhibiteur d'histone déacetylases | Murine |
| Acide suberoylanilide hydroxamique (SAHA) | Inhibiteur d'histone déacetylases | Murine |
| Acide valproïque (VPA) | Inhibiteur d'histone déacetylases | Humaine |
| CHIR99021 | Inhibiteur de la Glycogène synthase kinase 3 (GSK3) | Murine/humaine |
| Kenpaullone | Inhibiteur de la Glycogène synthase kinase 3 (GSK3) | Murine |
| A-83-01 | Inhibiteur de la voie du TGFβ | Humaine |
| E-616451 | Inhibiteur de la voie du TGFβ | Murine |
| E-616452 (RepSox) | Inhibiteur de la voie du TGFβ | Murine |
| PD0325901 | Inhibiteur des MEK (MAP/Erk kinase) | Humaine |
| BayK8644 | Agoniste pour le canal calcique L | Murine |
| EI-275 | Innhibiteur de la kinase Src | Murine |

**Tableau 7.** Molécules favorisant la reprogrammation en cellules iPS. Adapté de **(Yuan et al., 2011b)**.

#### 6.3.6.7. Mémoire épigénétique des iPS

Il a été montré que les clones d'iPS présentaient des marques de mémoire épigénétique des cellules somatiques avant leur reprogrammation et que ces marques pouvaient affecter leur potentiel de différenciation (Kim et al., 2010b; Polo et al., 2010). En effet après l'isolement des iPS, ces dernières peuvent continuer à exprimer des gènes des cellules somatiques avec un état de la chromatine ressemblant à celui des cellules de départ (Polo et al., 2010). Il a été également montré que les iPS se différenciaient à ce stade de façon plus efficace dans le lignage d'origine que dans les autres (Polo et al., 2010), mais que ce phénotype disparaissait au fur et à mesure des passages en culture (Chin et al., 2009, 2010; Polo et al., 2010).

Ces différences moléculaires et fonctionnelles avec les cellules ES semblent disparaitre après l'expansion continue des cellules iPS. Cette disparition de mémoire épigènétique correspond-t-elle à une évolution de l'ensemble des cellules ou à la sélection de quelques cellules correctement reprogrammées ? Cela reste encore incertain. L'utilisation de molécules affectant les fonctions épigénétiques comme le trichostatin A et la 5-azacytidine peuvent favoriser l'effacement de la mémoire épigénétique dans des cellules de moelle osseuse murine ou des fibroblastes murins (Kim et al., 2010b).

### 6.3.7. Modélisation de pathologies neurodégénératives

Le développement de la technologie des cellules iPS a ouvert de nouvelles perspectives quant à la modélisation de maladies d'origine génétique connue ou sporadiques. Les cellules iPS pouvant être différenciées vers de nombreux types cellulaires, il est aujourd'hui possible de prélever des cellules d'un patient, de les reprogrammer en cellules iPS puis de différencier ces iPS dans la cellule d'intérêt pour en étudier la pathologie.

#### 6.3.7.1. Différenciation des iPS vers les cellules d'intérêt : exemple de la différenciation neuronale.

De nombreux protocoles ont été développés et adaptés successivement aux cellules ES murines et humaines, puis aux cellules iPS murines et humaines, respectivement.

Les types cellulaires différenciés ayant été générés à partir de cellules iPS humaines de patients sont indiqués dans le tableau 8.

Pour la différenciation des cellules iPS en neurones, plusieurs protocoles ont été décrits pour générer des cultures de précurseurs neuraux puis pour différencier ces précurseurs en différents sous-types de neurones.

Le premier protocole a décrit la sélection de précurseurs neuraux (PNs) en cultivant les iPS dans un milieu favorisant la survie des précurseurs et contenant uniquement les facteurs de croissance bFGF et EGF (Ebert et al., 2009), comme pour des cultures de neurosphères de rongeurs. Cette approche a permis de générer des sphères en suspension qui, après dissociation et adhésion pendant plusieurs semaines, contenaient des cellules capables de se différencier en neurones et astrocytes. Les inconvénients sont que cette méthode ne permet pas de garder des sphères à long terme et que les sphères semblent perdre leur potentiel de différenciation avec les passages. Dans ce protocole des motoneurones en faible pourcentage ont été générés à partir des PNs. Afin d'orienter la différenciation spécifiquement vers la voie du neuroectoderme et empêcher la différenciation vers les autres feuillets embryonnaires (endoderme et mésoderme), des protocoles ont ensuite décrit l'utilisation de molécules spécifiques capables d'activer ou d'inhiber certaines voies. Par exemple, Chambers et col. ont décrit un protocole utilisant des cellules iPS adhérentes et traitées avec le SB431542 et la protéine Noggin, deux inhibiteurs de la voie du TGFβ. Dans ces conditions ils ont obtenu une population de PNs beaucoup plus homogène avec plus de 80% de PNs contre 26% lorsqu'étaient utilisées comme support nourricier des cellules stromales connues pour induire la différenciation en neurones (Perrier et al., 2004). La différenciation était également plus rapide avec ce protocole et des différenciations en motoneurones et neurones dopaminergiques ont été réalisées sans obtenir de cultures pures de ces cellules (19 jours contre 30 à 50) (Chambers et al., 2009). Plus récemment un protocole a décrit l'utilisation combinée de la dorsomorphine qui est un inhibiteur de la voie BMP en association avec le SB431542. Dans ce protocole cette double inhibition a permis de limiter la différenciation des iPS humaines vers les autres lignages et la différenciation des cellules iPS en PNs était fortement stimulée (Kim et al., 2010a). D'autre part, la mise au point de protocoles impliquant une étape supplémentaire de purification manuelle de structures neurales appelées rosettes a permis d'obtenir des populations très pures de précurseurs (Hu and Zhang, 2009; Brennand et al., 2011). Ces structures sont composées de PNs exprimant spécifiquement le marqueur nestine et le facteur de transcription PAX6. A partir de ces cultures de rosettes purifiées, des neurones dopaminergiques (Brennand et al., 2011), ou des motoneurones (Hu and Zhang, 2009) ont pu être obtenus.

### 6.3.7.2. Modélisation de maladies neurodégénératives.

Les maladies pouvant être modélisées peuvent être séparées en plusieurs catégories selon qu'elles sont d'une part soit monogéniques, multigéniques ou sans cause connue, et d'autre part à début précoce ou avec un développement plus tardif. Depuis la première génération de cellules iPS humaines, de nombreuses maladies ont été modélisées. Les premières publications ne décrivaient que la génération d'iPS sans description de phénotype. Les première maladies pour lesquelles des phénotypes ont été décrits, ont été des maladies monogéniques à début précoce (Ebert et al., 2009; Lee et al., 2009). Ces pathologies semblaient plus aisées à modéliser à l'aide d'iPS car elles se déclenchent tôt et que leur phénotype est en règle générale en partie connu. Dans le cas des maladies « plus complexes » comme l'autisme, ou la schizophrénie, la modélisation semblait plus délicate, mais il a été possible très récemment de déterminer certains phénotypes (Marchetto et al., 2010; Brennand et al., 2011). Une liste non exhaustive des pathologies ayant été modélisées grâce aux iPS, ainsi que le récapitulatif des phénotypes observés sont présentés Table 8.

Quelques exemples sont décrits ici :

- Exemple d'une maladie monogénique de l'enfant : modélisation de l'amyotrophie spinale proximale (SMA : Proximal spinal muscular atrophy).

La première étude décrivant la génération d'un modèle iPS produisant un phénotype a été publié en 2009. Ebert et col. ont généré des iPS à partir de fibroblastes d'un patient de trois ans atteins de SMA et de sa mère qui n'était pas affectée. La SMA est une pathologie neurodégénérative autosomale juvénile récessive causée par des mutations dans le gène SMN1. Cette pathologie se caractérise par la mort sélective des motoneurones α. Dans cette publication, ils ont montré une diminution du nombre de motoneurones différenciés à partir des cellules iPS ainsi qu'une réduction de leur taille. Ils ont également décrit que les cellules iPS de patient présentaient un niveau de protéine SMN1 réduite. Enfin, ils ont montré que le traitement des cellules iPS avec de l''acide valproïque permettait de restaurer le niveau de SMN dans les iPS (Ebert et al., 2009). Si les phénotypes décrits dans cette étude étaient plutôt descriptifs et peu détaillés, elle est la première à avoir montré que les cellules iPS pouvaient reproduire un phénotype.

- Autre exemple d'une maladie monogénique de l'enfant : Modélisation de la dysautonomie familiale

Une autre étude beaucoup plus complète a montré des phénotypes sur des sous-types de neurones bien identifiés dérivés de cellules iPS pour modéliser la dysautonomie familiale. Cette maladie est une neuropathie juvénile causée par une

mutation dans le gène IKBKAP qui entraîne un défaut d'épissage tissu-spécifique et qui provoque une diminution du niveau de la protéine IKAP. La maladie se caractérise par une déplétion spécifique des neurones sensoriels du système nerveux périphérique. Cette maladie ne disposant pas de modèle animal, sa modélisation avec les iPS était donc particulièrement intéressante. Ils ont montré des défauts d'épissage dans les précurseurs des cellules de la crête neurale et dans des cellules différenciées avec une diminution du nombre de neurones Mash1 et des anomalies de la migration. De plus, ils ont décrit que la kinetin permettait de corriger partiellement le phénotype (Lee et al., 2009).

- Exemple d'une maladie monogénique de l'adulte : modélisation d'une forme génétique de la maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative qui peut être d'origine génétique. Dans cette étude, Nguyen et col. ont modélisé la maladie à partir de cellules de patients de plus de 50 ans porteurs de mutations dans le gène PINK1. Ce gène code une protéine kinase mitochondriale. Ils ont généré des neurones dopaminergiques et ont montré des défauts mitochondriaux dans ces neurones. Ils ont également montré que ces altérations pouvaient être corrigées par transfert de gène (Nguyen et al., 2011).

- Exemple d'une maladie sans cause connue chez le jeune adulte : modélisation de la schizophrénie.

La schizophrénie est un trouble mental qui se déclenche généralement au début de la vie adulte. Les causes génétiques restent mal identifiées. Brennand et col ont modélisé cette pathologie à partir de quatre patients âgés de 23 à 27 ans. Lors de cette étude, ils ont observé une diminution des connexions neurales et une diminution du nombre de neurites dans des neurones principalement glutamatergiques (~60%) mais aussi gabaergiques (~30%) et dopaminergiques (~10%). De plus, ils ont montré que le niveau d'expression de composants des voies de signalisation de l'AMPc et WNT étaient altérés. Ils ont donc pu reproduire quelques phénotypes observés post-mortem dans le cerveau de patients et chez des animaux modèles. Enfin, ils ont décrit une correction de phénotype à l'aide de la loxapine (un antipsychotique) qui accroit les connexions neuronales (Brennand et al., 2011).

- Exemple d'une maladie de l'adulte avec formes génétiques et sporadiques : modélisation de la maladie d'Alzheimer

Récemment Israel et col. ont modélisé des formes sporadiques de la maladie d'Alzheimer à l'aide de cellule iPS à partir de deux patients de 51 et 83 ans. Ils ont généré des neurones à partir des iPS de patients et ils ont triés ces neurones. Ils ont modélisé la pathologie en montrant un haut niveau de marqueurs pathologiques connus tels que les amyloid-β (1-40), phospho-Tau (Thr231). Ils ont ensuite montré

une accumulation de grands endosomes précoces contenant la protéine Rab5 (Israel et al., 2012).

| Pathologie | Défaut moléculaire | Phénotype observé | Type cellulaires différenciées *in vitro* | Référence |
|---|---|---|---|---|
| **ADA-SCID (déficit en adénosine désaminase responsable d'un déficit immunitaire combiné sévère)** | Mutation dans le gène ADA | Non déterminé | Aucun | (Park et al., 2008a) |
| **Adrénoleucodystrophie liée à l'X** | Mutation dans le gène ABCD1 | Augmentation du niveau de VLCFA (acide graas à très longue chaîne) dans les oligodendrocytes dérivés des iPS de patient qui est réduite après un traitement avec de la lovastatin ou du 4-phénylbutirate. | Oligodendrocytes et neurones | (Jang et al., 2011) |
| **Amyotrophie spinale** | Mutation dans le gène SMN1 | Diminution du niveau de SMN dans les iPS. Réduction de la taille et du nombre de motoneurones. | Neurones, astrocytes, motoneurones | (Ebert et al., 2009) |
| **Atrophie gyrée** | Mutation dans le gène OAT | Non déterminé | Aucun | (Howden et al., 2011) |
| **Cardiomyopathie dilatée familiale** | Mutation dans le gène LMNA causant une haplo-insuffisance | Anomalie de la membrane nucléaire, augmentation de la sénescence et de la susceptibilité à l'apoptose des iPS. | Aucun | (Ho et al., 2011a) |
| **Chondrodysplasie métaphysaire autosomique récessive (Hypoplasie cartilage-cheveux)** | Mutation dans le gène RMRP | Non déterminée | Aucun | (Pessach et al., 2011) |
| **Cholestase progressive familiale héréditaire** | Inconnue | Non déterminé | Hépatocytes | (Ghodsizadeh et al., 2010) |
| **Déficit en α1-antitrypsine** | Mutation dans le gène de l'α1-antitripsine | Polymérisation de l' α1-antitripsine | Hépatocytes | (Rashid et al., 2010; Somers et al., 2010) |
| **Diabète de type I** | Multifactorielle et inconnue | Non déterminé | Cellules pancréatique β | (Park et al., 2008a; Maehr et al., 2009) |
| **Drépanocytose** | Mutation dans le gène HBB | Non déterminé | Cellules hématopoïétiques | (Somers et al., 2010) |
| **Dyskératose congénitale** | Mutation dans les gènes DKC1, TERT ou TCAB1 | Raccourcissement progressif des télomères et perte de la capacité d'autorenouvellement des iPS | Aucun | (Agarwal et al., 2010; Batista et al., 2011) |
| **Dysotonomie familiale** | Mutation dans le gène IKBKAP | Diminution de l'expression de gènes impliqués dans la neurogenèse et dans la différentiation neuronale. Défauts dans la migration des cellules de la crète neurale. | Neurones, cellules hématopoïétiques, cellules endothéliales et cellules endodermales. | (Lee et al., 2009) |
| **Dystrophie musculaire de Becker** | Mutation dans le gène de la dystrophine | Non déterminé | Aucun | (Park et al., 2008a) |
| **Dystrophie musculaire de Duchenne** | Mutation dans le gène de la dystrophine | Perte de l'expression de la dystrophine dans les tissus musclulaires issus d'iPS de patients | Aucun | (Kazuki et al., 2010) |
| **Epidermolyse bulleuse dystrophique** | Mutation dans le gène COL7A1 | Perte de l'expression du collagène de type VII restauré par correction génétique. Pas de différence de formation d'un équivalent de peau tridimensionnelle entre les patients et les contrôles | Cellules hématopoïétiques, épidermiques, kératinocytes | (Itoh et al., 2011; Tolar et al., 2011b) |
| **Glycogénose de type I** | Déficit en glucose-6-phosphate | Hyper-accumulation de glycogène | Hépatocytes | (Ghodsizadeh et al., 2010; Rashid et al., 2010) |
| **Granulomatose septique chronique liée à l'X** | Déficience en CYBB | Perte de la production de ROS dans les neutrophiles qui est | Neutrophiles | (Zou et al., 2011) |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | | corrigée par l'insertion du mini-gène CYBB | | |
| **Maladie de Huntington** | Expansion tri-nucléotidique dans le gène de la huntingtine | Non déterminé | Aucun | (Park et al., 2008a) |
| **Maladie de Parkinson** | Mutation dans les gènes LRRK2, PINK1 ou inconnue. | Altération des fonctions mitochondriales dans les neurones dopaminergiques mutants pour PINK1 corrigée par l'expression du gène à l'aide d'un vecteur lentivirale. Sensibilité au stress oxydatifs des neurones mutants pour LRRK2. | Neurones dopaminergiques, neurones | (Park et al., 2008a; Soldner et al., 2009; Hargus et al., 2010; Swistowski et al., 2010; Nguyen et al., 2011; Seibler et al., 2011) |
| **Maladie de Wilson** | Mutation dans le gène ATP7B | Défaut de localisation de la protéine ATP7B mutante et altération dans transport du cuivre dans les hépatocytes dérivés d'iPS de patients, corrigé par le transfert du gène ou par un traitement avec de la curcumine | Hépatocytes | (Zhang et al., 2011b) |
| **MPSI (Syndrome de Hurler)** | Déficience en IDUA | Non déterminé | Cellules hématopoïétiques | (Tolar et al., 2011a) |
| **MPSIIIB (Syndrome de Sanfilippo)** | Déficience en NAGLU | Les iPS et les neurones montrent des défauts de surcharges lysosomales et des anomalies de l'appareil de Golgi | Précurseurs neuraux et neurones | (Lemonnier et al., 2011) |
| **Muccovicidose** | Mutation dans le gène CFTR | Non déterminé | Auncun | (Somers et al., 2010) |
| **Polyglobulie de Vaquez (Polycytémie rubra vera)** | Mutation ponctuelle hétérozitgote dans le gène JAK2 | Augmentation de l'érythropoïèse | Progéniteurs hématopoïétiques | (Ye et al., 2009) |
| **Progeria (syndrome de Hutchinson-Gilford)** | Mutation dans le gène LMNA | Accélération de la sénescence cellulaire, accumulation de progérine, altération de l'ADN, anomalie nucléaire, inclusions dans les cellules musculaire lisses qui sont corrigées par réparation du gène. | Cellules musculaires lisses | (Ho et al., 2011a; Liu et al., 2011a, 2011b; Zhang et al., 2011a) |
| **Rétinite pigmentaire** | Mutation dans les gènes RP1, RP9, PRPH2 ou RHO. | Diminution du nombre de cellules en bâtonnet et expression de marqueur de stress cellulaire. | Progéniteurs rétiniens, Précurseurs de photorécepteurs, cellules pigmentaires de l'épithélium de la rétine et cellules photoréceptrices en bâtonnet. | (Jin et al., 2011) |
| **Schizophrénie** | Inconnue | Diminution des connexions neuronales dans les neurones issus d'iPS de patients et diminution du nombre de neurites, de l'expression de PSD95 et du récepteur au glutamate. Le traitement avec de la loxapine augmente la connectivité neuronale. | Neurones | (Brennand et al., 2011) |
| **Sclérodermie** | Inconnue | Non déterminé | Aucun | (Somers et al., 2010) |
| **Sclérose latérale amyotrophique familiale** | Mutation dans le gène SOD1 | Non déterminé | Motoneurones et cellules gliales | (Dimos et al., 2008) |
| **Sclérose latérale amyotrophique familiale** | Mutation P56S dans le gène VAPB | Réduction dans le niveau de VAPB dans les fibroblastes, les iPS et les motoneurones dérivés des iPS de patients. | Motoneurones | (Mitne-Neto et al., 2011) |
| **Sclérose latérale amyotrophique familiale** | Mutation M337V ou Q334R, M337V et 298S dans le gène TARDBP | Accumulation de TDP43 soluble et insoluble dans les iPS et dans des populations neuronales contenant des motoneurones | Motoneurones | (Bilican et al., 2012; Egawa et al., 2012) |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | | issus d'iPS de patients M337V. Sensibilité au stress oxydatif accrue des motoneurones. | | |
| **Syndrome de Crigler-Najjar** | Mutation dans le gène UGT1A1 | Non déterminé | Hépatocytes | (Ghodsizadeh et al., 2010) |
| **Syndrome de Down** | Trisomie 21 | Non déterminé | Aucun | (Park et al., 2008a) |
| **Syndrome de Lesch-Nyhan** | Hétérozygotie du gène HPRT1 | Non déterminé | Aucun | (Park et al., 2008a) |
| **Syndrome de Rett** | Mutation dans le gène MECP2 | Diminution du nombre de synapses, réduction du nombre d'épines dendritiques et mobilité du rétrotransposon LINE1 élevée. | Progéniteur neuraux, neurones | (Hotta et al., 2009; Marchetto et al., 2010) |
| **Syndrome de Shwachman-Bodian-Diamond** | Mutation dans le gène SBDS | Non déterminé | Aucun | (Park et al., 2008a) |
| **Syndrome de Werner atypique** | Mutation dans le gène LMNA | Anomalie de la membrane nucléaire. Augmentation de la sénescence et de la susceptibilité à l'apoptose des iPS. | Aucun | (Ho et al., 2011a) |
| **Syndrome du long QT** | Mutation dans le gène codant KCNQ1 ou KCNH2 | Arythmogénicité dans les cellules cardiaques corrigée par un traitement avec de la ranolazine | Cardiomyocytes | (Itzhaki et al., 2011) |
| **Syndrome du X fragile** | Expansion de triplet CGG causant l'extinction de l'expression du gène FMR1 | Non déterminé | Aucun | (Urbach et al., 2010) |
| **Syndrome LEOPARD** | Mutation hétérozygote dans le gène PTPN11 | Hypertrophie des cardiomyocytes, localisation nucléaire de NFATC4. | Cardiomyocytes | (Carvajal-Vergara et al., 2010) |
| **Tyrosinémie de type I** | Mutation dans le gène de la fumarylacetoacetate hydrolase | Non déterminé | Hépatocytes | (Ghodsizadeh et al., 2010) |
| **β-thalassémie** | Délétion dans le gène de la β-globine | Non déterminé | Cellules hématopoïétiques | (Hussein et al., 2011) |

**Tableau 8 :** Pathologies humaines pour lesquels des iPS ont été générées à partir de cellules de patients. Les types cellulaires différenciés à partir des iPS sont également indiqués. Adapté de (Grskovic et al., 2011a; Robinton and Daley, 2012).

### 6.3.8. Criblage moléculaire thérapeutique

Un autre grand intérêt des cellules iPS est la possibilité de les utiliser pour mettre en place des plateformes de criblage moléculaire. Ce type de procédé est déjà utilisé avec des cellules ES et permet de rechercher des composés moléculaires qui pourraient affecter la capacité des cellules ES à s'auto-renouveler, à survivre ou à se différencier (Maury et al., 2012) (Figure 19). Néanmoins, au vu des capacités de différenciation des cellules ES humaines, la mise en place de systèmes de criblage à partir de cellules différenciées à partir des cellules ES semble encore plus intéressante.

Dans ce contexte, les cellules iPS présentent un grand intérêt, puisqu'il serait possible de réaliser ce criblage directement sur les cellules d'intérêt dérivées de patient. Différentes études menées sur des cellules différenciées à partir d'iPS ont montré qu'il serait possible d'utiliser ces cellules pour tester des composés moléculaires (Ebert et al., 2009; Lee et al., 2009; Brennand et al., 2011). Mais afin de pouvoir mettre en place ce type d'analyse, il est nécessaire de disposer de cellules différenciées homogènes, en grande quantité et qui présentent un phénotype caractéristique de la maladie. La mise en place de tels systèmes pour des cultures de cellules comme les neurones qui peuvent nécessiter pour certains sous-types des protocoles de différenciation de plusieurs semaines semble compliquée. Par contre, les PNs qui peuvent être facilement amplifiés et conservés congelés pourraient être plus appropriés.

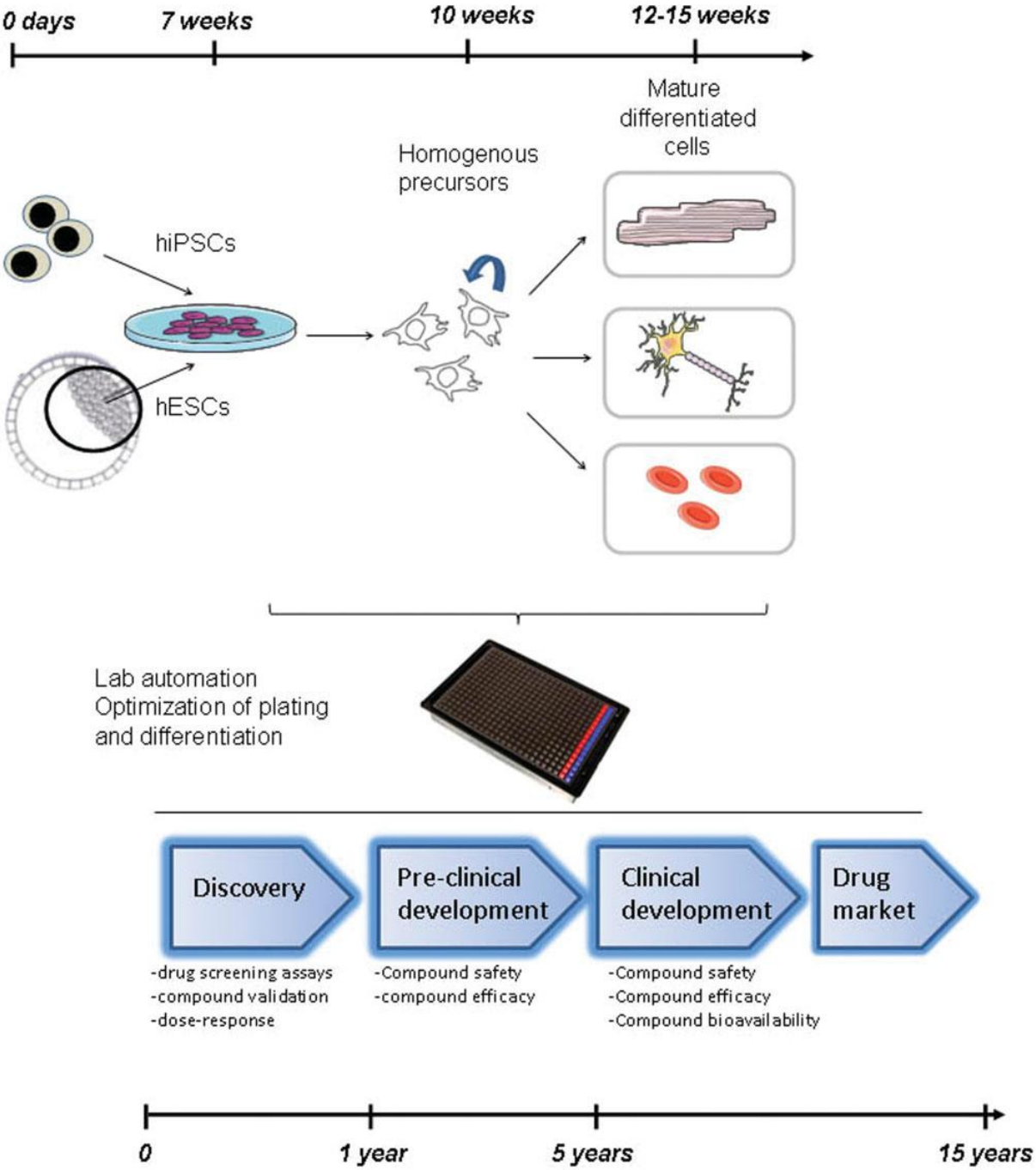



**Figure 19.** La génération de cellules souches pluripotentes peut être adaptée pour le criblage à au débit (Maury et al., 2012). Les cellules pluripotentes d'origine embryonnaire ou reprogrammées peuvent être induites à se différencier en type cellulaires déterminés de l'organisme humain. Des précurseurs du tissu d'intérêt peuvent être utilisés pour un criblage pré-clinique de molécules et ainsi identifier de nouveaux composés et évaluer leur efficacité et leur innocuité dans des cellules plus spécialisées. Ces résultats précliniques pourraient alors être utilisés dans les étapes suivantes du développement de ces médicaments.

### 6.3.9. Thérapie cellulaire

Enfin, une autre application possible des cellules iPS humaines est la thérapie cellulaire. En effet, comme pour les cellules ES humaines, leur capacité à former l'intégralité des cellules de l'organisme permet d'envisager de les utiliser comme source de cellules spécialisées pouvant être greffées chez les patients. De plus, contrairement aux cellules ES humaines, les cellules iPS peuvent être patient-spécifique et pourraient permettre de résoudre les risques immunologiques inhérents aux greffes.

Un certain nombre de problèmes posés par ces cellules iPS humaines nécessite cependant d'être résolu avant une utilisation médicale.

Le premier point concerne la méthode de génération des iPS. L'utilisation de vecteurs intégratifs ne pourra pas être faite pour la reprogrammation. Mais, comme nous l'avons vu au Chapitre 7.3.5, des méthodes alternatives ont aujourd'hui été développées et devront être les méthodes choisies pour une application de thérapie cellulaire. Un second point concerne la propension des iPS, comme des ES, à former des tumeurs lorsqu'elles sont greffées *in vivo*. Le développement de protocoles de différenciation très définis associés à la mise au point de méthodes de tri cellulaire permettant d'éliminer les cellules insuffisamment différenciées pouvant former des tumeurs, sera nécessaire pour greffer ces cellules dans les meilleures conditions de sécurité à des patients. Enfin, comme nous en reparlerons dans la Discussion, au Chapitre 3.2, la présence de mutations génétiques dans les iPS pourrait également présenter un frein à leur utilisation.

Plusieurs études dans des modèles animaux ont montré la capacité de cellules différenciées à partir de cellules ES ou iPS à s'intégrer durablement dans les tissus et éventuellement à améliorer un phénotype pathologique (Carr et al., 2009; Hargus et al., 2010; Lamba et al., 2010; Tucker et al., 2011; Yan et al., 2011; Fujimoto et al., 2012). D'autre part, deux essais cliniques utilisant des cellules différenciées à partir de cellules ES humaines ont déjà été autorisés aux Etats Unis. Le premier a été réalisé par la société Geron. Il a été conduit sur des patients ayant subit une lésion de la moelle épinière. Il a consisté en la greffe de précurseurs d'oligodendrocytes différenciés à partir de cellules ES humaines dans la moelle épinière de ces patients. Cet essai a été arrêté après le traitement de deux patients pour des raisons financières. Les résultats des greffes chez ces deux patients ne sont pas connus. Le second essai autorisé est actuellement réalisé par la société Advancedcell. Il concerne la maladie de Stargardt (Dégénérescence maculaire juvénile) et la dégénérescence maculaire liée à l'âge. Cet essai est basé sur la greffe de cellules pigmentaires de l'épithélium rétinien différenciées à partir de cellules ES humaines. Des premiers résultats ont été publiés (Schwartz et al., 2012) et semblent indiquer l'absence d'inflammation et d'hyper-prolifération des cellules, et l'intégration des

cellules greffées dans l'épithélium pigmentaire rétinien de patients. Il semblerait également que la vision des patients soit améliorée. Ce dernier essai suggère donc que les cellules souches pluripotentes pouraient être utilisées en thérapie cellulaire.

Les quelques études réalisées à ce jour à partir de cellules différenciées dérivées de cellules iPS ou des ES humaines indiquent qu'elles possèdent un fort potentiel pour la thérapie cellulaire. Néanmoins, de plus amples analyses et mises au point sont nécessaires avant de pouvoir greffer ces cellules à de nombreux patients.

# Objectifs

En 2008 la technologie permettant la reprogrammation de cellules somatiques en cellules iPS avait été décrite à partir de cellules murines depuis 2 ans (Takahashi and Yamanaka, 2006) et depuis moins d'un an à partir de cellules humaines (Takahashi et al., 2007).

La première étape de mon projet de thèse à été de développer les outils nécessaires pour reprogrammer des fibroblastes humains en cellules iPS, de développer les techniques nécessaires à la culture de ces cellules, ainsi que celles permettant de les caractériser. J'ai ensuite mis au point des protocoles de différenciation des cellules iPS en cellules neurales et j'ai analysé et recherché des défauts pathologiques dans les cellules iPS et les cellules différenciées potentiellement affectées dans des pathologies neurodégénératives.

Lorsque j'ai commencé mes travaux, seules deux études décrivant la génération de cellules iPS à partir de fibroblastes de malades avaient été publiées (Dimos et al., 2008; Park et al., 2008a). L'étude réalisée par Dimos et col. a montré que des fibroblastes de patients très âgés (82 et 89 ans), et atteints de SLA familiale causée par une mutation dans le gène SOD1 (L144F) pouvaient être reprogrammés en cellules iPS. Ces cellules ont ensuite été différenciées en motoneurones, mais aucune analyse phénotypique n'a été décrite. L'étude menée par Park et col. a décrit la génération de cellules iPS à partir de cellules de patients atteints de différentes pathologies telles que la trisomie 21 (ou syndrome de Down), la maladie de Gaucher de type III, la dystrophie musculaire de Duchenne, la chorée de Huntington ou encore la maladie de Parkinson. Cependant, comme pour l'étude de Dimos et col., aucun phénotype associé à ces pathologies n'a été décrit. En conclusion, ces deux études ont apporté la preuve qu'il était possible de reprogrammer en cellules iPS des cellules somatiques de malades jeunes ou agés et atteints de maladies neurodégénératives, mais le fait que les cellules iPS pouvaient permettre de modéliser des pathologies humaines n'était pas démontré.

Afin d'utiliser les cellules iPS comme outils de modélisation de maladies neurodégénératives, il était alors indispensable de montrer que les cellules générées à partir des cellules iPS de patients pouvaient présenter des phénotypes caractéristiques de la maladie. Sachant que la plupart des maladies neurodégénératives se déclarent tardivement et que le processus de reprogrammation en cellules iPS entraine un rajeunissement des cellules à un stade équivalent au stade embryonnaire, il n'était pas acquis que les neurones générés à partir d'iPS de patients présenteraient spontanément des défauts caractéristiques des pathologies.

D’autre part les maladies neurodégénératives incluent des formes génétiques et des formes sporadiques sans cause connue. Avant de s’intéresser à des formes sporadiques, il nous est apparu nécessaire de montrer qu’il était possible de créer des modèles de maladies neurodégénératives monogéniques à forte pénétrance, pour lequel des phénotypes connus étaient décrits chez la souris ou dans des biopsies post-mortem humaines afin de pouvoir valider le modèle iPS comme un outil d’étude, pour ensuite pouvoir élucider de nouveaux mécanismes pathologiques.

Dans un premier travail, je me suis intéressé à la mise en place d’un modèle humain pour la maladie neurodégénérative infantile monogénique : la MPSIIIB.

Cette maladie est étudiée dans le laboratoire depuis de nombreuses années. Les causes de cette maladie sont bien déterminées aux niveaux génétique et biochimique et cette maladie dispose d’un modèle murin reproduisant la pathologie humaine. A l’aide de ce modèle et de biopsies post-mortem, le laboratoire (Cressant et al., 2004; Ausseil et al., 2008; Hocquemiller et al., 2010; Vitry et al., 2010) et d’autres groupes (Hadfield et al., 1980; Ryazantsev et al., 2007; Ohmi et al., 2009) ont réalisées des études qui ont permis de mieux comprendre les processus pathologiques. Ainsi un certain nombre de caractéristiques ont été décrites telles que l’accumulation de vésicules distendues dans les cellules neurales ou l’accumulation secondaire de gangliosides (Hadfield et al., 1980; Tamagawa et al., 1985). Néanmoins, le lien entre l’accumulation d’HS partiellement dégradés et le dysfonctionnement des neurones demeure indéterminé. Dans ce contexte les objectifs de mon travail étaient de i) générer un modèle iPS humain de la maladie, ii) valider ce modèle en reproduisant dans les neurones humains des phénotypes précédemment décrits chez la souris ou l’homme, et iii) identifier de nouveaux mécanismes impliqués dans le processus neurodégénératif. Ces travaux sont décrits dans l’article 1 et les résultats de la Partie 2.

La seconde partie de mon travail a porté sur la génération d’un modèle cellulaire humain pour la SLA.

Ce syndrome neurodégénératif se déclare en général vers l’âge de 50 ans et la plupart des cas sont d’origine inconnue. Nous avons choisi de modéliser une forme génétique et juvénile de SLA: la forme ALS2/Alsine. Les mutations dans le gène ALS2 entrainent des formes infantiles ou juvéniles de maladies des motoneurones. La perte de fonction de la protéine Alsine entraine la dégénérescence des motoneurones supérieurs dès le plus jeune âge des patients (début entre 0 et 6 ans). Les motoneurones supérieurs sont des neurones pyramidaux glutamatergiques situés dans le cortex moteur. Ils sont directement connectés aux motoneurones inférieurs. Suivant les formes, les motoneurones inférieurs peuvent également être affectés. Les motoneurones inférieurs sont situés dans le bulbe et dans la moelle

épinière, ce sont des neurones cholinergiques et ils sont directement connectés aux muscles.

Il n'existe pas aujourd'hui de bon modèle d'étude de cette forme de SLA. En effet, les souris invalidées pour le gène codant l'alsine ne reproduisent pas ou peu la maladie humaine (Cai et al., 2008). De plus, à l'heure actuelle, il n'y a pas eu d'analyses possibles sur des biopsies post-mortem de patients. Ainsi, les seuls modèles disponibles pour modéliser la maladie sont des modèles de sur- ou sous-expression du gène. Des phénotypes ont été mis en évidence soit dans des cellules où l'expression du gène était éteinte par des ARNsh (Jacquier et al., 2006, 2009), soit dans le modèle du poisson zèbre chez qui l'expression de la protéine a été éteinte par des morpholinos antisens (Gros-Louis et al., 2008). Les phénotypes sont principalement liés à des perturbations du trafic vésiculaire et de la croissance axonale. Les objectifs de mon travail étaient de i) générer un modèle iPS humain de la maladie et ii) valider ce modèle en reproduisant dans les neurones humains les phénotypes précédemment décrits ci-dessus, afin de mieux comprendre la physiopathologie de cette maladie. Ces travaux sont décrits dans la Partie 3 des résultats.

# Résultats

## 1. Modélisation de défauts neuronaux associés à la mucopolysaccharidose de type IIIB à l'aide de cellules souches pluripotentes induites humaines - (Article 1).

### Résumé

### *1.1. Introduction.*

Les maladies neurodégénératives sont principalement des maladies qui touchent l'adulte. Néanmoins, certaines sont aussi des maladies infantiles. Ces formes sont le plus souvent provoquées par des défauts dans le métabolisme comme dans le cas des maladies de surcharge lysosomale.

Ces pathologies sont provoquées par une interruption dans les voies de dégradation et de recyclage. Les défauts génétiques et biochimiques en causes sont bien décrits, mais malgré la génération de modèles murins et l'utilisation de modèles cellulaires, la cascade des évènements partant de l'accumulation de métabolites partiellement dégradés et aboutissant à la dégénérescence des neurones reste mal connue.

La mucopolysaccharidose de type IIIB ou MPSIIIB est une maladie lysosomale causée par une déficience en enzyme NAGLU. Cette maladie se traduit par une sévère atteinte neurologique des enfants qui contraste avec des atteintes périphériques modérées. Les altérations dans cette pathologie sont prédominantes dans le SNC. L'étude des cellules du SNC est donc indispensable pour comprendre les mécanismes conduisant à la neurodégénerescence.

Une des principales caractéristiques de la maladie est la présence dans le SNC de vacuoles intra-cytoplasmiques avec des caractéristiques de lysosomes. Ceci a été montré à la fois au stade terminal de la maladie dans des biopsies post-mortem de patients et dans le SNC de souris MPSIIIB. Il a également été montré que ces vacuoles étaient associées à des altérations de l'appareil de Golgi et à une expression modifiée de la protéine de la matrice golgienne GM130. Ces derniers résultats ont été obtenus dans le laboratoire en même temps que le travail décrit ici était réalisé (Vitry et al., 2010; Roy et al., 2012).

La reprogrammation de fibroblastes de patients en cellules iPS permettant pour la première fois un accès à des neurones humains, nous avons généré un modèle humain unique de MPSIIIB afin de pouvoir étudier la pathologie au cours de la différenciation de la cellule souche iPS vers le précurseur neural et le neurone mature.

## *1.2. L'isolement des cellules iPS de patients MPSIIIB a nécessité l'apport de l'enzyme manquante aux cellules.*

Des cultures de fibroblastes de peau ont été établies pour un volontaire sain et deux patients atteints de MPSIIIB. Ces cellules ont été obtenues du Centre de Ressources Biologiques de Lyon et toutes les autorisations pour les manipuler ont été obtenues en accord avec la loi.

Aucune activité de l'enzyme NAGLU n'a été détectée dans les cellules des patients par rapport au contrôle. Les fibroblastes ont été reprogrammés à l'aide de vecteurs rétroviraux codant soit pour les quatre facteurs de reprogrammation (OCT4, SOX2, KLF4 et c-MYC) dans le cas du « patient 1 » et des fibroblastes contrôles, soit avec uniquement trois facteurs (OCT4, SOX2, KLF4) dans le cas du « patient 2 » et de fibroblastes contrôles. Ces fibroblastes génétiquement modifiés ont ensuite été cultivés sur un tapis de cellules nourricières. Ces cellules sont des fibroblastes embryonnaires murins irradiés appelés iMEF. Des clones présentant la morphologie de cellules ES humaines et exprimant l'alcaline phosphatase ont commencé à apparaitre après 3 à 4 semaines chez les contrôles comme chez les patients, indiquant que l'efficacité de reprogrammation étant similaire chez les patients et les contrôles (0,1% des fibroblastes de départ avec les 4 vecteurs et 0,01% sans c-MYC). Alors que les clones de cellules iPS issus des fibroblastes contrôles ont rapidement proliféré et ont pu être clonés et amplifiés efficacement (87,5%), les clones d'iPS de patients ont peu ou pas proliféré et l'efficacité de clonage a été très faible (2,5%) (Figure Supplémentaire 1).

Les cellules iPS humaines, tout comme les cellules ES humaines, ont besoin du bFGF pour proliférer. La fixation du bFGF à son récepteur nécessite des interactions avec des protéoglycanes d'HS. Or, les cellules MPSIIIB accumulent des HS partiellement dégradés qui sont en partie rejetés dans le milieu extracellulaire. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'accumulation d'HS partiellement dégradés dans les cellules iPS de patients pouvait perturber la signalisation par le bFGF et ainsi empêcher la prolifération des clones d'iPS émergents.

L'enzyme lysosomale NAGLU étant en partie sécrétée dans le milieu extracellulaire et pouvant être endocytée par les cellules avoisinantes via le recepteur au mannose-

6-phosphate, nous avons modifié génétiquement les iMEF sur lesquelles prolifèraient les iPS pour qu'elles sécrètent de grande quantité d'enzyme dans le milieu de culture afin de transcomplémenter les cellules de patients (iMEF-NAGLU). Dans ces conditions, les clones de cellules iPS de patients sont apparus, ont proliféré comme les contrôles et ont pu être isolés efficacement (83,3%).

Trois clones de cellules iPS ont été ensuite choisis pour chaque culture de fibroblastes afin de réaliser des caractérisations détaillées.

### *1.3. Caractérisation des clones d'iPS.*

Une fois les clones de cellules iPS générés, isolés et amplifiés, la première étape a été de s'assurer qu'ils avaient des caractéristiques de cellules souches pluripotentes (Figure 1). Pour ce faire, nous avons vérifié que les cellules iPS possédaient les caractéristiques moléculaires et fonctionnelles des cellules ES humaines. Au niveau moléculaire, nous avons montré que les cellules iPS de patients, comme celles des contrôles exprimaient les marqueurs de pluripotence tels que les marqueurs de surface SSEA-4 et TRA-1-60, et les facteurs de transcription OCT4 et NANOG (Figure 1A).

D'autre part, il a été montré que les promoteurs des vecteurs rétroviraux utilisés pour reprogrammer les cellules étaient inactivés dans les cellules souches pluripotentes (Takahashi et al., 2007). Nous avons analysé l'expression des vecteurs transduits par RT-PCR quantitative et nous avons montré une extinction des vecteurs rétroviraux dans les clones d'iPS générés (Figure 1B). De plus, lors de la reprogrammation, des modifications épigénétiques ont lieu, comme la déméthylation de promoteurs de gènes tels qu'OCT4 ou NANOG qui sont impliqués dans la pluripotence des cellules. Nous avons montré que le promoteur du gène OCT4 était déméthylé dans les clones d'iPS (Figure 1D).

Au niveau fonctionnel, nous avons montré que les cellules iPS étaient capables de former des tératomes contenant des cellules des trois feuillets embryonnaires six semaines après injection dans les muscles de souris immunodéficientes (Figure1E).

L'ensemble de ces résultats a indiqué que tous les clones de cellules iPS générés à partir des cellules de patients et du sujet contrôle étaient correctement reprogrammées en cellules pluripotentes.

## *1.4. Les cellules iPS de patients ont accumulé des vésicules de surcharge et ont présenté des altérations de l'appareil de Golgi.*

Afin de reproduire les conséquences pathologiques de la MPSIIIB, il a été nécessaire de priver les cellules iPS des patients de l'enzyme apportée par les iMEF-NAGLU. Pour ce faire, les cellules iPS de patients ont été cultivées sur une matrice de Matrigel$^{TM}$ en présence de bFGF. Après 10 jours dans ces conditions de culture, aucune activité enzymatique de la NAGLU n'a été détectée et nous avons observé que les cellules souches iPS de patients accumulaient une forte quantité d'HSO, ainsi que de nombreuses vésicules distendues exprimant le marqueur lysosomal LAMP1 (Figure 2A, 2B). L'observation par microscopie électronique de ces vésicules a montré que leur contenu était très hétérogène (Figure 2D), comme décrit précedemment dans des neurones murins ou humains post-mortem (Hadfield et al., 1980; Tamagawa et al., 1985; Vitry et al., 2010). Par ailleurs, les cellules iPS de patients accumulaient la protéine LAMP1 alors que l'expression de l'ARNm de celle-ci n'était pas modifiée (Non montré).

Des altérations de l'appareil de Golgi ayant été décrites dans les neurones de souris MPSIIIB pendant la mise en place de ce modèle (Vitry et al., 2010), nous avons analysé si ces mêmes altérations étaient également présentes dans les cellules souches pluripotentes humaines des patients. Nous avons montré que la protéine golgienne GM130 était présente dans la membrane des vésicules distendues et s'accumulaient dans les cellules iPS (Figure 2B,C et F). L'observation de la structure de l'appareil de Golgi en microscopie électronique a révélé que celui-ci était désorganisé avec des citernes fragmentées, une accumulation de vésicules et l'apposition de vésicules de surcharge à proximité des saccules (Figure 2 E). Or, la vésicularisation de l'appareil de Golgi durant la mitose n'était pas affectée, ce qui a montré que le trafic vésiculaire n'était pas altéré.

Nous avons donc montré que des cellules souches de patients MPSIIIB présentaient une vacuolisation cellulaire identique à celle décrite dans des cellules du SNC chez la souris et dans les cerveaux de patients, et des défauts de l'appareil de Golgi décrits dans les neurones de souris MPSIIIB par des chercheurs du laboratoire (Vitry et al., 2010). Ces résultats ont montré pour la première fois que des défauts caractéristiques de la maladie étaient présents dans des cellules souches humaines.

## *1.5. Pluripotence des cellules iPS de patients.*

*In vivo*, les cellules iPS de patients ont formé des tératomes contenant les cellules issues des trois feuillets embryonnaires. Mais, dans ces conditions, les cellules iPS

de patients étaient dans un environnement capable d'éliminer les HSO qui s'accumulaient puisque les souris greffées étaient normales et donc pouvaient fournir l'enzyme manquante aux cellules greffées. Afin d'étudier la différenciation vers les trois feuillets embryonnaires dans des cellules iPS de patients en l'absence d'enzyme, les cellules ont été cultivées sans iMEF-NAGLU, en suspension pendant 10 jours, afin de former des corps embryonnaires. Après ce délai, aucune activité enzymatique de la NAGLU n'était détectable (Figure supplémentaire 4). Nous avons aussi montré que l'activité catalytique d'autres enzymes lysosomales était affectée comme cela est fréquemment observé dans les maladies de surcharge lysosomale (Figure supplémentaire 4). Après adhésion des corps embryonnaires, nous avons montré que les cellules présentes dans les corps embryonnaires issus des iPS de patients se différenciaient normalement en cellules des trois feuillets embryonnaires et ceci malgré une accumulation de vésicules élargies exprimant LAMP1 (Figure 4). Nous avons ainsi montré que, dans ce test, la différenciation des iPS de patient n'était pas affectée.

### *1.6. Les précurseurs neuraux issus des cellules iPS de patients ont présenté des profils d'expression génique modifiés.*

La MPSIIIB étant une maladie qui affecte principalement le SNC, nous avons développé des protocoles pour différencier les cellules iPS en précurseurs neuraux et en neurones. Dans ce but, les cellules iPS ont été cultivées en suspension dans un milieu induisant la formation de neurosphères. Après deux semaines, les cellules qui composaient les neurosphères exprimaient le marqueur de progéniteur neural nestine et accumulaient des GAG incluant les HSO (Figure 5B). De façon intéressante, les précurseurs neuraux MPSIIIB n'ont pas montré d'accumulation de vésicules élargies positives pour le marqueur LAMP1 ou de GM130 (Figure 5C). Ces cellules de patients n'avaient pas de propension apoptotique particulière et leur observation en microscopie électronique n'a révélé que de rares vacuoles de surcharge et peu d'altération de l'appareil de Golgi.

Afin de savoir si l'accumulation des HSO modifiait des fonctions biologiques même en l'absence de pathologie cellulaire majeure, nous avons réalisé des profils d'expression génique de cellules accumulant ou non des HSO. Nous nous sommes intéressés d'une part aux fibroblastes du patient 2 corrigés ou non à l'aide d'un vecteur lentiviral surexprimant l'enzyme manquante, et d'autre part aux neurosphères du même patient en comparaison de neurosphères contrôles.

Dans les fibroblastes, seuls 50 ARNm ont montré des niveaux d'expression qui différaient comparativement aux fibroblastes corrigés. Par contre dans les neurosphères, 3280 ARNm avaient des niveaux d'expression altérés.

Certains gènes avaient des expressions modifiées dans les deux types cellulaires. Vingt trois gènes sur les 50 ayant une expression modifiée dans les fibroblastes étaient également modifiés dans les neurosphères. Ces gènes codaient pour des constituants de la matrice extracellulaire et pour des molécules d'interactions des cellules avec la matrice. L'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans l'adhérence des cellules et dans la transduction des signaux extracellulaires était également perturbée (Table supplémentaire 1).

Ces résultats nous ont permis de poser de nouvelles questions sur le rôle des HS non dégradés dans la maladie et les conséquences de leur accumulation sur divers processus cellulaires comme la communication cellulaire, l'adhésion, la mobilité et la guidance axonale. Alors que la MPSIIIB n'est pas une maladie du développement, nous avons observé que des perturbations des processus développementaux étaient possibles avec des modifications dans l'expression de gènes impliqués dans le développement du mésoderme et de l'ectoderme, dans la neurogénèse et l'angiogénèse. Cette observation était en accord avec les défauts pathologiques observés dans les cellules souches iPS des patients. Enfin, l'expression de nombreux gènes codant pour les protéines lysosomales ou golgiennes était modifiée dans les neurosphères mais pas dans les fibroblastes. Tous les gènes affectés codant des protéines lysosomales (hydrolases, pompes à protons, transporteurs membranaires…) étaient sous-régulés sauf DRAM (damage-regulated autophagy modulator) et CD1d. Les gènes golgiens affectés étaient tous sous-régulés sauf GOLM1 (Table supplémentaire 1).

### *1.7. Les neurones de patients ont montré de fortes lésions de surcharge et des atteintes de l'appareil de Golgi.*

Les précurseurs neuraux ont ensuite été dissociés et les cellules ont été mises à adhérer sur des lamelles couvertes de poly-ornithne et de laminine afin de différencier les cellules en neurones matures. Les populations de neurones obtenues étaient en majorité GABAergiques et la cinétique de différenciation était équivalente entre les patients et les contrôles (Figure 6B).

Alors que les précurseurs neuraux en suspension présentaient peu d'altérations, les neurones de patients cultivés pendant 5 semaines ont présenté une accumulation importante de vésicules distendues exprimant LAMP1 (Figure 7A). L'analyse ultrastructurale en microscopie électronique a révélé que ces vésicules étaient morphologiquement similaires avec celles présentes dans les cellules iPS de patients (Figure 6D). D'autre part, les neurones de patients présentaient une accumulation des protéines LAMP1 et GM130 (Figure 3E et F). Le marquage de la protéine GM130 en immunofluorescence a montré de fréquentes extensions de l'appareil de

Golgi dans les neurites. Une quantification précise a montré une dispersion plus importante des signaux GM130 loin des corps cellulaires (Figure 7D). En microscopie électronique, les cellules présentant une morphologie de neurones présentaient de nombreuses altérations de l'appareil de Golgi avec des fragmentations de saccules et des associations de vacuoles de surcharge aux citernes (Figure 7E). Par quantification nous avons montré que plus de la moitié des complexes golgiens étaient désorganisés dans les neurones de patients (Figure 7E). Néanmoins, la déstructuration de l'appareil de Golgi en réponse au traitement par la Brefeldine A s'est faite normalement dans les cellules de patients, suggérant un trafic vésiculaire efficace dans les compartiments pré-golgiens (Figure supplémentaire 2).

## *1.8. Conclusion.*

Dans ce travail nous avons montré qu'il était possible de créer un modèle humain de la MPSIIIB. Pour cela nous avons généré des iPS de deux patients MPSIIIB qui ont été différenciées en précurseurs neuraux et en neurones matures. Nous avons montré que non seulement les neurones mais également les cellules iPS des deux patients présentaient des altérations structurales subcellulaires très marquées et similaires aux phénotypes précédemment décrits dans le SNC du modèle MPSIIIB de souris et chez les patients. Nous avons également montré que les mêmes altérations phénotypiques étaient discrètes à la fois au niveau des fibroblastes « parentaux » et des précurseurs neuraux. Cette étude a ainsi permis de comparer pour la première fois des défauts pathologiques dans différents types cellulaires humains.

Notre étude a également permis d'identifier des mécanismes possiblement altérés dans la pathologie avec l'analyse des profils d'expression génique dans les fibroblastes et les précurseurs neuraux humains MPSIIIB. Ces modifications semblaient affecter préférentiellement des gènes impliqués dans la constitution de la matrice extracellulaire et dans les interactions cellule-matrice. Ces résultats ont suggéré que la réponse aux signaux environnementaux pouvait être altérée chez les cellules de patients avec des conséquences notamment sur la polarisation, la migration cellulaire et de la neuritogénèse.

HMG Advance Access published June 30, 2011

*Human Molecular Genetics, 2011* **1–14**
*doi:10.1093/hmg/ddr285*

# Modeling neuronal defects associated with a lysosomal disorder using patient-derived induced pluripotent stem cells

**Thomas Lemonnier[1,2], Stéphane Blanchard[1,2], Diana Toli[1,2], Elise Roy[1,2], Stéphanie Bigou[1,2], Roseline Froissart[3,4], Isabelle Rouvet[5], Sandrine Vitry[1,2], Jean Michel Heard[1,2] and Delphine Bohl[1,2,*]**

[1]Institut Pasteur, Unité Rétrovirus et Transfert Génétique, 28 rue du Dr Roux, F-75015 Paris, France, [2]INSERM U622, F-75015 Paris, France, [3]Laboratoire des Maladies Héréditaires du Métabolisme, Centre de Biologie Est, Hospices Civils de Lyon, F-69677 Bron, France, [4]INSERM U820, Université Claude Bernard, F-69008 Lyon, France and [5]Centre de Biologie Cellulaire, GHE, Hospices Civils de Lyon, 59 Bd Pinel, 69500 Bron, France

Received April 22, 2011; Revised and Accepted June 14, 2011

Downloaded from hmg.oxfordjournals.org at Institut Pasteur M?diath?que Scientifique on July 22, 2011

**By providing access to affected neurons, human induced pluripotent stem cells (iPSc) offer a unique opportunity to model human neurodegenerative diseases. We generated human iPSc from the skin fibroblasts of children with mucopolysaccharidosis type IIIB. In this fatal lysosomal storage disease, defective α-*N*-acetylglucosaminidase interrupts the degradation of heparan sulfate (HS) proteoglycans and induces cell disorders predominating in the central nervous system, causing relentless progression toward severe mental retardation. Partially digested proteoglycans, which affect fibroblast growth factor signaling, accumulated in patient cells. They impaired isolation of emerging iPSc unless exogenous supply of the missing enzyme cleared storage and restored cell proliferation. After several passages, patient iPSc starved of an exogenous enzyme continued to proliferate in the presence of fibroblast growth factor despite HS accumulation. Survival and neural differentiation of patient iPSc were comparable with unaffected controls. Whereas cell pathology was modest in floating neurosphere cultures, undifferentiated patient iPSc and their neuronal progeny expressed cell disorders consisting of storage vesicles and severe disorganization of Golgi ribbons associated with modified expression of the Golgi matrix protein GM130. Gene expression profiling in neural stem cells pointed to alterations of extracellular matrix constituents and cell–matrix interactions, whereas genes associated with lysosome or Golgi apparatus functions were downregulated. Taken together, these results suggest defective responses of patient undifferentiated stem cells and neurons to environmental cues, which possibly affect Golgi organization, cell migration and neuritogenesis. This could have potential consequences on post-natal neurological development, once HS proteoglycan accumulation becomes prominent in the affected child brain.**

## INTRODUCTION

Although neurodegenerative disorders are mostly prevalent in the elderly, they also occur early in life. In infants and children, inborn errors of metabolism, in particular lysosomal storage diseases (LSDs), represent the most frequent cause of neurodegeneration. LSDs result from inefficient recycling of macromolecule catabolites, which accumulate and cause a multitude of clinical symptoms, including progressive mental retardation.

Whereas primary genetic and biochemical disorders are well described in LSDs, the limitations of currently available study models hampered accurate exploration of downstream cascades of events. Investigations in mouse models or in

*To whom correspondence should be addressed at: Unité Rétrovirus et Transfert Génétique, INSERM U622, Département de Neuroscience, Institut Pasteur, 28 rue du Dr Roux, 75015 Paris, France. Tel: +33 145688412; Fax: +33 145688940; Email: delphine.bohl@pasteur.fr

© *The Author 2011. Published by Oxford University Press. All rights reserved.*
*For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com*

patient cell cultures identified disorders consistent with cell autonomous dysfunctions. They affect endocytosis (1,2), macro-autophagy (3), calcium homeostasis (4,5), mitochondria (6), endoplasmic reticulum homeostasis (7,8), phospholipid synthesis (9,10), neurite outgrowth (5,11) and neural stem cell production, migration and differentiation (12). In the central nervous system (CNS), neural cell disorders are associated with neuroinflammation, which presumably aggravates neurodegeneration (13). However, the relevance of cell disorders to the neurological manifestations observed in children remains unclear.

Mucopolysaccharidosis IIIB (MPSIIIB, Sanfilippo syndrome type B) is an LSD caused by α-*N*-acetylglucosaminidase (NAGLU, EC 3.2.1.50) deficiency, a lysosomal hydrolase involved in heparan sulfate (HS) proteoglycan degradation. Severe neurological manifestations contrast with mild expression of the disease in peripheral organs. The onset of behavioral changes is at 3–5 years of age, followed by progressive mental retardation and premature death (14). Patient autopsy revealed storage lesions in the CNS, macrophages, liver and kidney epithelial cells, but not in other tissues (15–17). Similar pathology was observed in the mouse model of the disease (18,19). Predominance of pathology in the CNS emphasizes the importance of analyzing neural cells and neurons to elucidate pathophysiology. Intracellular vacuoles with characteristics of lysosomes in brain cells is the pathological hallmark of the disease. Studying these lesions in cortical neurons of the MPSIIIB mouse, we showed that they were associated with Golgi complex alterations and modified expression of the Golgi matrix protein GM130 (20), a tethering protein important for Golgi structure and dynamics (21). We did not observe disorders of endocytosis or macro-autophagy in these cells.

The re-programmation of human skin fibroblasts into induced pluripotent stem cells (iPSc) and their subsequent differentiation in neural progenitors and neurons provide access to human neurons, the cell type most relevant to clinical expression of MPSIIIB in children. Reprogramming of MPSIIIB patient fibroblasts was efficient. However, the proliferation of emerging iPSc was impaired unless the enzyme defect was complemented by an exogenous enzyme. Patient undifferentiated iPSc and neurons expressed cell disorders, which were not observed in parental skin fibroblasts and in floating neurospheres. These defects may affect neurological development in young children.

## RESULTS

### Complementation of enzymatic defect allows isolation of patient iPSc

Skin fibroblast primary cultures were established from two MPSIIIB patients for diagnosis purpose. Patient 1 was homozygous for a previously undescribed splice donor mutation in the *NAGLU* gene (c.531+1G>C). Patient 2 was homozygous for p.R482W mutation in exon 6 (22). NAGLU activity was below the detection threshold in cultured fibroblast extracts ($0.04 \pm 0.01$ and $0.03 \pm 0.02$ μkat/kg, respectively, versus $1.23 \pm 0.02$ μkat/kg in controls).

Cultured fibroblasts were exposed to retroviral vectors encoding OCT4, SOX2, KLF4 (control and patient 2), or to these three vectors combined with a vector coding for c-MYC (control and patient 1). After exposure, fibroblasts were grown on a feeder layer of irradiated mouse embryonic fibroblasts (iMEF) in the presence of basic fibroblast growth factor (FGF2, 10 ng/ml). Emerging iPSc-like clones positive for alkaline phosphatase (AP) were visible after 3–4 weeks. Equivalent clone numbers were scored in control and MPSIIIB fibroblasts (~0.1% of plated fibroblasts with the four vectors, ~0.01% without c-MYC vector).

Control iPSc-like clones rapidly expanded (cloning efficiency 87.5%, $n = 24$). In contrast, patient iPSc-like clones poorly proliferated and were inefficiently cloned (cloning efficiency 2.5%, $n = 120$; Supplementary Material, Fig. S1). Since FGFs act in concert with HS proteoglycans to activate FGF receptors (23) and partially digested HS accumulates in MPSIIIB cells, we assumed that impaired proliferation of emerging patient iPSc resulted from altered FGF2 signaling caused by HS. We therefore isolated patient iPSc-like clones in the presence of exogenous NAGLU to clear HS (24). For that purpose, genetically engineered iMEF (NAGLU-iMEF) releasing NAGLU enzyme in culture supernatant were isolated. When grown on this feeder, patient iPSc-like clones rapidly expanded and were as efficiently cloned as control iPSc (cloning efficiency 83.3%, $n = 12$; Supplementary Material, Fig. S1).

### Characterization of iPSc clones

iPSc clones from control (C1, C2, C3), patient 1 (P1.1, P1.2, P1.3) and patient 2 (P2.1, P2.2, P2.3) were propagated for at least 20 passages on iMEF (control), or NAGLU-iMEF (patients). They showed normal karyotypes at passages 15–20 (data not shown). Mutations in the *NAGLU* gene were retrieved in patient clones. Cells expressed markers of pluripotency (SSEA4, TRA1-60, NANOG, Fig. 1A). Quantitative PCR with reverse transcription (qRT-PCR) indicated efficient repression of exogenously introduced genes (Fig. 1B). Endogenous pluripotency-associated genes were re-activated (Fig. 1C). Whereas the OCT4 promoter was heavily methylated in parent fibroblasts, it was demethylated in iPSc clones, consistent with epigenetic reprogramming to pluripotency (Fig. 1D). Six weeks after transplantation in immunodeficient mice, all control or patient iPSc formed teratoma. Histological examination revealed tissues from the three embryonic germ layers (Fig. 1E). Thus, all control and patient iPSc clones were defined as human pluripotent iPSc.

### Storage lesions are prominent in undifferentiated patient iPSc clones

Since exogenous NAGLU prevents expression of disease-related features, patient 1 and patient 2 iPSc clones were starved from the NAGLU enzyme after 15–20 passages. After transfer of patient iPSc clones to Matrigel™-coated wells in the presence of FGF2 (100 ng/ml) for 10 days, NAGLU catalytic activity was undetectable and cells were intensely stained with anti-HS antibodies (Fig. 2A).

Patient 1 and patient 2 undifferentiated iPSc clones accumulated vacuoles positive for the lysosome-associated membrane

Downloaded from hmg.oxfordjournals.org at Institut Pasteur M?diath?que Scientifique on July 22, 2011

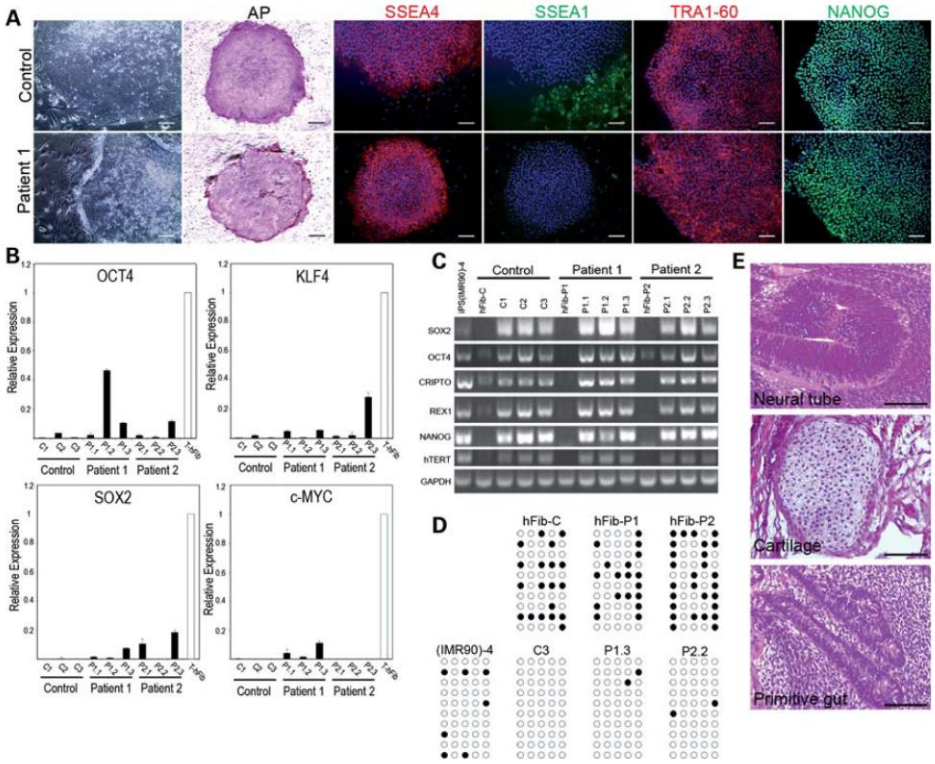



**Figure 1.** All control and patient iPSc clones exhibit human embryonic stem cell characteristics. (**A**) Representative images of iPSc clones emerging from control and patient fibroblasts growing on iMEF or NAGLU-iMEF feeder cells, respectively, are shown. Phase contrast views, AP staining, immunostaining for the pluripotency markers SSEA4, TRA-1-60 and NANOG and absence of staining for the differentiation factor SSEA1 are shown. Scale bars: 100 μm, except AP: 300 μm. (**B**) qRT-PCR shows that retroviral vector genomes coding for OCT4, KLF4, SOX2 and c-MYC mRNAs were silenced in iPSc clones (black bars), compared with parent human fibroblasts exposed to these vectors (T-hFib, white columns, value set to 1). Low persistent expression was detected in some clones, as reported by others (60). (**C**) RT-PCR shows that iPSc clones but not parent fibroblasts (hFib-C, hFib-P1, hFib-P2) expressed mRNAs coding for endogenous genes related to pluripotency. The iPS(IMR90)-4 cell clone was taken as a reference (56). GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) was an internal control for mRNA detection. (**D**) Bisulfite sequencing was used to detect methylation on cloned PCR products from DNA of iPSc clones (C3, P1.3, P2.2), parent fibroblasts (hFib-C, hFib-P1, hFib-P2) or the reference iPS(IMR90)-4 clone. Circles correspond to five methylation sites (columns) on the OCT4 gene promoter sequence (open, unmethylated; filled, methylated) (61). Ten PCR products (rows) from each cell line were analyzed. (**E**) All control and patient iPSc clones injected in Rag $\gamma C^{-/-}$ mouse skeletal muscle formed teratomas. Pictures show representative images of structures identified after 6 weeks including neural tissues (ectoderm), gut-like epithelial tissues (endoderm) and bone and cartilage (ectoderm). Hematoxylin and eosin staining, scale bar: 50 μm.

protein 1 (LAMP1) (Fig. 2B) and these vacuoles were highly distended ($1.50 \pm 0.17\ \mu m^2$ in patient iPSc, $n = 97$, versus $0.065 \pm 0.04\ \mu m^2$ in controls, $n = 88$, $P = 0.02$). Electron microscopy revealed large vesicles with heterogeneous contents (Fig. 2D). Western blot showed higher amounts of LAMP1 in patient than in control iPSc clones (Fig. 3A), whereas LAMP1 mRNA levels were equivalent (data not shown). Additional disorders consisted of Golgi alterations in both patients' iPSc clones with modified GM130 staining patterns (Fig. 2B) and co-staining of LAMP1-positive distended vesicles with anti-GM130 antibodies (Fig. 2C). Intense GM130 staining and expression in patient iPSc clones (Figs 2B and F and 3B) suggested increased Golgi size or GM130 reactivity outside Golgi. Moreover, Golgi structure was disorganized, consisting of fragmented ribbons, accumulating small vesicles and apposition of storage vesicles to Golgi cisterna rims (Fig. 2E). However, the vesicularization of Golgi stacks during mitosis was not affected in patients' iPSc (Supplementary Material, Fig S2A). Both patients showed similar defects. Taken together, these results showed that undifferentiated patient iPSc exhibited prominent cell pathology. In contrast, cell pathology was absent in parental patient skin fibroblasts despite HS accumulation (Fig. 2A). LAMP1 and GM130 expressions were comparable with control fibroblasts, and Golgi complexes showed similar morphology (Supplementary Material, Fig. S3).

### Patient iPSc clones are pluripotent

iPSc differentiation can be examined *in vitro* by preventing cell adhesion, which results in the formation of embryoid bodies (EBs). After 10 days of non-adherent growth,

Downloaded from hmg.oxfordjournals.org at Institut Pasteur M?dath?que Scientifique on July 22, 2011

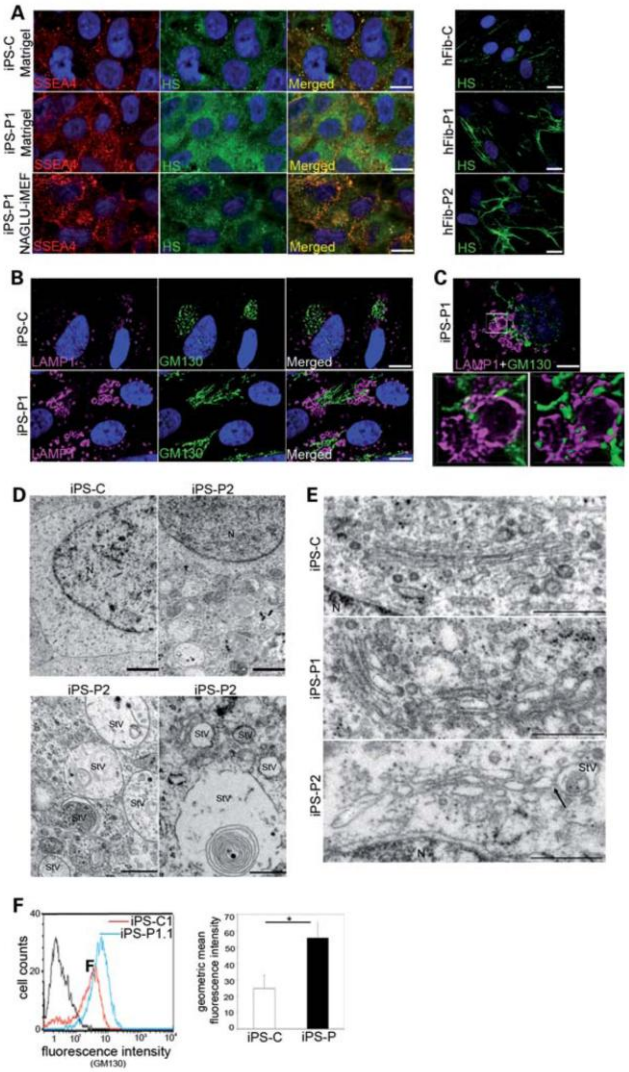



**Figure 2.** Undifferentiated patient iPSc express disease-related features. All control, patient 1 and patient 2 iPSc clones were cultured for 10 days on Matrigel™-coated wells. (**A**) (Left panels) Immunostaining reveals the accumulation of HS proteoglycans (in green) and expression of the pluripotency marker SSEA-4 (in red) in patient iPSc (iPS-P1 Matrigel), compared with control (iPS-C Matrigel), or with patient iPSc grown in the presence of exogenous NAGLU (iPS-P1 iMEF-NAGLU). Representative images of iPS clones are shown. Scale bar: 10 μm. (Right panels) Immunostaining shows HS proteoglycan accumulation (in green) in patient 1 (hFib-P1) and patient 2 (hFib-P2) fibroblasts compared with control (hFib-C). Scale bar: 20 μm. (**B**–**C**) iPSc cultured on Matrigel™-coated wells were immunolabeled for LAMP1 (in purple) and GM130 (in green). (B) Confocal immunofluorescence shows distended LAMP1-positive vesicles and modified GM130 staining pattern in patient iPSc (iPS-P1), compared with control (iPS-C). Representative images are shown. Scale bar: 10 μm. (C) (Upper panel) High magnification confocal view of doubly stained cells. Scale bar: 5 μm. (Lower panels) Deconvoluted images without (left) or with (right) iso-surface treatment show contiguous staining for LAMP1 and GM130 in vesicle limiting membranes. (**D**–**E**) iPSc cultured on Matrigel™-coated wells were processed for electron microscopy. (D) Low (top panels) or high (lower panels) magnification images show accumulation of enlarged intracellular vesicles with heterogeneous content in patient iPSc, but not in control iPSc. Representative images of one patient-2 iPSc clone (iPS-P2) and of one control clone (iPS-C) are shown. Similar observations were made in patient 1 iPSc clones. (E) Representative images of Golgi apparatus are shown. Normal cells (iPS-C) show Golgi ribbons with well-aligned and stacked cisternal membranes. In contrast, multiple short stacks are visible in iPS-P1, which are not linked to each other. In iPS-P2, cisternae are distended, interrupted and sometimes connected to storage vesicles (StV, arrow). N, nucleus. Scale bars: upper left panels: 1 μm; lower panels, right panels: 0.5 μm. (**F**) GM130 expression was quantified by flow cytometry in control (iPS-C) and patient (iPS-P) iPSc. After a 10-day culture period on Matrigel™-coated wells, dissociated iPSc were stained with an anti-GM130 antibody. An isotypic mAb was used as a negative control (black line). A representative flow cytometry diagram is shown. The bar chart on the right indicates mean ± SEM fluorescence intensity values from independent analyses of control ($n = 3$) or patient ($n = 4$) iPSc. $^*P < 0.05$ (Mann–Whitney test).

Downloaded from hmg.oxfordjournals.org at Institut Pasteur M?diath?que Scientifique on July 22, 2011

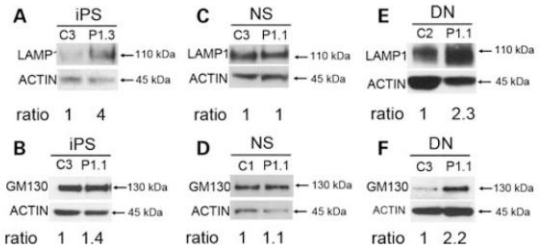



**Figure 3.** Western blot analysis of LAMP1 and GM130 protein content in patient iPSc, neurospheres and neurons. LAMP1 and GM130 were detected by western blot in protein extracts from (**A** and **B**) iPSc cultured on Matrigel for 10 days, (**C** and **D**) neurospheres cultured in suspension for 2 weeks and (**E** and **F**) cultures containing a mixture of precursors and differentiated neurons (DN) 17 days after adhesion of dissociated neurospheres. Control and patient cells show a 110 kDa LAMP1 signal and a 130 kDa GM130 signal. Actin signal was revealed to assess protein load on each lane. The ratio of specific signals to actin signals are indicated for each lane. Representative experiments are shown.

NAGLU activity was not detectable in patient 1 and patient 2 EB extracts (Supplementary Material, Fig. S4). The catalytic activity of other enzymes was also affected, as usually observed in LSDs (Supplementary Material, Fig. S4) (25). The formation and survival of EBs were nevertheless equally efficient for all control and patient iPSc clones. After adhesion for 10 days on polyornithine–laminin-coated cover slips, EBs derived from patients' clones accumulated enlarged intracellular LAMP1-positive vesicles (Fig. 4A). Despite both enzyme deficiency and cell pathology, iPSc differentiation was not impaired in this *in vitro* assay. All patient or control iPSc clones produced cells representing the three germ layers (Fig. 4B), including cells positive for MAP2 and nestin (ectoderm), α-smooth muscle actin (SMA) (mesoderm) and α-fetoprotein (AFP) (endoderm).

### Neural stem cells derived from patient iPSc show modified gene expression profiles

All control, patient 1 and patient 2 iPSc clones give rise to proliferating floating neurospheres after removal from feeder layers and cultivation in the presence of FGF2 and epidermal growth factor (EGF). After 2 weeks of non-adherent growth, neurospheres expressed nestin, a marker of early neural progenitors (Fig. 5A). Patient 1 and patient 2 neurospheres accumulated glycosaminoglycan (GAG), including HS (Fig. 5B; Supplementary Material, S5). However, immunofluorescence (Fig. 5C), western blot (Fig. 3C and D) and flow cytometry analyses (Fig. 5D) did not show higher expression of LAMP1 or GM130 in patient than in control neural stem cells. Annexin assays indicated equivalent proportion of apoptotic cells in patient and control neural stem cells (Supplementary Material, Fig. S6). Electron microscopy examination of ultra-thin sections performed on neurosphere pellets revealed rare storage vacuoles, and although Golgi alterations were present, they were infrequent and milder than in undifferentiated iPSc (Fig. 5E).

With the aim to determine whether undegraded HS modify biological functions even in the absence of major visible cell pathology, we compared gene expression profiles between cells that did or did not accumulate HS. Total RNA was extracted from patient 2 parental fibroblasts before and after genetic correction of the enzyme defect, and from iPSc-derived neurosphere cultures (two controls, C1 and C3, and three patients, P1.1, P1.3, P2.3). Although only 50 mRNAs showed different levels in corrected and deficient fibroblasts (among 47 000 transcripts), NAGLU deficiency was associated with the modification of 3280 mRNAs (among 29 000 transcripts) in patient neural stem cells (microarray raw data available at http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/ E-MEXP-3033 and http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/ GSE23075). Genes with modified expression overlapped between the two cell types (23 out of the 50 modified fibroblast transcripts, Supplementary Material, Table S1). They pointed to modifications of extracellular matrix (ECM) constituents (synthesis of HS chains, fibronectin, tenascin, thrombospondin, elastin, collagens III and XI, nidogen and laminin gamma, proteases and proteases inhibitor involved in matrix turnover), molecules involved in cell–matrix interactions (integrins, FGFs, FGF receptors, semaphorins, ephrin, ephrin receptor, Slit), cell adhesion (calpain, protein kinase Cβ, PDK1, phosphatidylinositol 3 kinase, tensin, parvin, RhoGTPases activating proteins, guanine exchange factors and Cdc42 effectors) and pathways transducing extra-cellular signals (PAK1, mitogen-activated kinases, c-fos, c-jun, phospholipase A2). Several constituents of the TGFβ and wnt signaling pathways were also modified. Predicted functional consequences focus on cell communication (*P*-value $8 \times 10^{-6}$), adhesion ($3 \times 10^{-4}$), division ($9 \times 10^{-4}$), motility ($9 \times 10^{-3}$) and axon guidance ($2 \times 10^{-2}$). Additional modifications detected in neural stem cells concerned developmental processes ($4 \times 10^{-21}$), especially mesoderm ($1 \times 10^{-14}$) and ectoderm ($8 \times 10^{-10}$) development, neurogenesis ($2 \times 10^{-10}$) or angiogenesis ($9 \times 10^{-7}$).

Expression levels of genes encoding proteins associated with lysosomes or the Golgi were modified in patients' neural stem cells but not in patients' fibroblasts (Supplementary Material, Table S2). With the exception of DRAM (damage-regulated autophagy modulator, *P*-value $2 \times 10^{-3}$) and CD1d ($10^{-2}$), all genes encoding proteins associated with lysosomes (26) were downregulated in patient cells, including lysosomal hydrolases, proton pumps, transmembrane transporters and other lysosomal membrane proteins. With the exception of GOLM1 (Golgi membrane protein 1, *P*-value $2 \times 10^{-3}$), genes associated with Golgi morphology, localization and trafficking were downregulated.

### Patient neurons show severe storage lesions and Golgi complex alterations

We next examined neural cell defects after adhesion of patient floating neurospheres. The differentiation of cells growing as floating neurospheres was induced by dissociation and adhesion on polyornithine–laminin-coated cover slips. Control and patient cultures contained equivalent proportions of β3-tubulin-positive differentiated neurons ($40.6 \pm 7.6\%$, $n = 328$, and $38 \pm 7.3\%$, $n = 339$, after 3 weeks, respectively, Fig. 6A), equivalent proportions of GABAergic neurons ($15.6 \pm 4.2\%$, $n = 275$, and $12.3 \pm 2.4\%$, $n = 224$, of the MAP2-positive neuron population after 5 weeks, respectively,

Downloaded from hmg.oxfordjournals.org at Institut Pasteur M?dath?que Scientifique on July 22, 2011

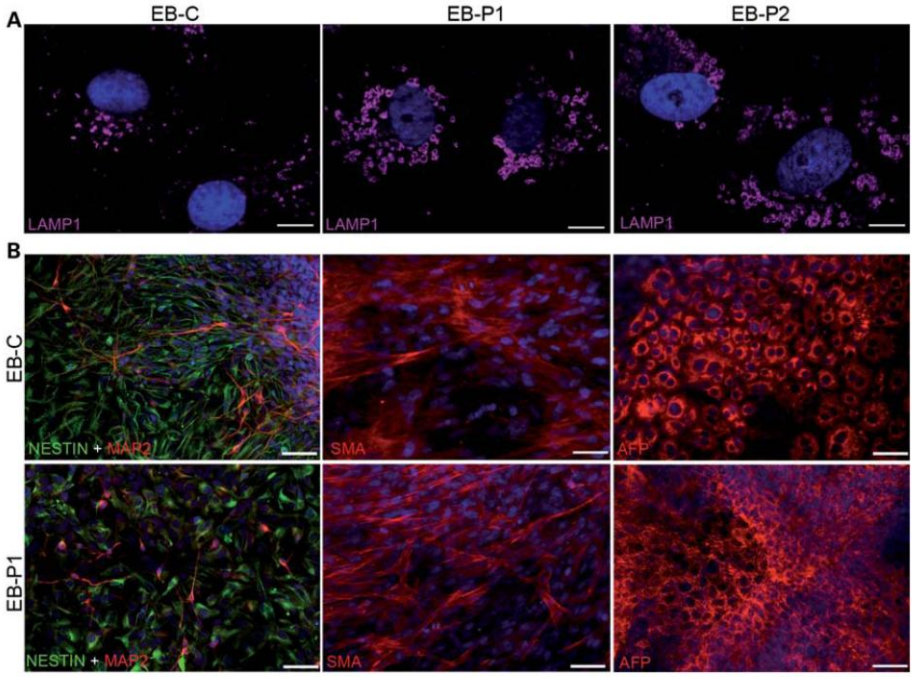



**Figure 4.** Patient iPSc are pluripotent. EBs were grown for 10 days in suspension culture in the absence of NAGLU supply and transferred to polyornithine–laminin-coated cover slips for 10 more days before immunolabeling. (**A**) Patient 1 (EB-P1) and patient 2 (EB-P2) EBs overexpress LAMP1 (in purple), compared with control EBs (EB-C). Representative images are shown. Scale bar: 10 μm. (**B**) Control (EB-C), patient 1 (EB-P1) and patient 2 (data not shown) EBs derived from all iPSc clones give rise to ectoderm (MAP2 in red and nestin in green), mesoderm (SMA, in red) and endoderm (AFP, in red). Representative images are shown. Scale bars: 50 μm.

Fig. 6B), equivalent ratios between GABAergic and glutamatergic neurons. Synaptophysin puncta outlining MAP2-positive neurons suggested efficient neuronal maturation (Fig. 6B). GFAP-positive cells represented <0.1% of differentiated cells. Cells positive for the oligodendrocytic markers O4 or NG2 were not observed. We did not observe differences in the kinetics, efficiency and differentiation pattern of patient 1 and patient 2 neurospheres compared with control cells (Fig. 6C). Annexin assays did not reveal difference in the proportions of apoptotic patient or control cells (Supplementary Material, Fig. S6).

Patient 1 and patient 2 cells examined after 5 weeks in differentiating conditions consisted of a mixture of neural precursors and differentiated neurons (Fig. 6A). Both patient neurons contained abundant distended LAMP1-positive vacuoles (Fig. 7A). Vacuole ultra-structure morphologies (Fig. 6D; Supplementary Material, S7) were reminiscent of those seen in undifferentiated patient iPSc (Fig. 2D). These storage vesicles were positive for LAMP1 and for the ganglioside GM3. The secondary accumulation if this glycosphingolipid is typical of MPSIII (Supplementary Material, Fig. S8). Western blot and staining showed increased LAMP1 and GM130 signals, compared with controls (Figs 3E and F and 7B). LAMP1-distended vesicles were co-stained with GM130 (Fig. 7C), and GM130 staining was more intense and broader with frequent extensions in neurites (Fig. 7D). Patient cells with neuronal morphology contained numerous abnormal Golgi complexes (Fig. 7E). Golgi complexes with disorganized morphology (51.2% in patients and 6.2% in controls) typically consisted of multiple short stacks that were not linked and often not aligned with respect to each other, associated with the accumulation of small vesicles. Storage vacuoles were frequently apposed at, or even connected to, the rims of fragmented ribbons. However, dysmorphic Golgi complexes collapsed in response to brefeldin A as efficiently as Golgi complexes in control cells, suggesting efficient vesicular trafficking in pre-Golgi compartments (Supplementary Material, Fig. S2B). These observations indicated prominent cell pathology in MPSIIIB human neurons.

## DISCUSSION

We demonstrate that iPSc can be generated from the fibroblasts of children with MPSIIIB, a fatal LSD with major CNS involvement. NAGLU deficiency affected the proliferation of emerging iPSc clones, necessitating compensation of the genetic defect through enzyme replacement for efficient isolation. In contrast with parental patient fibroblasts, isolated iPSc rapidly exhibited prominent cell pathology once exogenous enzyme supply was halted. Disease expression did not

Downloaded from hmg.oxfordjournals.org at Institut Pasteur M?diath?que Scientifique on July 22, 2011

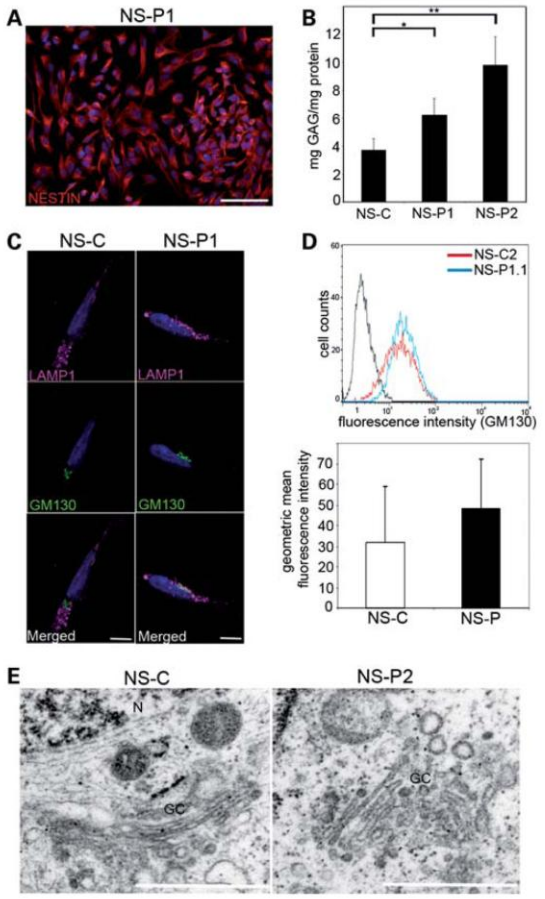



**Figure 5.** Neural precursors derived from patient iPSc clones have a mild phenotype. Neurosphere (NS) suspension cultures derived from each control (NS-C) and each patient iPSc clone (NS-P1 and NS-P2) were grown in the presence of FGF2, EGF and heparin and in the absence of exogenous NAGLU supply for 2 weeks. (**A**) Control and patient neurospheres were dissociated into single-cell suspension and plated on polyornithine–laminin-coated cover slips. Cells express nestin (in red) 1 day after adhesion. A representative image of one differentiated patient 1 clone is shown. Scale bar: 100 μm. (**B**) Sulfated proteoglycans were measured in crude extracts of floating neurospheres. NS-C value is the mean from determinations in neurospheres derived from control iPSc clones ($n = 5$). NS-P1 and NS-P2 values are means of independent determinations in neurospheres derived from patient 1 ($n = 6$) or patient 2 ($n = 6$) iPSc clones. Means are $\pm$SEM. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ (Mann–Whitney test). (**C**) One day after adhesion, neural cells were immunolabeled for LAMP1 (in purple) and GM130 (in green). Apotome views show similar LAMP1 and GM130 signals in control and patient 1 neural cells. Similar observations were made in patient 2 cells. Scale bars: 10 μm. (**D**) GM130 expression was quantified by flow cytometry in control (NS-C) and patient (NS-P) cells. Neurospheres dissociated into single-cell suspensions were stained with an anti-GM130 antibody. One representative flow cytometry diagram is shown and the bar chart indicates mean $\pm$ SEM of independent determinations in control ($n = 4$) and patient ($n = 5$) neural cells. Difference is not significant (Mann–Whitney test). (**E**) Control (NS-C), patient 1 and patient 2 neurosphere pellets were processed for electron microscopy. High magnification images show representative images of Golgi complexes (GC). In few patient 2 cells (NS-P2), cisternae are interrupted and not well-aligned. Similar observations were made in patient 1 cells. N, nucleus. Scale bars: 0.5 μm.

impair iPSc survival and differentiation, allowing efficient isolation of affected neural stem cells and differentiated neurons. Whereas cell pathology was modest in floating neurosphere cultures, gene expression profiling revealed changes affecting multiple pathways, consistent with alterations of cell interactions with the environment. Neural stem cell adhesion and differentiation were accompanied by the installation of severe cell pathology consisting of intracellular vacuoles and severe disorganization of Golgi complex structure. The examination of patients' pluripotent stem cells and their neural and neuronal progenies revealed for the first time the existence of Golgi defects in a lysosomal disorder.

Patient iPSc required compensation of or adaptation to enzyme deficiency for proliferation. Fibroblast reprogrammation led to the emergence of iPSc clones with equal frequencies in patient and control fibroblasts. However, whereas clones emerging from normal fibroblasts rapidly proliferated in the presence of FGF2, emerging patient iPSc did not, suggesting inefficient response to this factor. This phenotype was reversed when feeder cells supplied the missing lysosomal enzyme. Enzyme replacement is currently a routine treatment for several MPSs (27). The exogenous enzyme clears GAGs, including HS, which accumulate as a consequence of the enzyme defect. HS proteoglycans act in concert with FGFs to transduce cell proliferation signals (23). In MPSs, the accumulation of partially degraded HS affects FGF2 signaling (28), as shown by impaired proliferation and survival of multipotent hematopoietic progenitors in MPSI mice (29), or inefficient FGF2-dependent neurogenesis and reduced FGF1, FGF2 and FGF1 receptor mRNA expression in MPSIIIB mice (12). Reversion of the proliferation defect of MPSIIIB patient iPSc after exogenous enzyme supply suggested that impaired FGF signaling was due to the accumulation of partially degraded HS. Impaired FGF signaling affects major biological functions in pluripotent stem cells, including self-renewal, proliferation, survival, differentiation and adhesion (30).

Enzyme replacement is sufficient to prevent pathology in mucopolysaccharidoses, indicating that partially degraded proteoglycans induce disorders. Once patient iPSc had been established in the presence of NAGLU exogenous enzyme, they could be starved from this supply. Enzyme-starved iPSc, as well as their progenies, rapidly accumulated HS proteoglycans. They nevertheless survived and efficiently proliferated, suggesting that efficient response to FGF2, and possibly to other undefined growth-survival factors, was now achieved despite HS accumulation. This observation is important as it indicates that modified biological functions identified in chronically deficient MPSIIIB cells may result from adaptive processes turned on to survive HS proteoglycan degradation defect.

Post-mortem studies of affected patient tissues (15,17) as well as pathology studies in MPSIIIB mice (18,19) showed predominant storage lesions in brain cells. These observations are consistent with the clinical expression of the disease, which predominates in the CNS. They are also consistent with mild or absent disease-related phenotype in patient skin fibroblasts, despite significant HS accumulation. Examination of human iPS-derived neurons, the cell type most relevant to clinical manifestation, therefore appears the best approach to investigate human MPSIIIB cell pathology. We show that

Downloaded from hmg.oxfordjournals.org at Institut Pasteur M?diath?que Scientifique on July 22, 2011

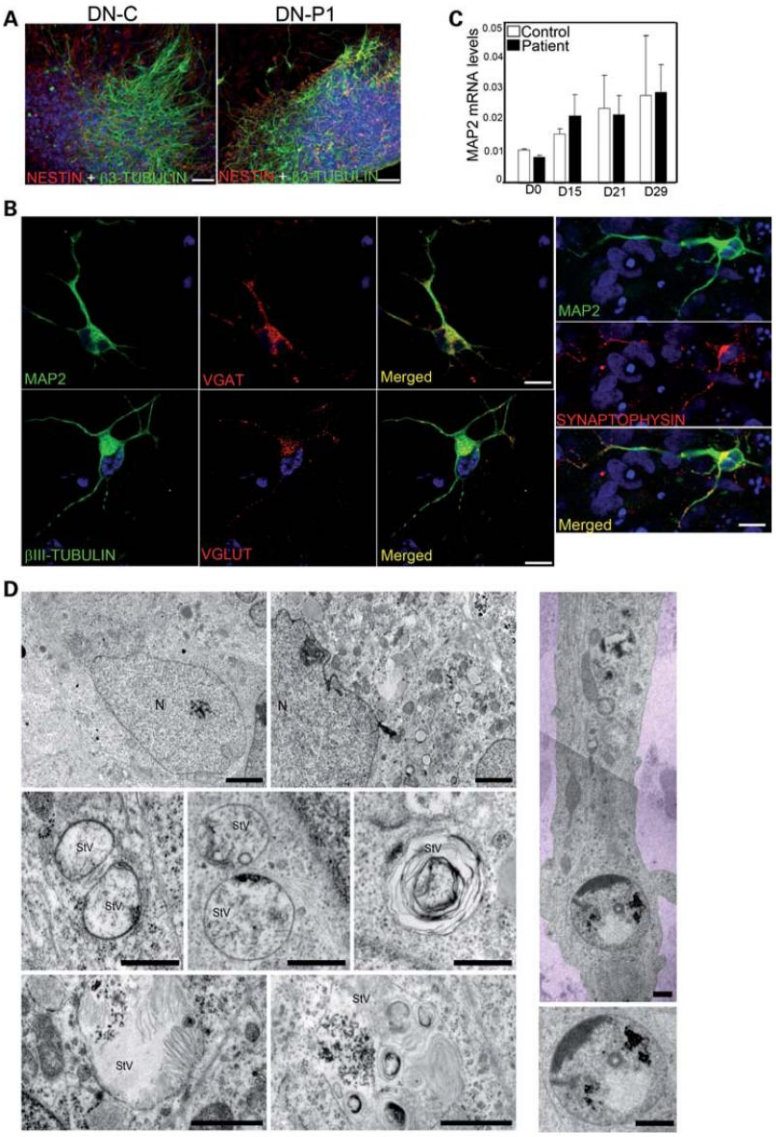



**Figure 6.** Storage vesicles accumulate in patient differentiated neurons. Cultures of control or patient neurons were obtained from dissociated neurospheres and plated on polyornithine–laminin-coated cover slips. (**A**) Differentiated neurons positive for βIII-tubulin (in green) and neural precursors positive for nestin (in red) were observed after 3 weeks in control (DN-C), patient 1 (DN-P1) and patient 2 (not shown) cells. Representative images are shown. All control and patient iPSc clones differentiated with the same efficiencies. Scale bar: 100 μm. (**B**) (Left panels) MAP2-positive or βIII-tubulin-positive neurons (in green) expressing the GABA transporter VGAT (in red) or the glutamatergic transporter VGLUT (in red) were observed after 5 weeks in all neurosphere cultures. (Right panels) iPSc-derived MAP2-positive neurons (in green) express the mature neuronal marker synaptophysin (in red). Scale bar: 10 μm. (**C**) Equivalent amounts of MAP2 mRNAs were detected by qRT-PCR using amplification of ARPO mRNAs as a reference at days 0 (D0), 15 (D15), 21 (D21) and 29 (D29) after plating, indicating comparable differentiation kinetics for control and patient neurons. Data are means ± SEM ($n = 3$). (**D**) Cultures were processed for ultra-structural analysis 5 weeks after adhesion. Low magnification views (left panels, upper row) showed multiple intracellular vesicles in patient 1 (left) but not in control (right) cells with neuronal morphologies. Scale bars: 2 μm. High magnifications (left panels, medium and bottom rows) revealed intraluminal electro-dense fibrillar (medium left), granular (medium middle) or multilamellar (medium right, bottom) materials in patient 1 and patient 2 cells. (Two right panels) A distended vesicle (lower panel) in a long cell process (upper panel) that can be identified as a neuronal prolongation is shown. N, nucleus; StV, storage vesicle. Scale bars: 0.5 μm. See also Supplementary Material, Figure S7, showing a low magnification composite view of the same long process.

Downloaded from hmg.oxfordjournals.org at Institut Pasteur M?diath?que Scientifique on July 22, 2011

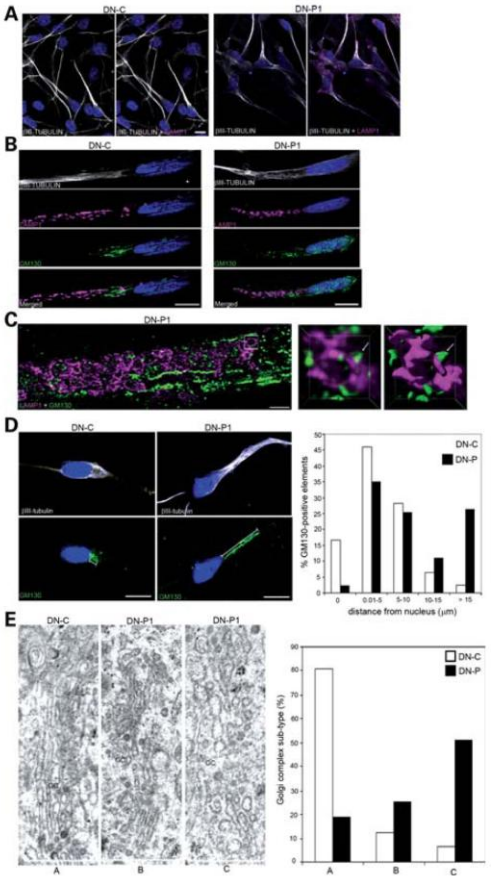



**Figure 7.** Golgi complex alterations in patient neurons. Control, patient 1 and patient 2 neurons derived from each iPSc clone were examined after 5 weeks of adherent culture. Cells were immunolabeled for βIII-tubulin (in white), LAMP1 (in purple) and GM130 (in green). (**A**) Low magnification confocal views show β3-tubulin-positive neurons (in white) accumulating LAMP1 (in purple)-distended vesicles. Scale bars: 10 μm. (**B**) High magnification of confocal views show more abundant distended LAMP1 vesicles and altered GM130 staining pattern in patient1 and patient 2 neurons compared with control (DN-C). Representative images of patient 1 neurons (DN-P1) are shown. Scale bars: 10 μm. (**C**) High magnification confocal view of a doubly stained neuron. Deconvoluted images without (left) or with (right) iso-surface treatment show contiguous staining for LAMP1 and GM130 in vesicle-limiting membranes (arrow). Scale bars: 2 μm. (**D**) The localization of GM130 signal with respect to the nucleus was analyzed in control and patient neurons. Left pictures are examples of low magnification Apotome views of neurons doubly stained for βIII-tubulin and GM130. Scale bar: 10 μm. The diagram in the right panel indicates the numbers of GM130-positive elements according to their distance from the nucleus in control ($n = 78$) and patient neurons ($n = 91$). Data show a broader dispersion of GM130 signals in patient than in control neurons. Neurons were randomly chosen for scoring (three independent experiments). (**E**) Golgi complex morphology was analyzed using electron microscopy in cells with a neuronal morphology. A typical Golgi complex in a control cell is shown on the left. Partially (middle picture) or fully (right picture) fragmented Golgi complexes in patients' cells are shown. Similar observations were made in patient 2. GC, Golgi complex; N, nucleus; StV, storage vesicle. Scale bar: 0.5 μm. The bar diagram on the right indicates the proportion of Golgi complex with normal (A), partially fragmented (B) or totally fragmented (C) morphology scored in control ($n = 32$) and patient ($n = 80$) randomly chosen cells.

patient iPSc provided suitable models for this purpose, exhibiting disorders that were not apparent in parental fibroblasts. The neuronal progeny of these cells also expressed disorders, suggesting that similar pathological processes affected pluripotent stem cells and neurons. These results are remarkable as there are currently very few neuronal disorders in which disease-related phenotype was documented in patient iPSc and/or their progeny (31–34).

Cell disorders in patient iPSc and neurons consist of intracellular storage vesicles, the hallmark of cell alterations in MPSIIIB. Vacuoles were associated and frequently apposed to major alterations of Golgi structure. Golgi complexes consisted of multiple short stacks that were not linked and often not aligned with respect to each other. Golgi defects were not associated with altered cell survival or differentiation. They were compatible with efficient vesicularization during mitosis or Golgi collapse in response to brefeldin A. Previous studies indicated that Golgi alterations induced by the depletion of GM130, a Golgi matrix protein necessary for proper cisternae stacking, do not affect transport kinetics in the secretory pathway (35). They may nevertheless be associated with defective glycoprotein sialylation (36) of glycosphingolipid synthesis (37). The secondary accumulation of GM3 gangliosides, which is associated with several MPS (10), might be related to Golgi structural alterations.

The Golgi phenotype is highly reminiscent of cells acutely depleted of GM130 using siRNAs (35,36). Thus, cell pathology combined GM130 overexpression with features consistent with GM130 loss-of-function, suggesting that GM130 was at least partly not functional in patient iPSc and neurons. Since partner proteins of GM130 that are needed to perform biological functions, like GRAPS65 or p115, were not detected in GM130-positive storage vesicles analyzed in mouse neurons (20), our hypothesis was that GM130 is stuck in a position that impairs appropriate interaction with its partners. GM130 functions are not limited to the formation of tethering complexes necessary for incorporation of pre-Golgi carriers into stacks, which ensures the maintenance of Golgi architecture (35,36). They also comprise control of microtubule nucleation at the Golgi surface (38) and Cdc42-mediated determination of cell polarity through interaction with the Cdc42 guanine exchange factor Tuba (39,40). Partial loss of GM130 function in human patient iPSc and neurons could therefore affect stem cell polarity, migration and motility and subsequently neurogenesis and neuritogenesis.

How are alterations observed in patient iPSc and their progeny related to HS accumulation? Although cell pathology was mild or absent in patient floating neurospheres or in parental fibroblasts, gene expression profiles revealed modified expression patterns relative to control cells in which HS did not accumulate. Most of the genes encoding constituents of the ECM were affected. Downregulation of HS2ST, HS6ST, HS3ST, the three enzymes responsible for the density and type of sulfation within HS saccharidic chains, suggested modified profiles of ligand sensitivities (41,42). Molecules involved in cell–matrix interactions were also modified, as well as downstream intracellular effectors associated with the mitogen-activated pathways, or the wnt and TGFβ pathways. These results are evocative of functional alterations of cell–matrix interactions.

Downloaded from hmg.oxfordjournals.org at Institut Pasteur M?diath?que Scientifique on July 22, 2011

HS proteoglycans are major determinants of how the cells sense environmental cues bound to ECM. As co-receptors for cell adhesion, cell proliferation and fate determination molecules and other extracellular signals, they collaborate with 'primary' receptors to control signaling. HS proteoglycans are endocytosed and fragmented into oligosaccharides by heparanases in early endosomes. In the absence of further degradation in lysosomes, as in NAGLU-deficient cells, oligosaccharides accumulate in intracellular compartments and are released in the environment, where they bind ECM proteins and modify the bioavailability of multiple signaling molecules. Changes in cell–matrix interactions resulting from this modified environment likely affect cell identification and responses to environmental cues important for adhesion, migration, process extension, polarization and fate specification (43–45). Modified control of the extra-cellular signal-regulated pathway, which is activated by FGFs and controls Golgi remodeling through the phosphorylation of GRASP65, might account for the observed disorganization of Golgi architecture (46). Interestingly, mild expression of this phenotype in floating neurospheres may result from less stringent dependence of non-adherent cells on matrix-bound cues, compared with adherent iPSc or differentiating neural cells. Similarly, matrix-bound cues important for iPSc and neural cells may be largely irrelevant for fibroblasts.

Previous gene expression profiling studies in MPSIIIB mouse tissues showed upregulation of genes related to lysosomal functions and inflammation (47–49). We were surprised that genes coding for lysosomal proteins, or proteins carrying mannose-6-phosphate residues (26), were either unchanged in fibroblasts accumulating HS or downregulated in patient neural stem cells. These observations do not support the hypothesis that deficient lysosomal functions induced lysosomes proliferation (50). In contrast, changes in the expression of genes related to Golgi functions in patient neural stem cells were consistent with the observed modifications of Golgi architecture.

Is MPSIIIB a developmental disease? Whereas cell defects identified in patient iPSc could impinge on their differentiation capacity, assays performed in several paradigms indicated that they behave like control iPSc, giving rise to differentiated cell progeny with similar efficiency, kinetics and pattern. These results appear consistent with the absence of clinical manifestations of the disease during fetal life and at birth in affected children (51,52) and animal models (19,53). However, these observations are not sufficient to conclude that stem cells behave normally in MPSIIIB. Indeed, the teratoma formation assay, which showed normal patient iPSc differentiation, was performed in recipient mice that are able to complement the enzymatic defect of patient iPSc. In affected humans, the CNS is presumably protected against HS proteoglycan toxicity until birth through the delivery of a maternal enzyme across the blood–brain barrier, as suggested by blood–brain barrier permeability to mannose-6-phosphate bearing molecules until birth in mice (54). Although EB formation and neural stem cell differentiation paradigms showed apparently normal behavior of patient iPSc in the absence of enzyme complementation, the accuracy of these *in vitro* assays is clearly not sufficient to detect subtle deviations from normal differentiation pattern, as they may occur *in vivo*. Considering the central role of matrix–cell interactions, cell migration, neurogenesis and neuritogenesis in post-natal CNS development, developmental damage may occur in MPSIIIB children. This possibility has major implications with regard to treatments aimed at restoring normal brain plasticity and cognition in affected children. Very early in life, reduction of HS burden is presumably the best situation for clinical success.

## MATERIALS AND METHODS

### iPSc generation and differentiation

Skin fibroblast cultures from two MPSIIIB patients and one non-affected volunteer were obtained from the Centre de Ressources Biologiques in Lyon (France) after approval by the competent authorities. A statement of biological samples was made according to French laws formulated by the Ministère de la Recherche et au Comité de Protection des Personnes Ile de France (reference DC-2009-1067). Fibroblasts were grown in DMEM Glutamax (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovin serum (FBS) (Sigma). iPSc clones were generated as previously described (55). Retrovirus plasmids carrying human cDNA coding for OCT4, SOX2, KLF4 and c-MYC were used (Addgene plasmids 17217, 17218, 17219, 17220). After VSV-G-pseudotyped retrovirus vector production, $5 \times 10^4$ cells for MPSIIIB fibroblasts and $10^5$ cells for control fibroblasts were transduced twice with the retrovirus vectors in the presence of sulfate protamine (5 mg/ml, Sigma). Clones with well-defined hES-like morphology were observed 3 weeks after gene transfer. They were selected and manually picked 1 or 2 weeks later. iPSc clones were maintained on iMEF feeder layers in the following medium (iPSc medium): DMEM/F12 (Invitrogen) containing 20% KnockOut Serum Replacement (Invitrogen), 10 ng/ml of FGF2 (Miltenyi Biotech, Paris, France), 100 μM nonessential amino acids (Invitrogen) and 100 μM 2-mercaptoethanol (Invitrogen). Cultures were passaged every 5–10 days either manually or enzymatically with collagenase type IV (1 mg/ml) (Invitrogen). MPSIIIB iPSc clones were isolated and cultured on iMEF transduced with a lentivirus vector encoding human NAGLU (NAGLU-iMEF) (11). NAGLU activities in cell supernatants were increased 4.3-fold in transduced cells. To culture iPSc clones without iMEF, iPSc clones were transferred onto Matrigel™-coated wells (BD Biosciences) in mTeSR™1 medium (Stem Cell Technologies). iPSc clones were passaged either manually or enzymatically with dispase (2 mg/ml, Invitrogen). The iPS(IMR90)-4 cell clone (56) (WiCell Research Institute Madison, WA, USA) was also cultured on Matrigel™-coated wells in mTeSR™1 medium. For EB differentiation, iPSc clones were collected as small clusters after collagenase treatment. Clusters were resuspended in iPSc medium without FGF2. Ten days later, EBs were plated on polyornithine (20 μg/ml) and laminin (10 μg/ml)-coated cover slips and incubated for 8 additional days. For neural differentiation, neurospheres were generated as previously described (31). To induce neural differentiation, neurospheres were dissociated into single-cell suspension with Accumax (PAA Laboratories, Linz, Austria) and $2 \times 10^5$ cells were plated onto polyornithine–laminin-coated cover slips in DMEM/F12 supplemented with 2% B27 (Invitrogen). To quantify plating efficiencies, cells were fixed with 4%

Downloaded from hmg.oxfordjournals.org at Institut Pasteur M?diath?que Scientifique on July 22, 2011

paraformaldehyde (PFA) and stained with DAPI. At least 200 nuclei were counted per cell type ($n = 3$ experiments). Equivalent plating efficiencies were calculated between control and patient cells.

### Immunocytochemistry and AP staining

AP staining was performed using the Leukocyte Alkaline Phosphatase Kit (Sigma). For immunocytochemistry, cells were fixed in 4% PFA for 20 min at room temperature. After washing with phosphate buffered saline (PBS, Invitrogen), cells were treated with PBS containing 2% normal goat serum (Invitrogen), 1% bovine serum albumin (Sigma) and saponin (0.01%, Sigma) or Triton X-100 (0.1%, Sigma) for 1 h at room temperature. Primary antibodies included mouse monoclonal anti-AFP (IgG2a, 1:200, Chemicon), anti-α-SMA (IgG2a, 1:200, Chemicon), anti-βIII-tubulin (IgG2a, 1:500, Eurogentec, Berkeley, CA, USA), anti-HS (IgM, 1:200, clone HepSS-1 kindly provided by Seikagaku Biobusiness Corporation, Tokyo, Japan), anti-GM3 (IgM, 1:100, kindly provided by Seikagaku Biobusiness Corporation), anti-LAMP1 (IgG1, 1:200, SouthernBiotech), anti-MAP2 (IgG1, 1:500, Chemicon), anti-O4 (IgM, 1:200, Stem Cell Technology), anti-SSEA4 (IgG3, 1:100, Chemicon), anti-SSEA1 (IgM, 1:100, Chemicon), anti-TRA1-60 (IgM, 1:100, Chemicon), anti-VGAT (IgG3, 1:400, Synaptic System, Göttingen, Germany), rabbit anti-GM130 (1:5000, Sigma), rabbit anti-NANOG (1:100, Abcam, Cambridge, UK), rabbit anti-nestin (1:400, Chemicon), rabbit anti-VGLUT (1:1000, Synaptic System), rabbit anti-synaptophysin (1:200, Synaptic System), rabbit anti-giantin (1:500, Covance, Princetown, NJ, USA), rabbit anti-NG2 (1:700, Chemicon). Secondary antibodies used were Alexa488 goat anti-mouse IgG1 (1:2000, Invitrogen), Alexa555 goat anti-mouse IgG1 (1:2000, Invitrogen), Alexa488 goat anti-mouse IgG2a (1:500, Invitrogen), Cy3 goat anti-mouse IgG3 (1:200, Jackson ImmunoResearch), rhodamine goat anti-mouse IgM (1:200, Millipore), FITC goat anti-mouse IgM (1:100, Jackson ImmunoResearch), biotin goat anti-mouse IgG1 (1:500, Jackson ImmunoResearch), Alexa488 goat anti-rabbit (1:1000, Invitrogen), Alexa555 goat anti-rabbit (1:1000, Invitrogen), Alexa647 streptavidin (1:500, Molecular Probes). Nucleus were stained with 1 mg/ml Hoechst H33342 (Invitrogen) and slides were mounted with Fluoromount G (Southern Biotech). Images were acquired either with an Axioplan 2 imaging optic microscope equipped with Apotome and AxioCam TR camera controlled by the AxioVision software (Zeiss, LE Pecq, France), or with an SP5 confocal system (Leica, Reuil-Malmaison, France). Confocal images were deconvoluted with the Huygens software (Svi, Hilversum, The Netherlands). Deconvoluted 3D images were constructed with the Imaris x64 software (Bitplan, Zurich, Switzerland).

### Western blotting

Cells were homogenized in lysis buffer [0.1% SDS, 1% NP-40, 0.2% deoxycholate, 0.15 M NaCl, 50 mM Tris, pH 7.8, and a protease inhibitor cocktail (Roche)], triturated and centrifuged at 12 000*g* for 20 min at 4°C. Cell lysates (10 μg) were separated by electrophoresis on 7% SDS–polyacrylamide gel (Invitrogen) and transferred to a nitrocellulose membrane. Signals were revealed with anti-LAMP1 (1:1000, SouthernBiotech), anti-GM130 (1:200, IgG1, clone 35, BD Biosciences) and anti-actin (1:2000, Sigma) antibodies followed by appropriate horseradish peroxydase-coupled secondary antibodies (1:10 000, Amersham) and enhanced chemiluminescence (Pierce). Signal intensities were measured with the LAS-1000CH Luminescent photofilm LTD system, piloted by the IR-LAS-Pro software (Fuji).

### Flow cytometry analysis and apoptosis

Cells were fixed in 2% PFA and incubated for 1 h either with an anti-GM130 antibody (1:100) or with an isotypic mAb as a negative control in PBS containing 1% fetal calf serum. Secondary antibody used was an Alexa488 anti-mouse IgG1 (Invitrogen). Apoptosis was analyzed with the Vybrant Apoptosis Assay Kit (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol.

### GAG dosage

Neurospheres were collected by centrifugation and overnight lysed in acetate buffer (100 mM sodium acetate, pH 5, containing 5 mM cystein, 5 mM EDTA) supplemented with papain 3% (Sigma) at 65°C. After centrifugation, sulfated GAGs were quantified in supernatants with the Blyscan Sulfated Glycosaminoglycan Assay (Biocolor) according to the manufacturer's protocol.

### Electron microscopy

Cells were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer and post-fixed with 1% osmium tetroxide for 1 h. Cells were then dehydrated through increasing ethanol baths, and embedded in Epon 812. Ultra-thin sections (70 nm) were prepared using a Reichert Ultracut S Wild M3z microtome (Leica) and contrasted with uranyl acetate and lead citrate. Ultra-structural analyses were performed on a JEOL 1200EXII transmission electron microscope (JEOL) equipped with an Eloise Megaview camera controlled by the Analysis Pro 3.1 software (Eloise).

### MPSIIIB genotyping and karyotyping

Genotyping of MPSIIIB mutations was performed by PCR amplification and sequencing of genomic DNA (Supplementary Material, Table S3). Karyotyping was performed by Pasteur-Cerba (Cergy-Pontoise, France). Analyses were performed on the following clones: C2 (passage 8), C3 (passage 21), P1.1 (passage 10), P1.3 (passage 16), P2.2 (passage 16), P2.3 (passage 8).

### RT-PCR and qRT-PCR

Total RNA was extracted using TRIzol (Invitrogen) and treated with TurboDNAse (Applied Biosystems). One microgram of total RNA was used to synthesize cDNA with hexanucleotide random primers pdN6 and MMLV reverse transcriptase (Superscript II, Invitrogen). RT-PCR was performed in a thermocycler (Eppendorf) with 50 ng of cDNA

Downloaded from hmg.oxfordjournals.org at Institut Pasteur M?dath?que Scientifique on July 22, 2011

with 'RT-PCR' primers (Supplementary Material, Table S3). qRT-PCR was performed in a Model 7300 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with 100 ng of cDNA and the TaqMan PCR Master Mix (according to Applied Biosystems procedures). Design of qRT-PCR primers (Supplementary Material, Table S3) was done using the Primer Express software.

### Bisulfite sequencing

Genomic DNA was treated with EpiTech Bisulfite according to the manufacturer's recommendations (Qiagen). The promoter region of the human OCT4 gene was amplified by PCR. The PCR products were subcloned into pCR2-TOPO (Invitrogen). Ten clones of each sample were verified by sequencing (Eurofins MWG Operon). Primers' 'bisulfite sequencing' are listed in Supplementary Material, Table S3.

### Teratoma formation

Approximately $2 \times 10^6$ dissociated iPSc were injected intramuscularly in Rag $\gamma C^{-/-}$ mice. Six weeks after injection, teratomas were dissected, fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. Sections were stained with hematoxylin and eosin.

### Affymetrix exon array hybridization and data analysis

Fibroblasts from patient 2 were exposed to lentivirus vectors coding for GFP (HS+), or to two vectors coding for GFP and NAGLU, respectively (HS−). GFP expression and NAGLU activity were verified in three independent cultures of each type, from which 100 ng of total RNA was isolated, providing three independent samples for each condition. After amplification and labeling with Affymetrix reagents, targets were hybridized to Affymetrix Human Genome U-133 Plus 2.0 chips (47 000 transcripts, 38 500 genes). For neural stem cells, 100 ng of total RNA from C1, C3, P1.1, P1.3 and P2.3 neurospheres were amplified, labeled with Affymetrix reagents and hybridized to Affymetrix-GeneChip Human Exon 1.0 ST arrays. Affymetrix Exon Array data analyses were performed using EASANA from GenoSplice (GenoSplice Technology) (57). For analyses, a third synthetic sample (C1−3) was generated from the two control arrays C1 and C3 to artificially increase the number of reference samples and in order to increase statistical power of results (58). Unpaired statistical analyses were performed using Student's *t*-test as previously described (59). Taking into account probe expression level and probe quality such as cross-hybridization, repeat region and number of GC-rich regions, 11 505 genes were analyzed. Results were considered statistically significant for $P \leq 0.05$ and fold changes $\geq 1.2$.

### Statistical analyses

Statistics were performed using the SPSS software (SPSS).

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material is available at *HMG* online.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr M. Huerre for teratoma analyses, Dr J. Di Santo for providing us the Rag γC mice and Dr S. Yamanaka for plasmid DNA. We thank D. Gentien, C. Hego, C. Reyes for microarray experiments on neurospheres and P. De La Grange from Genosplice. We also thank N. Desmaris, B. Régnault and G. Soubigou for microarray experiments on fibroblasts. We are grateful to Professor M. Yaniv for advices in the redaction of the manuscript.

*Conflict of Interest statement*. None declared.

## FUNDING

This work was supported by the Agence Nationale de la recherche (grant ANR-08-NEUR-005-02) in the frame of ERA-NET NEURON, the Association pour la Recherche sur la Sclérose Latérale Amyotrophique (ARSLA) and the Conny-Maeva Foundation.

## REFERENCES

1. Lachmann, R.H., te Vruchte, D., Lloyd-Evans, E., Reinkensmeier, G., Sillence, D.J., Fernandez-Guillen, L., Dwek, R.A., Butters, T.D., Cox, T.M. and Platt, F.M. (2004) Treatment with miglustat reverses the lipid-trafficking defect in Niemann–Pick disease type C. *Neurobiol. Dis.*, **16**, 654–658.
2. Zhang, M., Dwyer, N.K., Love, D.C., Cooney, A., Comly, M., Neufeld, E., Pentchev, P.G., Blanchette-Mackie, E.J. and Hanover, J.A. (2001) Cessation of rapid late endosomal tubulovesicular trafficking in Niemann–Pick type C1 disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98**, 4466–4471.
3. Ballabio, A. and Gieselmann, V. (2009) Lysosomal disorders: from storage to cellular damage. *Biochim. Biophys. Acta*, **1793**, 684–696.
4. Ginzburg, L. and Futerman, A.H. (2005) Defective calcium homeostasis in the cerebellum in a mouse model of Niemann–Pick A disease. *J. Neurochem.*, **95**, 1619–1628.
5. Pelled, D., Lloyd-Evans, E., Riebeling, C., Jeyakumar, M., Platt, F.M. and Futerman, A.H. (2003) Inhibition of calcium uptake via the sarco/endoplasmic reticulum $Ca^{2+}$-ATPase in a mouse model of Sandhoff disease and prevention by treatment with *N*-butyldeoxynojirimycin. *J. Biol. Chem.*, **278**, 29496–29501.
6. Kiselyov, K. and Muallem, S. (2008) Mitochondrial $Ca^{2+}$ homeostasis in lysosomal storage diseases. *Cell Calcium*, **44**, 103–111.
7. Sano, R., Annunziata, I., Patterson, A., Moshiach, S., Gomero, E., Opferman, J., Forte, M. and d'Azzo, A. (2009) GM1-ganglioside accumulation at the mitochondria-associated ER membranes links ER stress to Ca(2+)-dependent mitochondrial apoptosis. *Mol. Cell*, **36**, 500–511.
8. Wei, H., Kim, S.J., Zhang, Z., Tsai, P.C., Wisniewski, K.E. and Mukherjee, A.B. (2008) ER and oxidative stresses are common mediators of apoptosis in both neurodegenerative and non-neurodegenerative lysosomal storage disorders and are alleviated by chemical chaperones. *Hum. Mol. Genet.*, **17**, 469–477.
9. Bodennec, J., Pelled, D., Riebeling, C., Trajkovic, S. and Futerman, A.H. (2002) Phosphatidylcholine synthesis is elevated in neuronal models of Gaucher disease due to direct activation of CTP:phosphocholine cytidylyltransferase by glucosylceramide. *FASEB J.*, **16**, 1814–1816.
10. Walkley, S.U. (2004) Secondary accumulation of gangliosides in lysosomal storage disorders. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **15**, 433–444.
11. Hocquemiller, M., Vitry, S., Bigou, S., Bruyere, J., Ausseil, J. and Heard, J.M. (2010) GAP43 overexpression and enhanced neurite outgrowth in mucopolysaccharidosis type IIIB cortical neuron cultures. *J. Neurosci. Res.*, **88**, 202–213.
12. Li, H.H., Zhao, H.Z., Neufeld, E.F., Cai, Y. and Gomez-Pinilla, F. (2002) Attenuated plasticity in neurons and astrocytes in the mouse model of Sanfilippo syndrome type B. *J. Neurosci. Res.*, **69**, 30–38.

Downloaded from hmg.oxfordjournals.org at Institut Pasteur M?dath?que Scientifique on July 22, 2011

13. Ausseil, J., Desmaris, N., Bigou, S., Attali, R., Corbineau, S., Vitry, S., Parent, M., Cheillan, D., Fuller, M., Maire, I. *et al.* (2008) Early neurodegeneration progresses independently of microglial activation by heparan sulfate in the brain of mucopolysaccharidosis IIIB mice. *PLoS One*, **3**, e2296.
14. Neufeld, E.F. and Muenzer, J. (2001) The Mucopolysaccharidoses. In Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. and Valle, D. (eds), *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*. McGraw-Hill, New York, pp. 3421–3452.
15. Ferrer, I., Cusi, V., Pineda, M., Galofre, E. and Vila, J. (1988) Focal dendritic swellings in Purkinje cells in mucopolysaccharidoses types I, II and III. A Golgi and ultrastructural study. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **14**, 315–323.
16. Hadfield, M.G., Ghatak, N.R., Nakoneczna, I., Lippman, H.R., Myer, E.C., Constantopoulos, G. and Bradley, R.M. (1980) Pathologic findings in mucopolysaccharidosis type IIIB (Sanfilippo's syndrome B). *Arch. Neurol.*, **37**, 645–650.
17. Tamagawa, K., Morimatsu, Y., Fujisawa, K., Hara, A. and Taketomi, T. (1985) Neuropathological study and chemico-pathological correlation in sibling cases of Sanfilippo syndrome type B. *Brain Dev.*, **7**, 599–609.
18. Cressant, A., Desmaris, N., Verot, L., Brejot, T., Froissart, R., Vanier, M.T., Maire, I. and Heard, J.M. (2004) Improved behavior and neuropathology in the mouse model of Sanfilippo type IIIB disease after adeno-associated virus-mediated gene transfer in the striatum. *J. Neurosci.*, **24**, 10229–10239.
19. Li, H.H., Yu, W.H., Rozengurt, N., Zhao, H.Z., Lyons, K.M., Anagnostaras, S., Fanselow, M.S., Suzuki, K., Vanier, M.T. and Neufeld, E.F. (1999) Mouse model of Sanfilippo syndrome type B produced by targeted disruption of the gene encoding alpha-*N*-acetylglucosaminidase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **96**, 14505–14510.
20. Vitry, S., Bruyere, J., Hocquemiller, M., Bigou, S., Ausseil, J., Colle, M.A., Prevost, M.C. and Heard, J.M. (2010) Storage vesicles in neurons are related to Golgi complex alterations in mucopolysaccharidosis IIIB. *Am. J. Pathol.*, **177**, 2984–2999.
21. Nakamura, N. (2010) Emerging new roles of GM130, a cis-Golgi matrix protein, in higher order cell functions. *J. Pharmacol. Sci.*, **112**, 255–264.
22. Bunge, S., Knigge, A., Steglich, C., Kleijer, W.J., van Diggelen, O.P., Beck, M. and Gal, A. (1999) Mucopolysaccharidosis type IIIB (Sanfilippo B): identification of 18 novel alpha-*N*-acetylglucosaminidase gene mutations. *J. Med. Genet.*, **36**, 28–31.
23. Harmer, N.J. (2006) Insights into the role of heparan sulphate in fibroblast growth factor signalling. *Biochem. Soc. Trans.*, **34**, 442–445.
24. Natowicz, M.R., Chi, M.M.Y., Lowry, O.H. and Sly, W.S. (1979) Enzymatic identification of mannose 6-phosphate on the recognition marker for receptor-mediated pinocytosis of b-glucuronidase by human fibroblasts. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **76**, 4322–4326.
25. Van Hoof, F. and Hers, H.G. (1968) The abnormalities of lysosomal enzymes in mucopolysaccharidoses. *Eur. J. Biochem.*, **7**, 34–44.
26. Lubke, T., Lobel, P. and Sleat, D.E. (2009) Proteomics of the lysosome. *Biochim. Biophys. Acta*, **1793**, 625–635.
27. Wraith, J.E. (2009) Enzyme replacement therapy for the management of the mucopolysaccharidoses. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, **47** (Suppl. 1), S63–S65.
28. Pye, D.A., Vives, R.R., Hyde, P. and Gallagher, J.T. (2000) Regulation of FGF-1 mitogenic activity by heparan sulfate oligosaccharides is dependent on specific structural features: differential requirements for the modulation of FGF-1 and FGF-2. *Glycobiology*, **10**, 1183–1192.
29. Pan, C., Nelson, M.S., Reyes, M., Koodie, L., Brazil, J.J., Stephenson, E.J., Zhao, R.C., Peters, C., Selleck, S.B., Stringer, S.E. *et al.* (2005) Functional abnormalities of heparan sulfate in mucopolysaccharidosis-I are associated with defective biologic activity of FGF-2 on human multipotent progenitor cells. *Blood*, **106**, 1956–1964.
30. Lanner, F. and Rossant, J. (2010) The role of FGF/Erk signaling in pluripotent cells. *Development*, **137**, 3351–3360.
31. Ebert, A.D., Yu, J., Rose, F.F. Jr, Mattis, V.B., Lorson, C.L., Thomson, J.A. and Svendsen, C.N. (2009) Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*, **457**, 277–280.
32. Lee, G., Papapetrou, E.P., Kim, H., Chambers, S.M., Tomishima, M.J., Fasano, C.A., Ganat, Y.M., Menon, J., Shimizu, F., Viale, A. *et al.* (2009) Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature*, **461**, 402–406.
33. Marchetto, M.C., Carromeu, C., Acab, A., Yu, D., Yeo, G.W., Mu, Y., Chen, G., Gage, F.H. and Muotri, A.R. (2010) A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell*, **143**, 527–539.
34. Brennand, K.J., Simone, A., Jou, J., Gelboin-Burkhart, C., Tran, N., Sangar, S., Li, Y., Mu, Y., Chen, G., Yu, D. *et al.* (2011) Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature*, **473**, 221–225.
35. Marra, P., Salvatore, L., Mironov, A. Jr, Di Campli, A., Di Tullio, G., Trucco, A., Beznoussenko, G., Mironov, A. and De Matteis, M.A. (2007) The biogenesis of the Golgi ribbon: the roles of membrane input from the ER and of GM130. *Mol. Biol .Cell*, **18**, 1595–1608.
36. Puthenveedu, M.A., Bachert, C., Puri, S., Lanni, F. and Linstedt, A.D. (2006) GM130 and GRASP65-dependent lateral cisternal fusion allows uniform Golgi-enzyme distribution. *Nat. Cell Biol.*, **8**, 238–248.
37. de Graffenried, C.L. and Bertozzi, C.R. (2004) The roles of enzyme localisation and complex formation in glycan assembly within the Golgi apparatus. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **16**, 356–363.
38. Rivero, S., Cardenas, J., Bornens, M. and Rios, R.M. (2009) Microtubule nucleation at the cis-side of the Golgi apparatus requires AKAP450 and GM130. *EMBO J.*, **28**, 1016–1028.
39. Kodani, A., Kristensen, I., Huang, L. and Sutterlin, C. (2009) GM130-dependent control of Cdc42 activity at the Golgi regulates centrosome organization. *Mol. Biol. Cell*, **20**, 1192–1200.
40. Kodani, A. and Sutterlin, C. (2008) The Golgi protein GM130 regulates centrosome morphology and function. *Mol. Biol. Cell*, **19**, 745–753.
41. Bulow, H.E. and Hobert, O. (2004) Differential sulfations and epimerization define heparan sulfate specificity in nervous system development. *Neuron*, **41**, 723–736.
42. Gorsi, B. and Stringer, S.E. (2007) Tinkering with heparan sulfate sulfation to steer development. *Trends Cell Biol.*, **17**, 173–177.
43. Berzat, A. and Hall, A. (2010) Cellular responses to extracellular guidance cues. *EMBO J.*, **29**, 2734–2745.
44. Lin, X. (2004) Functions of heparan sulfate proteoglycans in cell signaling during development. *Development*, **131**, 6009–6021.
45. Van Vactor, D., Wall, D.P. and Johnson, K.G. (2006) Heparan sulfate proteoglycans and the emergence of neuronal connectivity. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **16**, 40–51.
46. Wei, J.H. and Seemann, J. (2009) Remodeling of the Golgi structure by ERK signaling. *Commun. Integr. Biol.*, **2**, 35–36.
47. Ohmi, K., Kudo, L.C., Ryazantsev, S., Zhao, H.Z., Karsten, S.L. and Neufeld, E.F. (2009) Sanfilippo syndrome type B, a lysosomal storage disease, is also a tauopathy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **106**, 8332–8337.
48. Villani, G.R., Di Domenico, C., Musella, A., Cecere, F., Di Napoli, D. and Di Natale, P. (2009) Mucopolysaccharidosis IIIB: oxidative damage and cytotoxic cell involvement in the neuronal pathogenesis. *Brain Res.*, **1279**, 99–108.
49. Villani, G.R., Gargiulo, N., Faraonio, R., Castaldo, S., Gonzalez, Y.R.E. and Di Natale, P. (2007) Cytokines, neurotrophins, and oxidative stress in brain disease from mucopolysaccharidosis IIIB. *J .Neurosci. Res.*, **85**, 612–622.
50. Sardiello, M., Palmieri, M., di Ronza, A., Medina, D.L., Valenza, M., Gennarino, V.A., Di Malta, C., Donaudy, F., Embrione, V., Polishchuk, R.S. *et al.* (2009) A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science*, **325**, 473–477.
51. Greenwood, R.S., Hillman, R.E., Alcala, H. and Sly, W.S. (1978) Sanfilippo A syndrome in the fetus. *Clin. Genet.*, **13**, 241–250.
52. Minelli, A., Danesino, C., Lo Curto, F., Tenti, P., Zampatti, C., Simoni, G., Rossella, F. and Fois, A. (1988) First trimester prenatal diagnosis of Sanfilippo disease (MPSIII) type B. *Prenat. Diagn.*, **8**, 47–52.
53. Ellinwood, N.M., Wang, P., Skeen, T., Sharp, N.J., Cesta, M., Decker, S., Edwards, N.J., Bublot, I., Thompson, J.N., Bush, W. *et al.* (2003) A model of mucopolysaccharidosis IIIB (Sanfilippo syndrome type IIIB): *N*-acetyl-alpha-D-glucosmaminidase deficiency in Schipperke dogs. *J. Inherit. Metab. Dis.*, **26**, 489–504.
54. Urayama, A., Grubb, J.H., Sly, W.S. and Banks, W.A. (2004) Developmentally regulated mannose 6-phosphate receptor-mediated transport of a lysosomal enzyme across the blood–brain barrier. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **101**, 12658–12663.
55. Park, I.H., Lerou, P.H., Zhao, R., Huo, H. and Daley, G.Q. (2008) Generation of human-induced pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.*, **3**, 1180–1186.
56. Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R. *et al.* (2007)

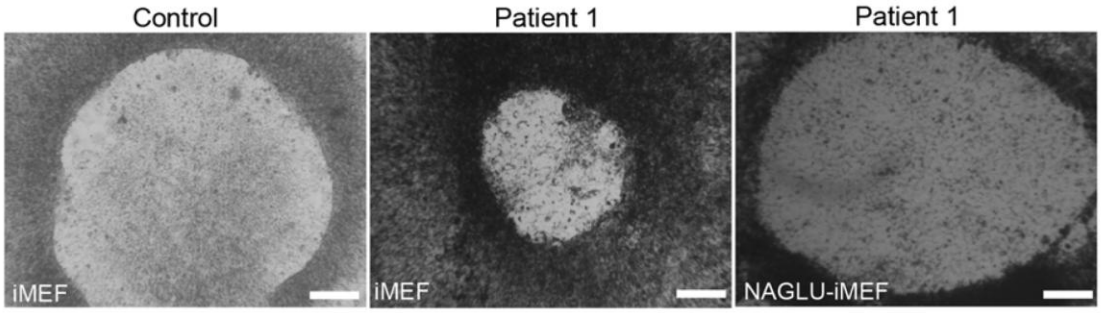

Downloaded from hmg.oxfordjournals.org at Institut Pasteur M?diath?que Scientifique on July 22, 2011

Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, **318**, 1917–1920.
57. de la Grange, P., Dutertre, M., Martin, N. and Auboeuf, D. (2005) FAST DB: a website resource for the study of the expression regulation of human gene products. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 4276–4284.
58. Troyanskaya, O., Cantor, M., Sherlock, G., Brown, P., Hastie, T., Tibshirani, R., Botstein, D. and Altman, R.B. (2001) Missing value estimation methods for DNA microarrays. *Bioinformatics*, **17**, 520–525.
59. de la Grange, P., Gratadou, L., Delord, M., Dutertre, M. and Auboeuf, D. (2010) Splicing factor and exon profiling across human tissues. *Nucleic Acids Res.*, **38**, 2825–2838.
60. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. and Yamanaka, S. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, **131**, 861–872.
61. Huangfu, D., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Snitow, M., Chen, A.E. and Melton, D.A. (2008) Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat. Biotechnol.*, **26**, 795–797.

Downloaded from hmg.oxfordjournals.org at Institut Pasteur M?diath?que Scientifique on July 22, 2011

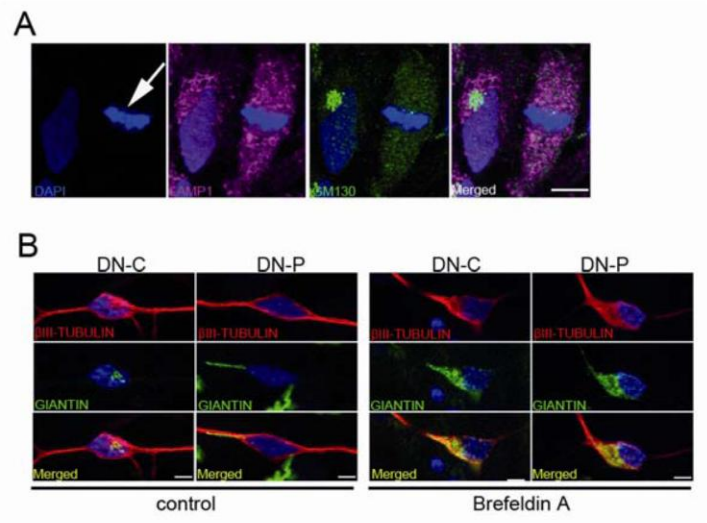
## Données Supplémentaires

**Fig. S1.** Generation of iPSc clones.



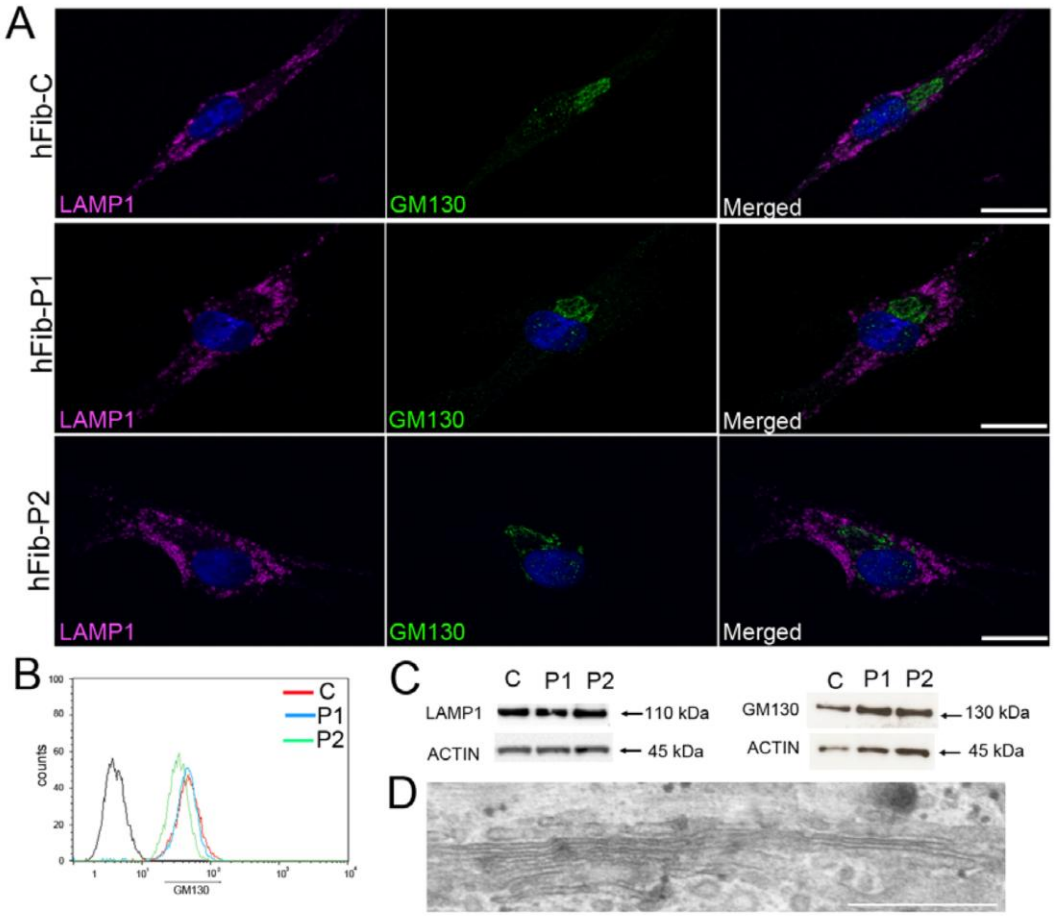

Control and Patient 1 fibroblasts were transduced with retrovirus vectors encoding OCT4, SOX2, KLF4 and c-MYC and cultured onto iMEF or NAGLU-iMEF. Four weeks later, patient iPS-like clones grown onto iMEF appeared thinner and smaller than control iPSc clones (left) or patient iPSc clones cultured onto NAGLU-iMEF (right). Patient 1 iPSc clones cultured on iMEF stopped growing and the vast majority of them could not be recovered after picking (middle). Similar results were obtained with control and patient 2 fibroblasts transduced with retrovirus vectors encoding OCT4, SOX2 and KLF4 without c-MYC. Scale bar: 200 μm.

**Fig. S2.** Golgi stacks vesicularisation in patient iPSc and Golgi complexes collapse in patient neurons were not affected.



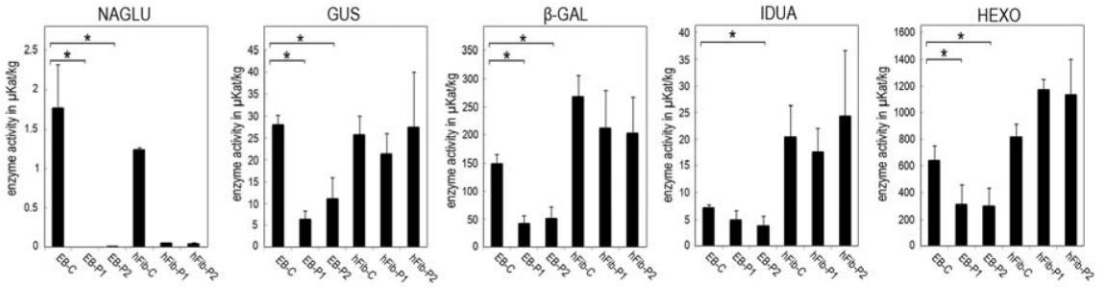

(A) Patient iPSc were cultured for ten days on Matrigel-coated wells and immunostained for LAMP1 (in purple) and GM130 (in green). Dense GM130 Golgi staining was observed in iPS non-dividing cells, while in dividing iPSc (arrow), assessed by DAPI staining (in blue), a diffuse staining spread over the cytoplasm. Scale bar: 10 μm. (B) Control (DN-C) and patient (DN-P) differentiated cultures containing neurons were treated or not with Brefeldin A (BFA, 1.25 μg/ml) and immuno-labelled for giantin (in green) and βIII-tubulin (in red). Dense giantin staining of Golgi complexes in non treated neurons (left panels) gives rise to diffuse signals spread over neuronal bodies after 25 minutes of BFA treatment (right panels). Golgi collapse was equally efficient in control and patient neurons. Scale bar: 10 μm.

**Fig. S3.** Patient fibroblasts have a mild phenotype.



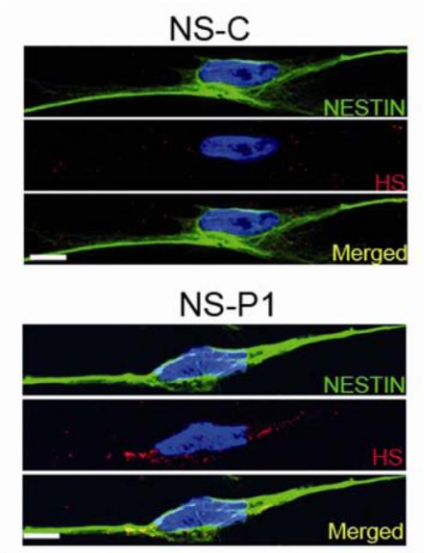

Skin fibroblast primary cultures established from the control volunteer (hFib-C) and the two MPSIIIB patients (hFib-P1, hFib-P2) were immuno-labeled with anti-LAMP1 (in purple) and anti-GM130 (in green) antibodies. (**A**) Apotome views show similar LAMP1 and GM130 signals in control and patient fibroblasts. Scale bar: 20 µm. (**B**) Flow cytometry analysis shows equivalent GM130 expression in control and patient fibroblasts. (**C**) LAMP1 and GM130 were detected by western blot in protein extracts. Control and patient cells show equivalent LAMP1 signal and GM130 signal. Actin signal was revealed to assess protein load on each lane. (**D**) Golgi complex morphology was analyzed in control and patient 1 fibroblasts using electron microscopy. A typical normal Golgi complex in a patient cell is shown. Scale bar: 0.5 µm.

**Fig. S4.** Catalytic activities of various lysosomal enzymes in EBs.



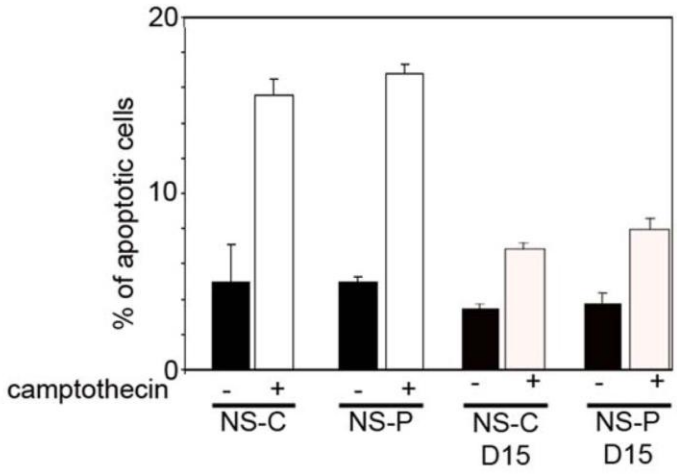

The catalytic activity of various lysosomal enzymes was measured in crude protein extracts of fibroblasts and of EBs grown in suspension culture for 10 days in the absence of NAGLU supply. Assays were performed as previously described (1). EB-C value is the mean from determinations in EBs derived from two controls iPSc (C1 and C3, n=6). EB-P1 and EB-P2 values are means of independent determinations in EBs derived from patient 1 (n=6) or patient 2 (n=6) iPSc. hFib-C, hFib-P1 and hFib-P2 values are means of independent determinations (n=3). Means are ± SEM. NAGLU, α-N-acetylglucosaminidase; GUS, β-glucuronidase; β-GAL, β-galactosidase; IDUA, α-L-iduronidase; HEXO, total hexosaminidase.

**Fig S5.** Neural cells accumulated heparan sulfate.



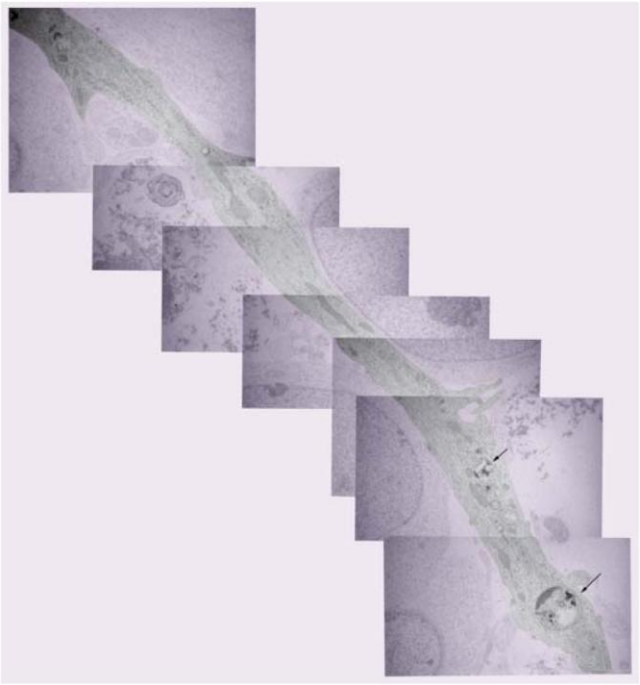

Control (NS-C) and patient (NS-P1) neurospheres were dissociated, plated on coverslips, fixed and immuno-labelled with anti-nestin (in green) and anti-HS (in red) antibodies. HS accumulation was observed in patient neural precursors compared to control cells. Scale bar: 10 μm.

**Fig S6.** Equivalent proportions of apoptotic cells in patient and control neural stem cells.



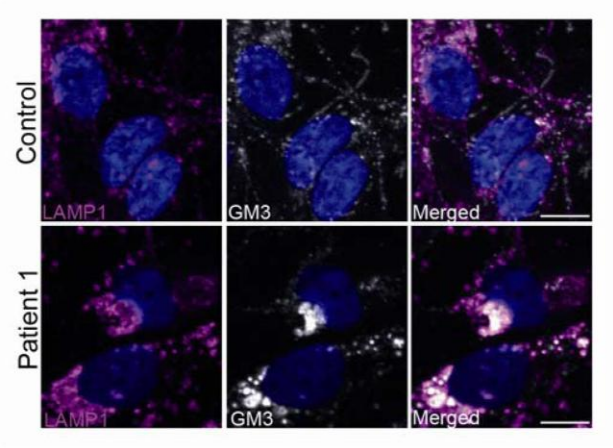

Control (NS-C) and patient (NS-P) neurospheres as well as control and patient cultures differentiated for 15 days (D15) were incubated with Annexin V followed by flow cytometric analysis. As positive controls, cells were treated with camptothecin (10 μM) for four hours to induce apoptosis before labelling. Percentages of alive, dead and apoptotic cells were determined. The bar chart indicates mean ± SEM percentages of apoptotic cells from three independent analyses of each cell type. Difference is not significant (Mann & Whitney test).

**Fig. S7.** A long patient process containing distended vacuoles.



Cultures were processed for ultra-structural analysis 5 weeks after adhesion and differentiation. The panel shows a low magnification composite view of the long process shown in Figure 6. The process can be easily identified as a neuronal prolongation that is 16 μm long. This process contains distended vesicles (arrows).

**Fig. S8.** GM3 accumulation in patient differentiated neural cells.




Cultures of control and patient neurospheres were dissociated and plated on polyornithine-laminin coated coverslips. Four weeks after adhesion, cells were stained with anti-GM3 (in white) and anti-LAMP1 (in purple) antibodies. More intense GM3 ganglioside staining was observed in distended LAMP1 positive vesicles in patient cells. Scale bar: 10 μm.

**Table S1**. Genes or gene families with modified expression levels in both fibroblasts and neural stem cells accumulating HS proteoglycans

| *Genes with modified expression in deficient versus genetically corrected fibroblasts* | | | *Genes of the same family with modified expression in neural stem cells (deficient versus control)* | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *gene name* | *fold change* | *p-value* | *gene name* | *fold change* | *p-value* | *Gene function* |
| Fibronectin 1 | - 1.4 | 10e-3 | Fibronectin 3<br>Laminin γ3<br>Laminin α2 | + 3.5<br>+ 2.4<br>- 6.5 | 8x10e-3<br>7x10e-3<br>3x10e-3 | ECM structural constituents<br>Integrin pathway |
| Gamma sarcoglycan | - 1.2 | 2x10e-6 | Delta sarcoglycan | - 1.7 | 4x10e-3 | Cytoskeleton<br>ECM-actin interaction |
| Elastin | - 1.4 | 10e-14 | Emilin | - 1.8 | 7x10e-4 | ECM structural constituents |
| Collagen 11A | - 2.2 | 4x10e-9 | Collagen 3α1<br>Collagen 6α6 | + 2.6<br>+ 2.5 | 7x10e-3<br>3x10e-2 | ECM structural constituents |
| CRELD2 | - 1.6 | 2x10e-5 | CRELD2 | - 2.0 | 1x10e-3 | EGF-like repeats<br>ECM structural constituent |
| Scube 3 | - 1.4 | 4x10e-5 | Scube 1 | - 1.9 | 9x10e-2 | ECM signaling |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | Discoidin | + 2.0 | 7x10e-3 | Contactin binding |
| Dynein heavy chain 1 | + 1.6 | 10e-6 | Dynein heavy chain 1 | - 1.7 | 7x10e-3 | Motor protein constituents |
| | | | Dynein light intermediate chain 1 | - 2.0 | 2x10e-2 | |
| | | | Dynein light chain 4 | - 1.7 | 9x10e-3 | |
| TFPI2 | - 1.2 | 2x10e-7 | TFPI2 | + 3.0 | 4x10e-3 | Serine protease inhibitor Heparin binding |
| MMP1 | - 1.2 | 3x10e-7 | MMP2 | + 1.8 | 8x10e-4 | Matrix metallo proteases |
| Claudin 11 | + 1.5 | 10e-7 | Claudin 11 | - 3.8 | 8x10e-4 | Oligodendrocyte tight junction |
| | | | Claudin 10 | - 3.7 | 8x10e-3 | Tight junction constituent |
| Clusterin ApoJ | + 1.6 | 6x10e-5 | Clusterin APoJ | - 2.4 | 10e-2 | Synapse turnover Alzheimer disease Apoptosis |
| Serpine 2 | + 1.2 | 2x10e-6 | Serpine 1 | - 2.0 | 3x10e-2 | Glia-derived nexin Serine protease inhibitor |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Secreto granin 5 | - 1.3 | 2x10e-5 | Secreto granin 5 | - 2.0 | 10e-2 | Neuropeptide Signaling |
| c-Fos | - 1.4 | 5x10e-9 | c-Fos | - 6.0 | 3x10e-2 | Transcription factor, PDGF pathway, stress |
| HSPA5 | - 2.2 | 10e-11 | HSPA5 | - 2.8 | 3x10e-2 | HSP70 family chaperone Stress response |
| SRY/Sox9 | - 1.3 | 3x10e-5 | SRY/ Sox9 | - 1.6 | 4x10e-3 | Transcription factor |
| HES1 | - 1.2 | 10e-5 | HEY1 | - 2.2 | 10e-6 | Transcription factor, enhancer of split, ectoderm |
| Msx1 | - 1.3 | 10e-5 | Msx2 | - 2.6 | 3x10e-3 | Transcription factors, mesoderm |
| MAP3K5 | - 1.2 | 3x10e-5 | MAPK4<br>MAPK15 | - 1.7<br>- 1.5 | 4x10e-2<br>10e-2 | EGF, FGF, PDGF, integrin signaling |
| RGS4 | - 1.2 | 3x10e-5 | RGS4<br>RGS2<br>RGS7<br>RGS16 | - 2.4<br>+ 1.7<br>- 1.8<br>- 1.7 | 2x10e-2<br>10e-2<br>10e-2<br>10e-3 | Regulators of G-protein cell surface signal transduction |
| DACT1 | - 1.6 | 10e-6 | WIF1 | - 11.9 | 4x10e-3 | antogonists of wnt signaling |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| SFRP2 | + 1.8 | 10e-6 | FZD1 | - 2.5 | 2x10e-3 | wnt pathway, frizzled receptors |
| | | | FZD6 | - 1.9 | 3x10e-2 | |
| Noggin | - 1.5 | 5x10e-6 | Noggin | - 2.3 | 4x10e-3 | TGF beta signaling pathway |
| | | | BMP7 | - 2.9 | 5x10e-4 | |
| | | | BMP10 | - 4.4 | 10e-4 | |
| | | | BAMBI | + 2.1 | 2x10e-2 | |
| | | | TGFB1 | + 1.7 | 10e-3 | |
| | | | TGFB2 | - 4.0 | 7x10e-3 | |
| | | | TGFB3 | - 2.3 | 7x10e-3 | |
| | | | TGFBR3 | + 2.5 | 2x10e-2 | |
| | | | Emilin | - 1.8 | 7x10e-4 | |

**Table S2**. Golgi genes with modified expression levels in neural stem cells accumulating HS proteoglycans.

| *gene name* | *fold change* | *p-value* | *Gene function* |
|---|---|---|---|
| Golgi phosphoprotein 1 | + 1.6 | 2x10e-3 | Golgi trafficking, structure |
| Golgi phosphoprotein 3 | -1.8 | 3x10e-4 | |
| GOPC | -2 | 1x10e-2 | Golgi trafficking |
| FLJ22795 | -1.8 | 1x10e-2 | Hypothetical protein, similar to GM130 |
| ERGIC3 | -1.4 | 1x10e-2 | ERGIC and golgi 3 |
| GOLGA8A | - 3.3 | 5x10e-4 | Golgi localisation |
| FAM7A1 | -1.8 | 2x10e-2 | |
| GOLG5A | - 1.4 | 2x10e-4 | |
| GOLGA4 | -1.4 | 2x10e-2 | |
| PAPD1 | -1.3 | 8x10e-3 | |
| FLJ40113 | - 1.5 | 1x10e-2 | |
| COG6 | - 1.5 | 6x10e-3 | Golgi morphology, localisation |
| COG1 | -1.4 | 8x10e-3 | |
| COG5 | -1.4 | 2x10e-3 | |
| GOLT1B | - 1.5 | 5x10e-3 | Vesicle transport |
| RGP1 | -1.3 | 2x10e-3 | |
| GGA2 | -1.5 | 3x10e-2 | Trans-Golgi network to lysosome trafficking |
| GGA1 | 1.3 | 1x10e-3 | |
| GGA3 | -1.2 | 4x10e-3 | |

**Table S3.** List of primers used for RT-PCR, qRT-PCR and bisulfite sequencing analyses.

| primer | Sequence (5'- 3') | application |
|---|---|---|
| SOX2-F | TTACCTCTTCCTCCCACTCCAG | RT-PCR |
| SOX2-R | GGGTTTTCTCCATGCTGTTTCT | RT-PCR |
| KLF4-F | ACCCACACAGGTGAGAAACCTT | RT-PCR |
| KLF4-R | GTTGGGAACTTGACCATGATTG | RT-PCR |
| OCT4-F | ATGCACAACGAGAGGATTTTGA | RT-PCR |
| OCT4-R | CTTTGTGTTCCCAATTCCTTCC | RT-PCR |
| c-MYC-F | AGCAGAGGAGCAAAAGCTCATT | RT-PCR |
| c-MYC-R | CCAAAGTCCAATTTGAGGCAGT | RT-PCR |
| NANOG-F | AGTCCCAAAGGCAAACAACCCACTTC | RT-PCR |
| NANOG-R | TGCTGGAGGCTGAGGTATTTCTGTCTC | RT-PCR |
| TERT-F | AGCTATGCCCGGACCTCCAT | RT-PCR |
| TRET-R | GCCTGCAGCAGGAGGATCTT | RT-PCR |
| REX1-F | AAAGCATCTCCTCATTCATGGT | RT-PCR |
| REX1-R | TGGGCTTTCAGGTTATTTGACT | RT-PCR |
| GAPDH-F | GATGACATCAAGAAGGTGGTGA | RT-PCR |
| GAPDH-R | GTCTACATGGCAACTGTGAGGA | RT-PCR |
| SOX2-F | GGCACACTGCCCCTCTCA | qRT-PCR |
| SOX2-R | GAATATCACCACTTTGTACAAGAAAGCT | qRT-PCR |
| SOX2-probe | CATGTGAAAGGGTGGGC | qRT-PCR |
| KLF4-F | CGCCTTACACATGAAGAGACATTT | qRT-PCR |
| KLF4-R | GAATATCACCACTTTGTACAAGAAAGCT | qRT-PCR |
| KLF4-probe | TAAAAGGGTGGGCGCGC | qRT-PCR |
| OCT4-F | AGCGCCGGTCGCTACCATTACCA | qRT-PCR |
| OCT4-R | GAAGCCTTTCCCCCTGTCTCT | qRT-PCR |

| | | |
|---|---|---|
| OCT4-probe | CCTGCCCGGTTATTATTATTTTTG | qRT-PCR |
| c-MYC-F | ACGGAACTCTTGTGCGTGAAA | qRT-PCR |
| c-MYC-R | GCTCAGCTGGAATATCACCACTT | qRT-PCR |
| c-MYC-probe | CGACCCAGCTTTCTTGTA | qRT-PCR |
| LAMP1-F | Taqman, Gene Expression Assay<br>Hs00174766_m1 | |
| GAPDH | Taqman Gene Expression Assay<br>Hs99999905_m1 | qRT-PCR |
| OCT4-F | GGATGTTATTAAGATGAAGATAGTTGG | Bisulfite<br>sequencing |
| OCT4-R | CCTAAACTCCCCTTCAAAATCTATT | Bisulfite<br>sequencing |

1 Cressant, A., Desmaris, N., Verot, L., Brejot, T., Froissart, R., Vanier, M.T., Maire, I. and Heard, J.M. (2004) Improved behavior and neuropathology in the mouse model of Sanfilippo type IIIB disease after adeno-associated virus-mediated gene transfer in the striatum. *J. Neurosci.*, **24**, 10229-10239.

# 2. Activation des plaques d'adhérence focales par les saccharides d'héparane sulfate solubles extra-cellulaires

## *2.1. Introduction*

L'étude d'expression génique que nous avons réalisée sur les précurseurs neuraux dérivés des cellules iPS de patients MPSIIIB a montré que l'expression de nombreux gènes était altérée et notamment celle de gènes codant pour des molécules de la matrice extracellulaire (MEC) ainsi que celle de gènes codant pour des protéines impliquées dans les interactions des cellules avec la MEC.

Les interactions des cellules avec la MEC sont cruciales pour le développement, le fonctionnement et la plasticité du SNC. Ces interactions impliquent des récepteurs comme les intégrines et sont modulées par les protéoglycanes à HS (HSPG). L'accumulation d'HSO pouvant interagir avec les récepteurs et la modification de l'expression de gènes de la voie de signalisation des intégrines ont suggéré que les cellules pourraient présenter des défauts dans leur perception de l'environnement cellulaire.

Ces éléments nous ont conduit à étudier l'implication des HS partiellement digérés dans les interactions des cellules avec la MEC et en particulier, les conséquences de l'accumulation d'HS sur la signalisation des intégrines.

Les intégrines sont dés récepteurs hétérodimériques transmembranaires qui fixent un large spectre de molécules de la MEC. Lorsqu'elles sont activées par un remodelage de la MEC, les intégrines vont recruter des protéines composant les plaques d'adhérence focales (focal adhesion ou FA) (Figure 20). Les plaques d'adhérence focales sont des complexes protéiques dynamiques qui relient le cytosquelette d'actine à la MEC. Ces complexes ne sont pas seulement des points d'ancrage des cellules, mais ont également un rôle de senseur qui informent la cellule de l'état de la MEC (Riveline et al., 2001). Les plaques d'adhérence focales jouent un rôle crucial dans l'adhérence, dans la polarisation et la migration des cellules, ou encore dans la prolifération cellulaire. Le processus de migration implique la liaison des intégrines à la MEC, la formation des plaques d'adhérence focales qui vont servir de point d'ancrage à l'avant de la cellule ainsi que la formation d'une protrusion à l'avant de la cellule. Une force de traction du cytosquelette va ensuite permettre à la cellule d'avancer, les plaques d'adhérence présentes à l'arrière de la cellule vont alors être rompues et ainsi de suite (Friedl and Wolf, 2009).

Les plaques d'adhérence focales sont des complexes composés de nombreuses protéines (Huttenlocher and Horwitz, 2011). Parmi ces protéines, la kinase FAK (Focal Adhesion Kinase) qui est activée par sa fixation à l'intégrine induit l'activation

de la paxilline qui va alors recruter diverses protéines impliquées dans les modifications de l'organisation du cytosquelette d'actine comme la vinculine et permettre ainsi une réorganisation du cytosquelette nécessaire pour la migration et la polarité cellulaire via le recrutement de ces nombreuses protéines.

La signalisation des intégrines est notamment contrôlée par un HSPG spécifique le syndécan 4 qui agit via sa partie protéique intracellulaire (Bernfield et al., 1999). Les chaînes saccharidiques d'HS régulent également le complexe des plaques d'adhérence focales par la fixation des HS à la fibronectine. De plus les HS sont capables de se fixer à l'intégrine β1 *in vitro* (Faye et al., 2009) mais l'implication de la fixation des HS sur la régulation de la signalisation des intégrines reste inconnue.

La polarisation et la migration en réponse à des signaux environnementaux sont communément étudiées dans des cultures d'astrocytes (Etienne-Manneville, 2006). Ainsi, cette étude a été menée sur des astrocytes murins normaux et déficients pour l'enzyme NAGLU (MPSIIIB). Puis d'autres types cellulaires ont été analysés dont les précurseurs neuraux humains issus des cellules iPS de sujets sains et patients MPSIIIB.

Lors de cette étude, nous avons montré que les HS partiellement dégradés accumulés de manière chronique dans le milieu extra-cellulaire des astrocytes MPSIIIB activaient le regroupement des intégrines β1, le recrutement de FAK, de la paxilline et de la vinculine aux plaques d'adhérence focales, associés à une activation chronique de FAK. Nous avons montré que cette activation chronique de FAK était également présente dans les précurseurs neuraux issus de cellules iPS de patients atteints de MPSIIIB. L'activation chronique de la signalisation des intégrines a réduit la capacité de réponse des cellules aux signaux extracellulaires et a entravé la capacité des astrocytes à se polariser et à migrer. Enfin, nous avons montré que des HS ajoutés de façon exogène dans le milieu extra-cellulaire activaient rapidement la kinase FAK ainsi que la formation de plaques d'adhérence focales dans les astrocytes murins normaux et dans les précurseurs neuraux humains normaux issus de cellules iPS.

Une partie des résultats de cette étude en cours de publication est détaillée ci-dessous car elle correspond à ma contribution directe au travail. Les autres résultats décrivant en détail les défauts de migration et polarisation dans les astrocytes murins, les précurseurs neuraux murins et les fibroblastes humains, sont disponibles en annexe (Bruyère et al., 2012).

*Pour une meilleure lisibilité, les numéros des figures présentées ci-dessous ne correspondent pas à ceux de la publication.*

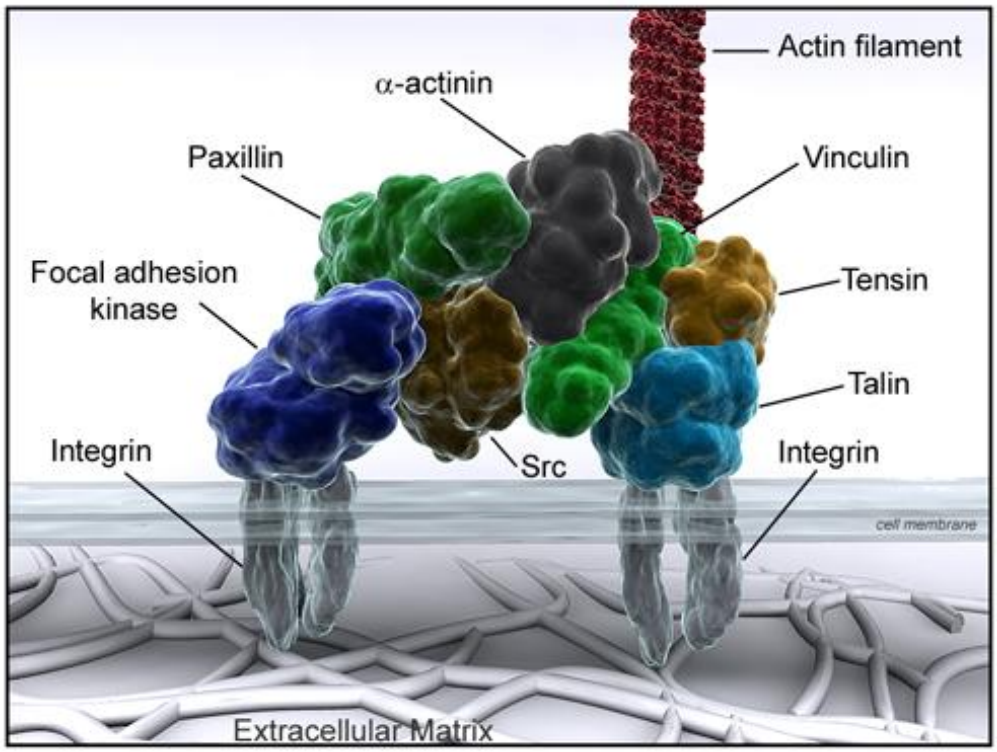



**Figure 20.** Complexe protéique formant une plaque d'adhérence focale. **(Source : http://www.reading.ac.uk/).**
Les plaques d'adhérence focales sont constituées de nombreuses protéines. Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires qui vont fixer des molécules de la MEC. Après avoir fixé des molécules de la MEC, les intégrines recrutent de nombreuses protéines dont la kinase FAK, la Paxilline et la vinculine.

## *2.2. Résultats*

### 2.2.1. Augmentation de l'expression de l'intégrine β1 dans les astrocytes MPSIIIB

Comme nous l'avons vu précédemment, le profil d'expression génique des cellules souches neurales issus de cellules iPS de patients atteints de MPSIIIB a montré une modification du niveau d'expression d'ARNm codant pour des protéines d'interaction avec la MEC. Parmi ces gènes, ceux codant diverses chaînes des intégrines (αV, α1, α2, α8, α9, α10 et β3) étaient affectés.

La modification de l'expression l'ARNm de l'intégrine β1 (CD29) a été analysée par RT-PCR quantitative dans des astrocytes murins MPSIIIB. Après 24 heures de culture sur un substrat de poly-ornithine (PO), les astrocytes MPSIIIB ont montré un niveau d'expression de l'ARNm de l'intégrine β1 supérieur à celui des contrôles (Figure 21A). Les analyses de quantité de protéine intégrine β1 par western-blot ont également révélé une augmentation significative (Figure 21B). Les marquages en immunofluorescence réalisés avec un anticorps reconnaissant spécifiquement la forme activée de l'intégrine β1 en association avec les chaînes α4 ou α6 ont également montré une augmentation du signal dans les astrocytes MPSIIIB (Figure 21C). Enfin, le co-marquage de l'intégrine β1 et du marqueur des plaques d'adhérence focales, la vinculine, a montré une co-localisation plus fréquente chez les astrocytes mutants que chez les contrôles, suggérant qu'une forte proportion des signaux β1-intégrine était associée à des plaques d'adhérence focales (encart Figure 21C).

La correction du défaut enzymatique dans les astrocytes MPSIIIB à l'aide d'un vecteur lentiviral induisant l'expression de la NAGLU a restauré les niveaux d'expression d'ARNm et de la protéine intégrine β1 à des niveaux équivalents à ceux des cellules contrôles (Figure 21), suggérant que l'augmentation du niveau d'expression de l'intégrine β1 dans les astrocytes MPSIIIB était liée à l'accumulation d'HS partiellement dégradés.

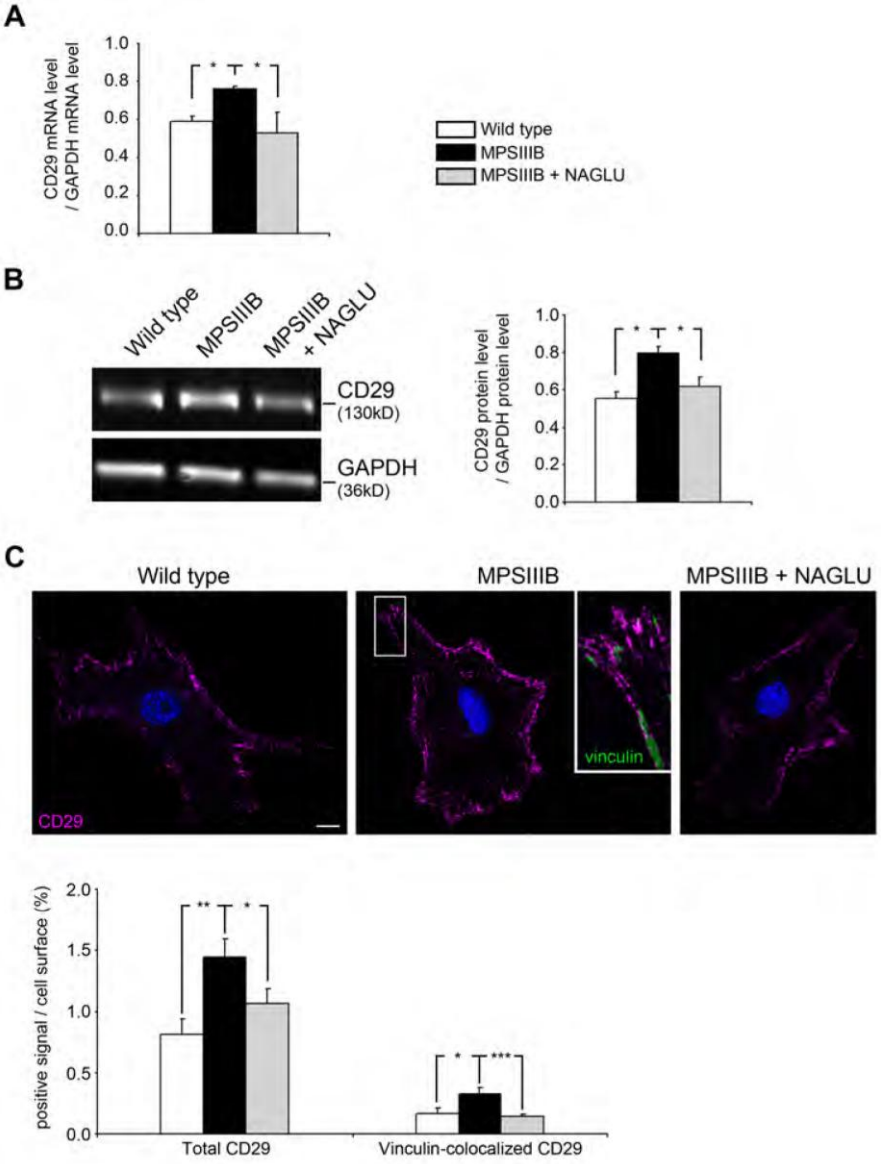



**Figure 21.** L'intégrine β1 (CD29) est surexprimée dans les astrocytes MPSIIIB
Des cultures d'astrocytes ont été établies à partir de cerveaux de souris contrôles et MPSIIIB. Les astrocytes murins MPSIIIB ont été soit non traités (MPSIIIB), soit exposés à un vecteur lentiviral induisant l'expression de la NAGLU (MPSIIIB+NAGLU),
**A** : Niveau d'expression des ARNm de l'intégrine β1 (CD29) détecté par RT-PCR quantitative et normalisé en fonction du niveau d'expression de l'ARNm de GAPDH.
**B** : Western-blot d'un extrait protéique total, révélé avec des anticorps anti-intégrine β1 (anti-CD29 clone 18, 130kD) et anti-GAPDH. L'histogramme montre l'intensité du signal de l'intégrine β1 rapportée au signal de GAPDH.
**C** : Astrocytes doublement marqués avec des anticorps dirigés contre la forme activée de l'intégrine (anti-CD29 clone 9EG7, en violet) et contre la vinculine (vert). Les noyaux sont contre-colorés avec du Hoechst (bleu). L'encart montre la colocalisation partielle des signaux de l'intégrine β1 et de la vinculine dans les FA.
Barre d'échelle : 10µm.
Les données proviennent de 3 cultures indépendantes d'astrocytes. Les valeurs indiquées sont la moyenne ± SEM, *: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001, test de Mann-Whitney (A, B, n=3) ou test de Student (C, n≥60 cellules comptées par condition).

### 2.2.2. Les plaques d'adhérence focales sont plus abondantes dans les astrocytes MPSIIIB

Une fois activées et regroupées, les intégrines recrutent des protéines impliquées dans la formation des plaques d'adhérence focales qui contiennent la vinculine, la kinase FAK phosphorylée (pFAK) et la paxilline phosphorylée (pPaxilline) (Legate et al., 2009).

Les marquages par immunofluorescence révélant la vinculine sur des astrocytes contrôles après 24 heures de culture sur PO ont montré un faible signal fluorescent, alors que sur des astrocytes MPSIIIB, le marquage de la vinculine était intense et abondant (Figure 22A). De plus le co-marquage de la vinculine avec pFAK a montré un signal plus intense de pFAK dans les astrocytes MPSIIIB (1,7 à 2 fois) qui était co-localisé avec la vinculine (Figure 22C).

Afin de vérifier si FAK était activée, nous avons réalisé un western-blot avec un anticorps dirigé contre les phosphotyrosines après immunoprécipitation de FAK. Une augmentation du signal de pFAK de 1,3 fois a été observée dans les astrocytes MPSIIIB par rapport aux contrôles (Figure 22D), confirmant la phosphorylation de FAK.

Enfin, la phosphorylation de FAK induisant la formation de complexes FAK-Src qui phosphorylent la paxilline sur la tyrosine 118 (pPaxilline), nous avons observé un signal plus intense dans les astrocytes MPSIIIB après marquage avec un anticorps spécifique de pPaxilline (Figure 22B).

L'ensemble de ces résultats a montré que la formation des plaques d'adhérence focales était plus intense dans les astrocytes MPSIIIB dans des conditions de culture qui ne stimulaient pas leur formation dans les astrocytes contrôles. De plus, après correction enzymatique des astrocytes MPSIIIB les signaux révélés par les anticorps dirigés contre la vinculine, pFAK et pPaxilline étaient normalisés dans les astrocytes MPSIIIB avec des niveaux équivalents aux signaux mesurés dans les astrocytes contrôles. Ces résultats ont suggéré que l'augmentation de l'activation de la formation des plaques d'adhérence focales dans les cellules déficientes en NAGLU était liée à l'accumulation des HS partiellement digérés.

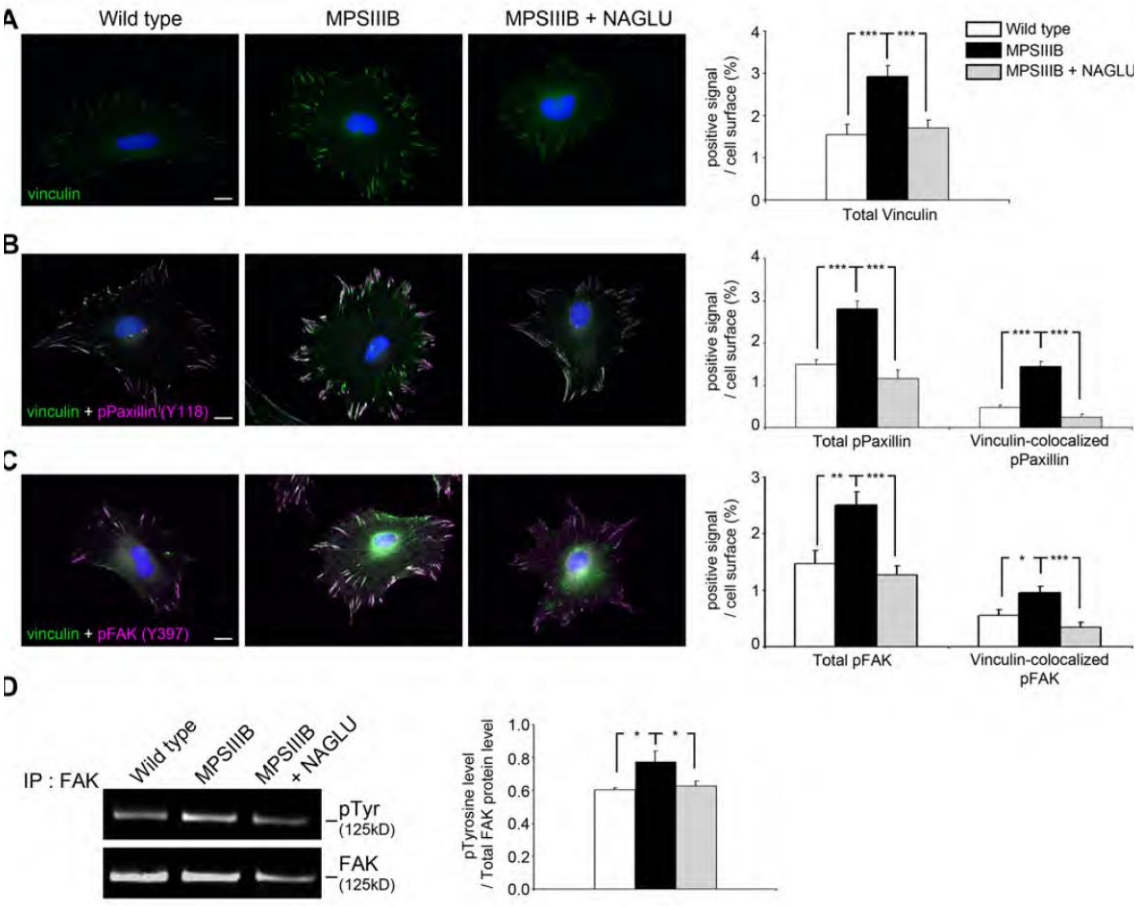



**Figure 22.** Les plaques d'adhérence focales sont plus abondantes dans les astrocytes MPSIIIB.
Les astrocytes murins ont été préparés comme pour la Figure 21 et immuno-marqués.
**A** : Marquage avec un anticorps dirigé contre la vinculine (vert).
**B** : Co-marquage de la vinculine (vert) et de la paxilline phosphorylée sur la tyrosine 118 (en violet).
**C** : Co-marquage de la vinculine (vert) et de FAK phosphorylée sur la tyrosine 397 (en violet).
Les noyaux sont contre-colorés en bleu.
Barre d'échelle 10µm.
Les histogrammes indiquent l'intensité du signal rapportée à la surface cellulaire.
**D** : Immunoprécipitation de FAK à partir d'extraits protéiques totaux suivie d'une immunodétection des tyrosines phosphorylées (pTyr) par Western-blot. Les histogrammes montrent l'intensité du signal de la protéine phosphorylée de 125 KDa rapportée au signal de FAK.
Les données proviennent de 3 cultures indépendantes d'astrocytes, Les valeurs indiquées sont la moyenne ± SEM, *: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001, test de Student (A-C, n≥60 cellules comptées par condition, test de Mann-Whitney (D, n=3).

### 2.2.3. Activation de la phosphorylation de FAK par les HS dans les astrocytes normaux

Pour étudier le lien direct entre HSO et la formation de plaques d'adhérence, nous avons ensuite cherché à établir si des HS exogènes extra-cellulaires étaient capables d'induire l'activation de la signalisation de FAK dans des cellules non malades. Ces expériences ont été menées dans des cultures d'astrocytes murins normaux.

Des astrocytes murins contrôles ont été exposés pendant 1 heure à 10µg/ml de fractions d'HS (dp2, dp8, dp14 ou non digérés ; dp : degré de polymérisation, dp2 : disaccharide, dp8 : octosaccharide…) ou à 10µg/ml de dextran sulfate comme contrôle. L'immuno-précipitation de FAK suivie d'un western-blot révélant les tyrosines phosphorylées a montré que la phosphorylation de FAK était activée dans les astrocytes traités par les fractions dp8 et dp14 ainsi que par les HS non digérés (Figure 23B).

Ces résultats, ainsi que ceux de la Figure 22, ont montré que FAK était activée de façon constitutive dans les astrocytes malades et que cette activation pouvait être reproduites avec des HS de 8 saccharides ou plus dans des astrocytes normaux.

### 2.2.4. Activation constitutive de la phosphorylation de FAK dans les précurseurs neuraux humains MPSIIIB et activation par des HS dans des précurseurs neuraux normaux.

Le même phénotype a ensuite été recherché dans des cellules humaines en étudiant des précurseurs neuraux humains MPSIIIB et normaux. Ces précurseurs ont été dérivés des mêmes clones d'iPS décrits l'article de la partie 1 (Lemonnier et al., 2011).

La proportion de FAK phosphorylée a été analysée dans des précurseurs neuraux issus des cellules iPS des patients MPSIIIB. Les résultats ont montré un niveau supérieur de FAK phosphorylée dans les cellules de patients comparé aux cellules de sujets non malades.

Des précurseurs neuraux normaux ont ensuite été exposés à 10µg/ml d'HS commerciaux non digérés ou à 10µg/ml de dextran sulfate. La proportion de FAK phosphorylée a été révélée comme précédemment et les résultats ont montré que

l’ajout d’HS dans le milieu de culture stimulait la phosphorylation de FAK dans les cellules neurales normales (Figure 23B).

Pris dans leur ensemble, ces résultats ont montré que la signalisation de FAK était activée de manière constitutive dans les cellules murines et humaines MPSIIIB accumulant des HSO et que les HS exogènes étaient capables d’activer FAK dans les mêmes cellules non malades.

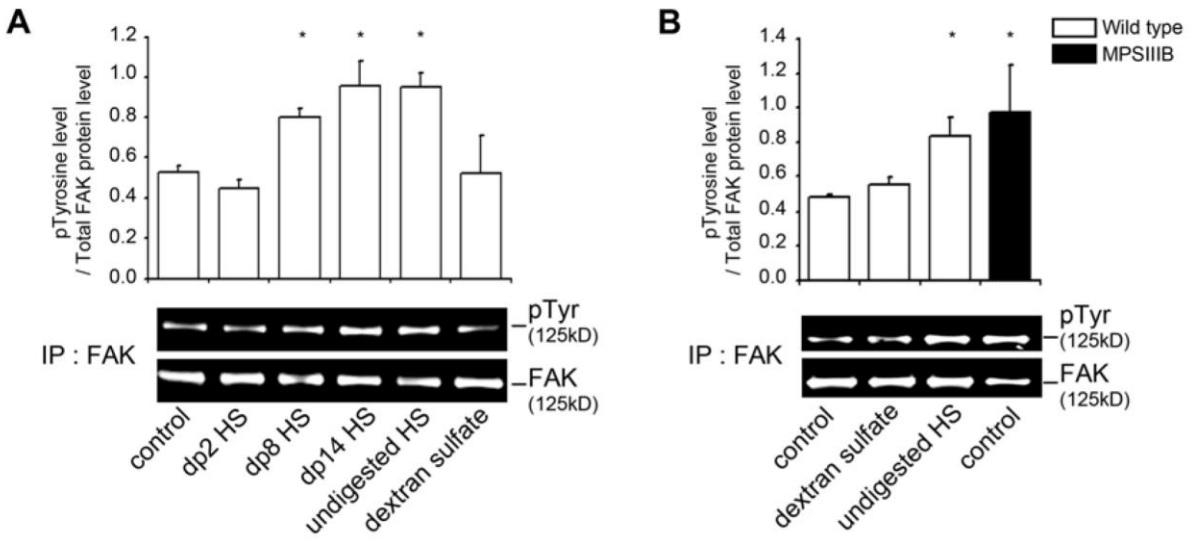



**Figure 23.** Activation de la phosphorylation de FAK par les HS exogènes dans les astrocytes murins et dans les précurseurs neuraux humains.

Les cultures de cellules MPSIIIB ou contrôles ont été ensemencées à faible densité et traitées pendant 1 heure avec ou sans 10 µg/ml de fractions d'HS commerciaux (dp2, dp8 ou dp14) ou avec 10µg/mL de dextran sulfate.

A : Niveau de FAK phosphorylée sur les tyrosines rapporté au niveau total de FAK dans les astrocytes murins.

B : Niveau de FAK phosphorylée sur les tyrosines rapporté au niveau total de FAK dans les précurseurs neuraux humains.

Les histogrammes représentent les moyennes ± SEM de trois cultures indépendantes. *: $P<0.05$, **: $P<0.01$ and ***: $P<0.001$, test de Mann-Whitney (A, n=3; B n=4).

## *2.3. Conclusion*

Nous avons montré dans cette étude que l'intégrine β1 était surexprimée dans les astrocytes MPSIIIB et que cette surexpression était associée à une augmentation du nombre de plaques d'adhérence focales avec un recrutement plus important de la paxilline, la vinculine et la pFAK. L'ensemble de ces anomalies a été corrigé par l'apport de l'enzyme déficiente après transfert du gène codant pour cette enzyme. Ces résultats ont montré que les HS accumulés chroniquement par les cellules déficientes en NAGLU perturbaient la signalisation des intégrines et induisaient la formation de plaques d'adhérence focales surnuméraires.

Des résultats, non détaillés ici (voir en annexe : Bruyère et col.), ont également permis de montrer que le recrutement des plaques d'adhérence focales au front de migration des astrocytes MPSIIIB était altéré et que les cellules présentaient des défauts de polarisation et de migration.

Pris dans leur ensemble, ces résultats ont indiqué que l'activation constitutive des intégrines altérait la capacité des cellules à détecter les signaux de l'environnement ou à y répondre. Cette incapacité est vraisemblablement causée par l'accumulation d'HS partiellement dégradés dans le milieu extracellulaire comme l'ont suggéré les résultats obtenus sur les mêmes cellules corrigées et donc n'ayant plus d'HS partiellement digérés s'accumulant.

De façon intéressante, les analyses concernant la capacité des HS partiellement digérés à influer sur ces processus ont indiqué qu'ils étaient capables d'induire la formation de plaques d'adhérence focales dans des astrocytes non malades. Ces HS partiellement digérés ont induit l'activation de la kinase FAK dans les astrocytes contrôles et les précurseurs neuraux contrôles. Ces résultats ont donc montré que les HS partiellement dégradés présents dans le milieu extracellulaire étaient directement responsables de la formation de plaques d'adhérence focales surnuméraires. Il est donc vraisemblable qu'ils soient également responsables de l'incapacité des cellules à répondre aux signaux extracellulaires induisant la polarisation et la migration.

# 3. Génération de cellules souches pluripotentes induites et modélisation de la SLA2.

## *3.1. Introduction*

Les mutations dans le gène ALS2 sont responsables de plusieurs maladies autosomiques récessives du motoneurone. Ces pathologies sont la sclérose latérale amyotrophique juvénile (SLA), la sclérose latérale primaire juvénile (SLP) et la paraplégie spastique familiale ascendante à début précoce (IAHSP) (Hadano et al., 2001; Yang et al., 2001; Eymard-Pierre et al., 2002). Ces trois maladies ont en commun une dégénérescence progressive des neurones pyramidaux du cortex moteur appelés motoneurones supérieurs. Dans la SLA s'ajoute une dégénérescence des motoneurones du tronc cérébral et de la moelle épinière, appelés motoneurones inférieurs.

Le gène ALS2 code une protéine de 180 kDa qui possède plusieurs domaines protéiques (Figure 7). Cette protéine est un facteur d'échange de nucléotides guanyliques pour la petite GTPase Rab5 (Otomo et al., 2003; Kunita et al., 2004; Topp et al., 2004). La protéine Rab5 est un important régulateur de l'endocytose, de la fusion des endosomes et du trafic endosomal (Stenmark, 2009). Il a été montré que l'alsine est impliquée dans la régulation de la fusion et du trafic des endosomes via l'activation de Rab5 (Otomo et al., 2003; Topp et al., 2004).

D'autre part, l'alsine est un effecteur de la protéine Rac1 (Kunita et al., 2007). L'activation de Rac1 entraîne son interaction avec l'alsine cytoplasmique et sa relocalisation aux compartiments membranaires comme les replis membranaires (membranes ruffles), les macropinosomes et les endosomes. Cette relocalisation via Rac1 de l'alsine serait nécessaire à l'activation de Rab5 (Kunita et al., 2007). Par ailleurs, Rac1 est impliquée dans la croissance des axones et des dendrites (Li et al., 2000; Nikolic, 2002) et il a été montré que l'alsine est impliquée dans la croissance des neurites via ses interactions avec Rac1 (Tudor et al., 2005; Jacquier et al., 2006; Otomo et al., 2008).

Pour étudier la physiopathologie de la forme ALS2 de la SLA, six groupes ont généré des lignées de souris ALS2$^{-/-}$ (Devon et al., 2006; Hadano et al., 2006; Yamanaka et al., 2006; Deng et al., 2007; Cai et al., 2008; Gros-Louis et al., 2008). Néanmoins, aucune de ces lignées de souris n'a reproduit la pathologie humaine. Ont été observés un niveau faible de dysfonctionnement moteur et une dégénérescence axonale chez les animaux âgés dans certains modèles (Hadano et al., 2006; Yamanaka et al., 2006; Deng et al., 2007).

Ces modèles animaux étant peu pertinents pour l'étude de la maladie, l'émergence de la technologie de reprogrammation de cellules somatiques humaines en cellules iPS et la possibilité de différencier ces cellules en neurones a offert la possibilité d'avoir accès aux cellules humaines affectées dans les pathologies causées par des mutations dans le gène ALS2/alsine.

Nous avons généré des cellules iPS à partir de fibroblastes de trois patients présentant des mutations dans le gène de l'alsine et de deux contrôles d'âges équivalents. Puis nous avons développé un protocole de différenciation des cellules iPS en précurseurs neuraux pouvant être amplifiés, conservés et capables de se différencier en neurones de façon synchronisée. De plus, nous avons développé une méthode de purification des neurones permettant l'obtention de cultures pures de neurones. Enfin, nous avons montré que les neurones issus de cellules iPS de patients présentaient des défauts au niveau du traffic des endosomes et un accroissement du nombre de neurites à proximité du corps cellulaire.

## *3.2. Résultats*

### 3.2.1. Génération de clones d'iPS de patients.

Des clones d'iPS ont été générés à partir de deux cultures de fibroblastes de sujets sains âgés de 11 ans (C-11) et 33 ans (C-33) et de trois cultures de fibroblastes de patients présentant des mutations récessives homozygotes dans le gène ALS2 codant pour la protéine Alsine. Les patients PA1 et PA2 souffrent de paraplégie spastique familiale ascendante à début précoce (IAHSP) (Eymard-Pierre et al., 2002).

Le patient 1 (PA1), âgé de 27 ans lors du prélèvement, présente une mutation non-sens, M1207X (c.3742delA), précédemment décrite (Eymard-Pierre et al., 2002). Cette mutation entraine la production d'une protéine Alsine tronquée à partir des motifs MORN (Figure 7). Au niveau clinique, sa pathologie a débuté à l'âge de un an. Il a présenté une atteinte des membres supérieurs à 7 ans, puis une atteinte bulbaire à 13 ans (Eymard-Pierre et al., 2002).

Le patient 2 (PA2), âgé de 17 ans lors du prélèvement, est porteur d'une mutation ponctuelle dans le dernier nucléotide de l'intron 5 entrainant une perte du site accepteur d'épissage qui provoque la perte de 10 nucléotides sur l'ARNm. Cette mutation V491fsX3 (IVS5(c.1471) 1G>T(C.1472_1481delTTTCCCCCAG)), précédemment décrite (Eymard-Pierre et al., 2002), entraine la formation d'un codon stop et la traduction du gène en une protéine tronquée dans le domaine N-terminal

RLD. Au niveau clinique, sa pathologie a débuté à l'âge de un an et demi, il a perdu la capacité de marcher à 4 ans, puis a présenté une atteinte des membres supérieurs à 6 ans et une atteinte bulbaire à 8 ans (Eymard-Pierre et al., 2002).

Le patient 3 (PA3), âgé de 9 ans lors du prélèvement, est porteur d'une mutation faux sens pAla878Pro (c.2634G>C) au sein du domaine PH/DH. Le gène est transcrit en entier et la protéine mutante n'est pas tronquée. Cette mutation et l'évolution clinique du patient n'ont pas été décrites.

Pour les patients PA1 et PA2 une instabilité des protéines Alsine synthétisées a été rapportée, suggérant une perte de fonction de la protéine chez ces patients (Yamanaka et al., 2003). Rien n'a été rapporté pour le patient PA3, mais des évidences suggèrent une instabilité de cette protéine mutée. En effet d'autres mutations ont été décrites dans le gène ALS2 conduisant à la synthèse de protéines non tronquées, comme pour PA3, et instables (Eymard-Pierre et al., 2006).

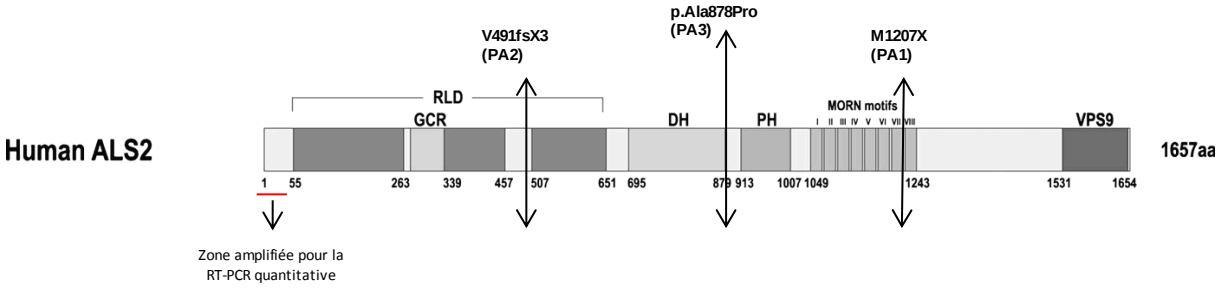



**Figure 7**. Représentation schématique de la protéine alsine et emplacements des mutations présentes chez les patients. V491fsX3 : PA2, p.Ala878Pro : PA3 et M1207X : PA1. (adapté de (Hadano et al., 2007)). La zone amplifiée pour la RT-PCR quantitative est indiqué sur le schéma.

Les fibroblastes des patients et des sujets contrôles ont été reprogrammés par transfert de gènes soit avec quatre vecteurs rétroviraux codant pour les facteurs OCT4, SOX2, KLF4 et c-MYC (OSKM) (PA1, PA2, PA3 et C11), soit avec seulement trois vecteurs en omettant le vecteur codant pour c-MYC (OSK) (PA3, C33). Après l'exposition aux vecteurs viraux, les fibroblastes ont été cultivés sur une couche de cellules nourricières composée de fibroblastes murins embryonnaires irradiés (iMEFs) en présence de bFGF. Les premiers clones iPS sont apparus dès trois semaines. La cinétique d'apparition des clones a été la même pour les fibroblastes contrôles et de patients, indiquant que la mutation n'a pas eu d'effet sur la génération des cellules iPS, contrairement à ce que nous avons observé avec les cellules de patients MPSIIIB. La coloration alcaline phosphatase a permis de montrer que les fibroblastes contrôles et de patients se reprogrammaient avec des efficacités équivalentes (~ 0.1% de fibroblastes reprogrammés après exposition aux 4 vecteurs; ~ 0.01% de fibroblastes reprogrammés après exposition aux 3 vecteurs).

Une vingtaine de clones a été isolée pour chaque culture de fibroblastes reprogrammés qui ont été amplifiés. Deux clones dérivés de chaque culture de fibroblastes ont été caractérisés au niveau moléculaire et fonctionnel pour la suite des analyses. Il s'agit des clones C11-1 et C11-2 dérivés des fibroblastes de C11, C33-1 et C33-2 dérivés de C33, PA1-1 et PA1-2 dérivés de PA1, PA2-1 et PA2-2 dérivés de PA2 et PA3-1 et PA3-2 dérivé de PA3. Les caryotypes de ces clones ont été analysés et aucune anomalie n'a été détectée jusqu'à 20 passages en culture (non montré). Les mutations dans le gène ALS2 ont été analysées par séquençage et ont été retrouvées dans les clones d'iPS des différents patients.

### 3.2.2. Caractérisation des clones d'iPS de patients.

Nous avons montré que tous les clones d'iPS exprimaient des marqueurs de pluripotence tels que les marqueurs de surface TRA1-60, TRA1-81, SSEA4 et les facteurs de transcription OCT4 et NANOG (Figure 24A). Des RT-qPCR ont indiqué que la transcription des ARNs codés par les vecteurs rétroviraux était fortement réprimée dans les clones d'iPS par rapport aux fibroblastes parentaux génétiquement modifiés (Figure 24B). La réactivation de l'expression de gènes endogènes associés à la pluripotence a été montrée par RT-PCR (Figure 24C).

La pluripotence des clones iPS a ensuite été analysée *in vitro* et *in vivo*. La capacité des clones d'iPS à se différencier vers les trois feuillets embryonnaires a été analysée *in vitro* en générant des corps embryonnaires (Embryoid Bodies ou EBs). Pour cela tous les clones d'iPS ont été cultivés en suspension et en absence de bFGF pendant 10 jours. Les EBs ont alors été mis à adhérer sur des lamelles couvertes de polyornithine et de laminine pendant 2 semaines. La différenciation des cellules a été analysée par des immuno-marquages qui ont montré la présence de cellules exprimant l'alpha-fétoprotéine (mésoderme), la Protéine Associée aux Microtubules (MAP2) (ectoderme) et l'Actine Musculaire Squelettique (SMA) (endoderme). Les clones d'iPS des patients ont montré les mêmes capacités à se différencier vers les trois feuillets embryonnaires que les clones contrôles (Figure 25A). La capacité de différenciation des cellules iPS a également été analysée *in vivo* après injection des clones d'iPS dans les muscles de souris immunodéficientes. Six semaines après injection, les animaux présentaient des tumeurs. Des analyses histologiques ont montré que ces tumeurs contenaient des tératomes contenant des tissus des trois feuillets embryonnaires (Figure 25B).

L'ensemble de ces résultats a montré que les différents clones d'iPS générés à partir des fibroblastes des patients et des contrôles ont été reprogrammés en cellules pluripotentes humaines.

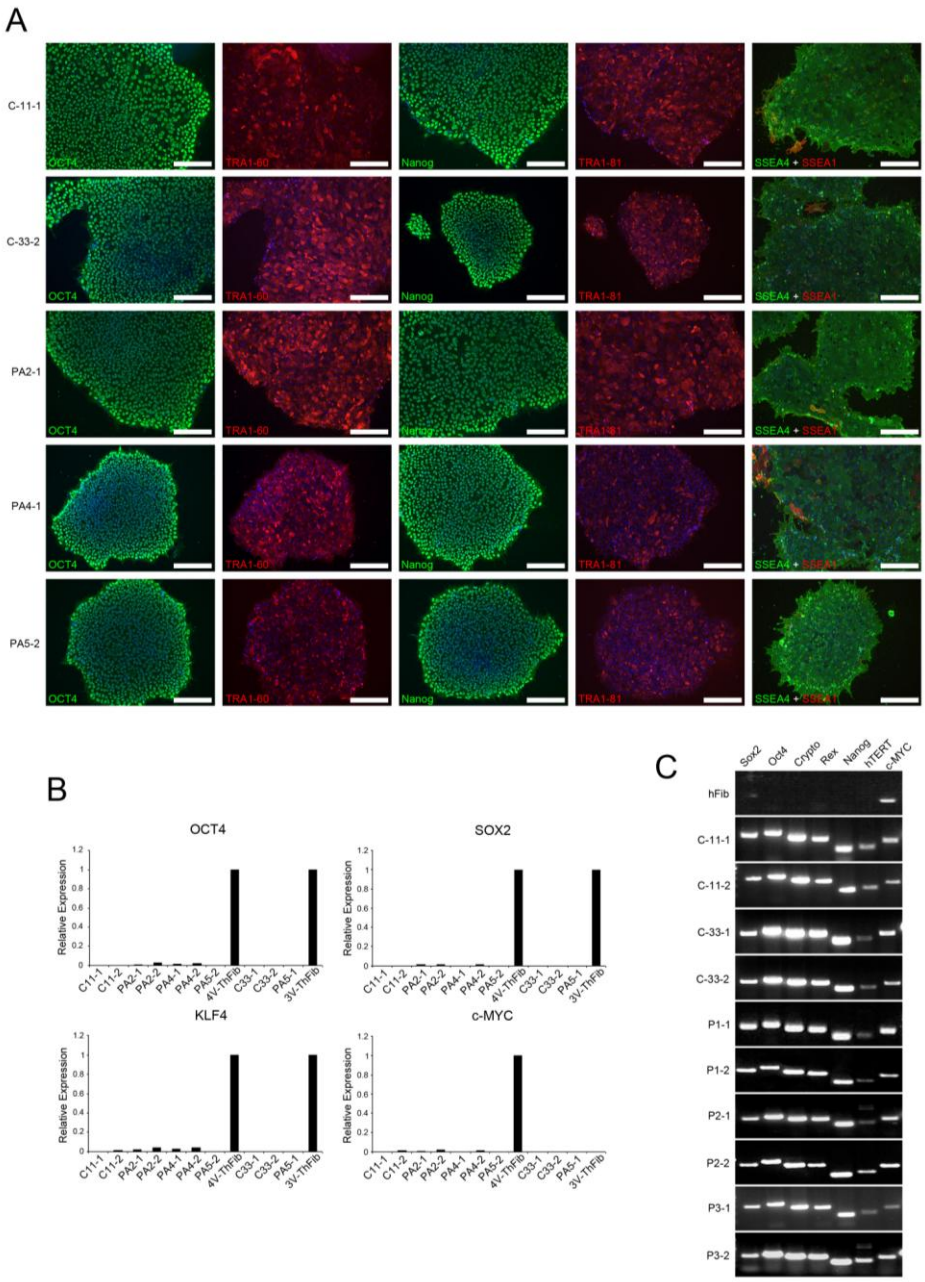



**Figure 24.** Les clones d'iPS générés à partir des fibroblastes contrôles ou de patients sont pluripotents.

**A**. Immunomarquages montrant des exemples représentatifs de clones iPS contrôles (C-11-1 ; C-33-2) et mutants (PA1-1, PA2-1 et PA3-2) exprimant OCT4, TRA-1-60, NANOG, TRA-1-81, SEEA-4 et n'exprimant pas SSEA-1. Barre d'échelle : 200µm.

**B.** Analyse par RT-qPCR de l'expression des vecteurs rétroviraux codants pour OCT4, SOX2, KLF-4 et c-MYC dans les différents clones iPS. Les résultats montrent une extinction de l'expression des gènes apportés par ces vecteurs dans les cellules reprogrammées en comparaison des fibroblastes parentaux juste après transduction. L'expression dans les fibroblastes a été normalisée à 1. L'expression dans les clones a été calculée par rapport au niveau d'expression des vecteurs dans leurs fibroblastes parentaux respectifs. Une seule lignée de fibroblastes est représentée pour chaque transduction (avec 4 ou avec 3 vecteurs). Tous les clones représentés ont été générés aves les 4 vecteurs sauf les clones C-33-1, C-33-2 et PA3-1.

**C**. Analyse par RT-PCR de l'expression de gènes codant pour des marqueurs de pluripotence. Les résultats montrent que tous les clones iPS expriment des gènes associés à la pluripotence. Ces gènes ne sont pas trancrits dans les fibroblastes parentaux (non montré).

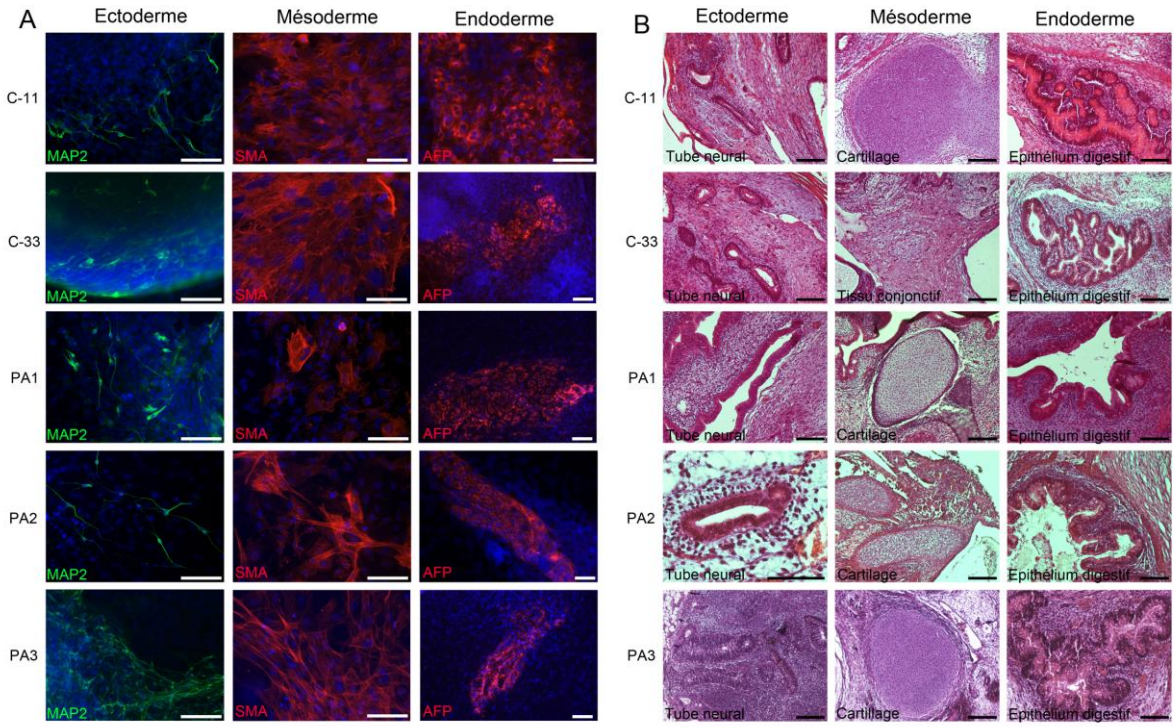



**Figure 25.** Les cellules iPS se différencient dans les trois feuillets embryonnaires *in vitro* et *in vivo.*
**A.** Analyse *in vitro*. Des corps embryonnaires ont été générés et cultivés 10 jours en suspension puis transférés sur des lamelles couvertes de polyornithine et de laminine durant 15 jours. Les immunomarquages révèlent la présence de cellules exprimant MAP2 (en vert, à gauche), SMA (en rouge, au milieu) et AFP (en vert, à droite). Un clone iPS représentatif de chaque contrôle ou patient est montré. Les barres d'échelle représentent 100µm.
**B.** Analyse *in vivo*. Des suspensions cellulaires des clones iPS de contrôles et de patients ont été préparés et injectés dans des muscles squelettiques de souris Rag$\gamma C^{-/-}$. Après six semaines, les tumeurs ont été prélevées et des analyses histologiques ont été réalisées montrant des structures contenant de l'ectoderme (tube neural), du mésoderme (cartilage et tissus conjonctif) et de l'endoderme (épithélium digestif). Un clone iPS représentatif de chaque contrôle ou patient est montré. Les barres d'échelle représentent 200µm.

## 3.2.3. Différenciation neuronale des clones d'iPS.

### 3.2.3.1. Génération et caractérisation de précurseurs neuraux

Le protocole utilisé dans la première étude sur les iPS de patients MPSIIIB avait permis de générer des précurseurs neuraux (PN) rapidement en cultivant les iPS en suspension dans un milieu neural en présence de bFGF et d'EGF. Mais les neurosphères contenant les PNs ne pouvaient pas être conservées en tant que telles et il était nécessaire de générer de nouvelles sphères à chaque expérience et de les étudier à des passages équivalents en culture. En effet nous avons observé que les cellules contenues dans les sphères étaient hétérogènes en fonction des passages et étaient à des stades de maturation différents, rendant difficiles les comparaisons.

Pour pallier à ces problèmes et avoir des cultures de PNs comparables indépendamment du nombre de passages en culture, nous avons généré des cultures stables de PNs à partir des iPS humaines en adaptant différents protocoles publiés (Kim et al., 2010a; Brennand et al., 2011) (Voir protocole page 192).

Les cellules iPS ont été cultivées sous formes de sphères en suspension en présence d'inhibiteur de la voie de signalisation BMP (bone morphogenic protein) et d'inhibiteur de la voie du TGFβ ainsi que de bFGF. Il a été montré que cette méthode permet de réduire la variabilité de génération de précurseurs neuraux d'un clone d'iPS à l'autre (Hu et al., 2010). Après 15 jours de culture, les sphères ont été mises à adhérer et ont été cultivées dans un milieu spécifique de différenciation neurale jusqu'à l'apparition de rosettes caractéristiques de l'identité neuroépithéliale des cellules (Figure 26A). En effet ces rosettes expriment de façon uniforme le facteur de transcription Pax6 spécifique du neuro-ectoderme ainsi que le marqueur de cellules souches neurales nestine (Figure 26A).

Afin d'obtenir des cultures pures de PNs, les rosettes ont été récupérées manuellement, puis dissociées et cultivées à forte densité, ce qui permet de maintenir les cultures de PNs à un stade indifférencié (Koch et al., 2009) (Figure 26A).

Nous avons généré des cultures de PNs à partir des clones d'iPS contrôles C11 et C33, et de patients P1, P2 et P3. Dans toutes les cultures, plus de 80% des cellules exprimaient les marqueurs Pax6, Sox1 et nestine (Figure 26A) et aucune cellule n'exprimaient les marqueurs de cellules souches OCT4 et NANOG (non montré), indiquant que les iPS contrôles et de patients présentaient les mêmes potentiels de différenciation en PNs et qu'aucune cellule indifférenciée n'était présente dans les cultures. Nous avons également analysé l'expression des facteurs de reprogrammation (OSKM) dans les précurseurs neuraux dérivés de chaque clone

iPS par RT-qPCR. En effet il a été montré que l'expression des gènes introduits à l'aide des vecteurs viraux utilisés pour la génération des iPS pouvait être ré-activée lors de leur différenciation et ainsi altérer leur capacité à se différencier vers un type cellulaire ou un autre (Okita et al., 2007). Les résultats ont montré que, comme dans les iPS, l'expression des vecteurs rétroviraux était réprimée dans les PNs (Figure 26B), indiquant que les PNs générés à partir des différents clones d'iPS n'exprimaient plus de transgène et donc présentaient les mêmes capacités de différenciation.

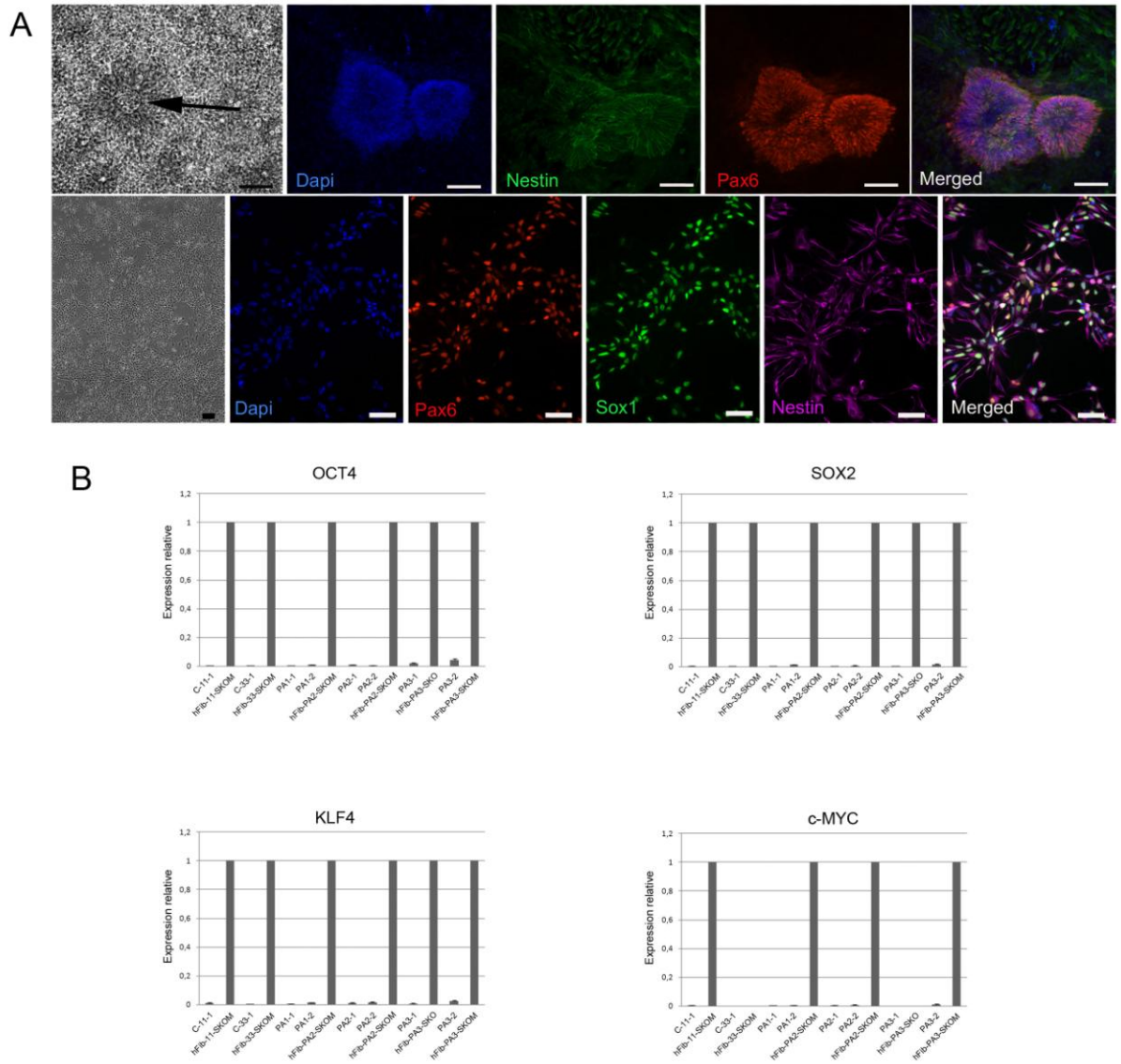



**Figure 26.** Différenciation des cellules iPS en précurseurs neuraux.
**A**. Panneau du haut : Image de rosettes en contraste de phase (en haut à gauche). Immunomarquage de ces rosettes montrant l'expression uniforme des marqueurs nestine et Pax6.
Panneau du bas : PN cultivés à forte densité en contraste de phase (à gauche). Immunomarquage montrant l'expression de Pax6, Sox1 et nestine dans ces PNs. Les barres d'échelle représentent 50µm.
**B**. Des analyses en RT-qPCR ont été réalisées sur les PNs cultivés à forte densité et montrent que les vecteurs viraux qui codent pour OCT4, SOX2, KLF-4 et c-MYC sont toujours inactivés dans les PN en comparaison des fibroblastes parentaux après transduction. L'expression dans les fibroblastes est normalisée à 1, l'expression des PN est normalisée par rapport au niveau d'expression des vecteurs de leurs fibroblastes parentaux respectifs.

### 3.2.3.2. Génération de neurones et caractérisation

Afin de différencier les PNs en neurones, les PNs ont été dissociés et cultivés à faible densité. Dans ces conditions, plus de 80% des cellules peuvent être isolées et elles expriment les marqueurs Pax6 et nestine un jour après leur adhésion (non montré). A J5 nous avons observé que des cellules présentaient déjà une morphologie neuronale (Figure 27A). Des immunomarquages ont montré que 40-60% des cellules étaient nestine-positives et 40-60% exprimaient le marqueur neuronal β3-tubuline (Figure 27B). Les analyses d'arborescence de ces neurones ont été réalisées sur ces cultures à J5 (voir 2.4). En effet à ce stade les neurones sont individualisés et ont établi un réseau neuritique, alors que les PNs nestine-positifs restent en paquets isolés, qui ensuite peuvent proliférer à des temps plus tardifs.

Nous avons également analysé le devenir des neurones en culture. Alors qu'aucun neurone n'exprimait de marqueur de neurone GABAergique ou glutamatergique entre J1 et J5, nous avons observé qu'une faible proportion des neurones étaient GABAergiques à partir de J12 (<5%) et que cette population représentait 40-50% des neurones après 24 jours de culture (Figure 27C). Aucun neurone glutamatergique n'a été trouvé dans ces cultures et nous n'avons pas recherché d'autres marqueurs de différenciation vers d'autres sous-types neuronaux. Aucun astrocyte exprimant le marqueur GFAP et aucun oligodendrocyte exprimant le marqueur CNPase n'a été détecté dans ces cultures. De façon importante nous avons également montré que les PNs pouvaient être cultivés pendant de nombreux passages sans perte de leur capacité à se différencier en neurones avec la même reproductibilité.

Toutes les cultures de PNs dérivés de iPS contrôles et de patients ont été comparées et les mêmes observations ont été réalisées, indiquant que, en dépit du fait que les cultures de neurones ne soient pas pures, les cultures étaient équivalentes en termes de population cellulaire, chronologie de maturation et différenciation GABAergique. Nous avons donc considéré qu'il était possible de comparer des phénotypes dans les neurones des contrôles et des patients dans ces conditions et à des temps précoces.

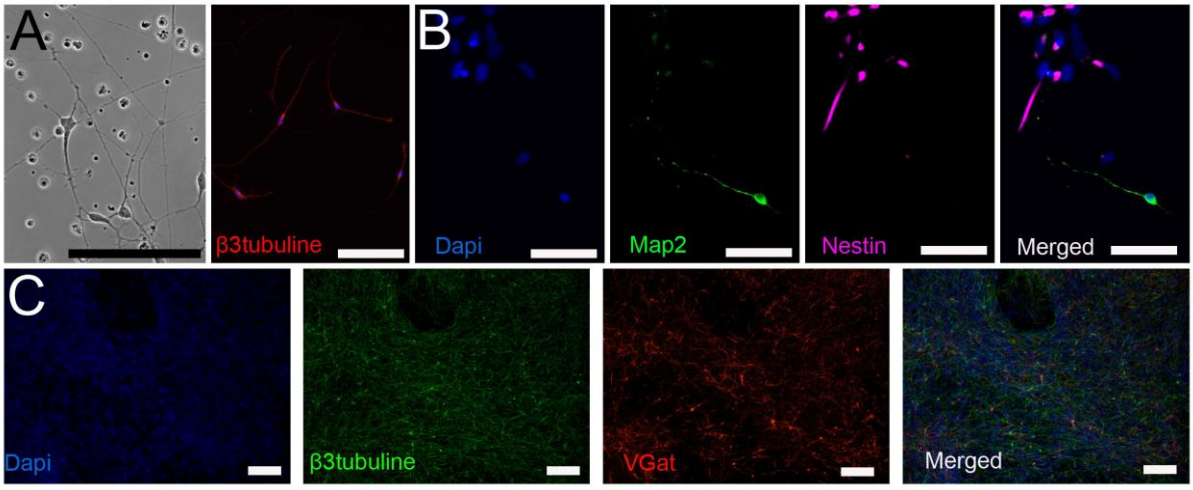



**Figure 27.** Génération et caractérisation des neurones dérivés des iPS de contrôles et de patients.
**A**. Culture de neurones en contraste de phase (à gauche). Immunomarquage montrant l'expression de la β3-tubuline 5 jours après adhésion à faible densité. Les barres d'échelle représentent 100µm.
**B.** Immunumarquage à 5 jours des cultures de neurones qui montrent la présence de neurones exprimant MAP2 et de précurseurs exprimant nestine. Les barres d'échelle représentent 50µm.
**C**. Immunomarquage de neurones à J24 qui montrent qu'une partie des neurones β-3tubuline expriment VGat.
Les marquages immunoflurescents montrés en A, B et C sont représentatifs des différenciations obtenues à partir de chaque clones.
Les barres d'échelle représentent 100µm.

### 3.2.3.3. Purification des cultures de neurones

Dans la SLA, l'implication de cellules non neurales a été démontrée et notamment le rôle des cellules astrocytaires (Boillée et al., 2006a). Dans le cas de l'ALS2/Alsine, il a pu être montré que les astrocytes peuvent protéger les motoneurones d'une mort précoce et de défauts de croissance axonale, alors qu'ils n'ont pas d'impact sur les neurones corticaux (Jacquier et al., 2009). Même si les cultures de neurones que nous avons développées ne contenaient pas d'astrocytes, elles contenaient des PNs qui continuaient de proliférer. Afin de pouvoir observer des phénotypes intrinsèques aux neurones, nous avons développé une méthode permettant de les trier. Pour cela nous avons utilisé un vecteur lentiviral permettant l'expression de la RFP (red fluorescent protein) sous contrôle du promoteur de la synapsine 1 humaine (SYN::RFP) (Nathanson et al., 2009). Cette protéine est spécifiquement exprimée dans les neurones et est associée aux vésicules synaptiques. Elle serait impliquée dans la régulation de la libération des neurotransmetteurs ainsi que dans la différenciation des neurones et dans la croissance des neurites (Wang et al., 2009).

Les cultures de PNs ont été transduites avec le vecteur lentiviral SYN::RFP. Les cellules ont ensuite été gardées 3 semaines sans passage pour induire une différenciation neuronale. Après ce délai, les cellules ont été dissociées et triées par cytométrie de flux en collaboration avec le Dr Haase (Marseille). Les cellules RFP positives ont ensuite été remises en cultures et les proportions de cellules exprimant RFP, Pax6 et le marqueur neuronal Tau ont été évaluées (Figure 28 et 29). Les cultures de PNs dérivés des clones contrôles C-11-1 et C-33-1 et des patients PA1-1, PA2-1 et PA3-1 ont été comparées et ont donné des résultats comparables. Ainsi le tri a permis d'obtenir des cultures pures de neurones avec une expression de la RFP et de Tau dans 90 à 100% des cellules triées (Figure 28 et 29).

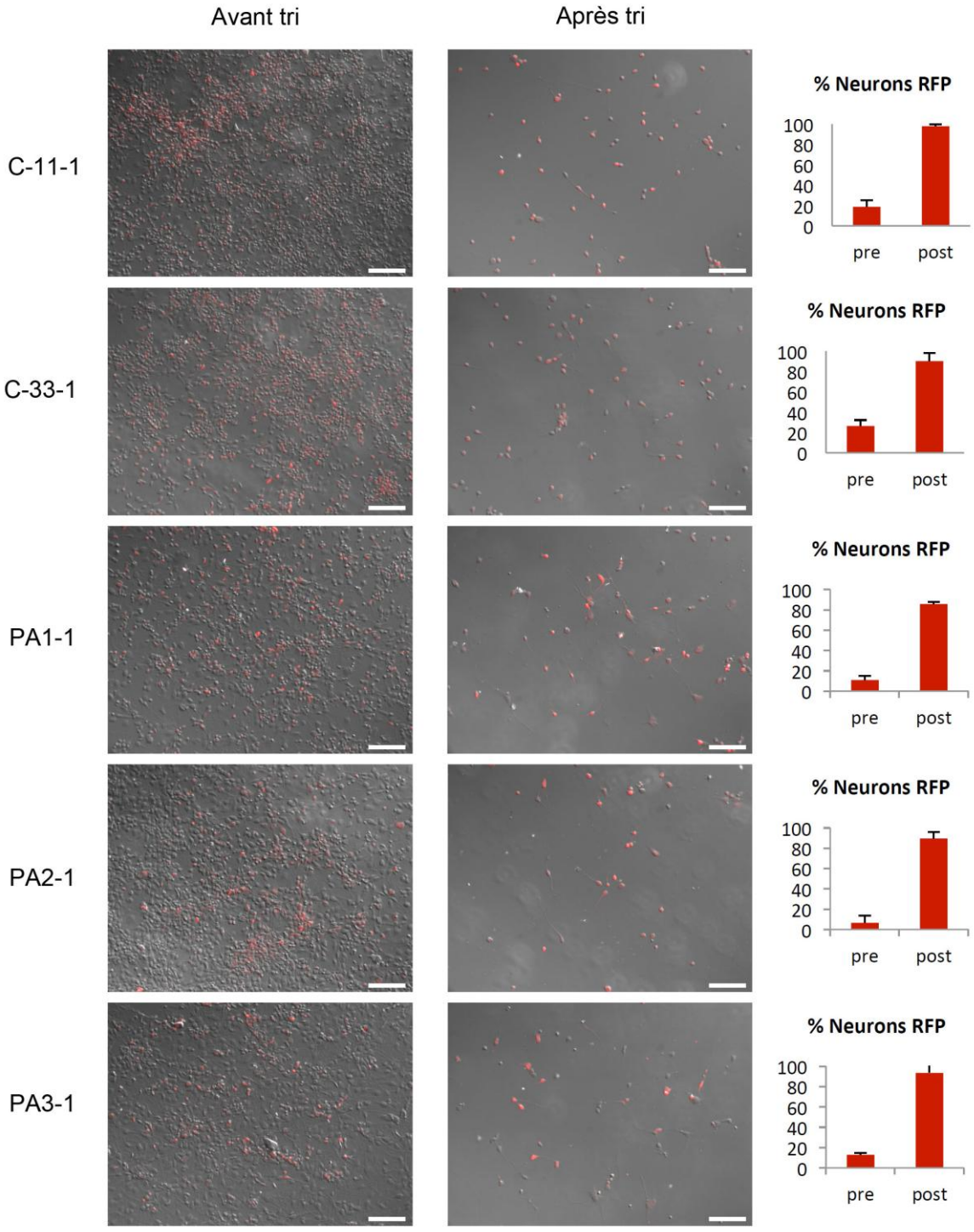



**Figure 28.** Purification par tri cellulaire (FACS) des neurones humains différenciés à partir des PNs contrôles ou de patients transduits avec le vecteur exprimant RFP sous contrôle du promoteur neuronal Synapsine.
A gauche : images en contraste de phase et en fluorescence des PNs à forte densité après trois semaines de culture, avant tri et après tri. Les barres d'échelle représentent 100µm.
A droite : histogrammes montrant les pourcentages de cellules RFP avant tri (2 à 20%) et après tri (90 à 99 %).
Ces résultats ont été obtenus en collaboration avec D. Buttigieg (laboratoire du Dr Haase).

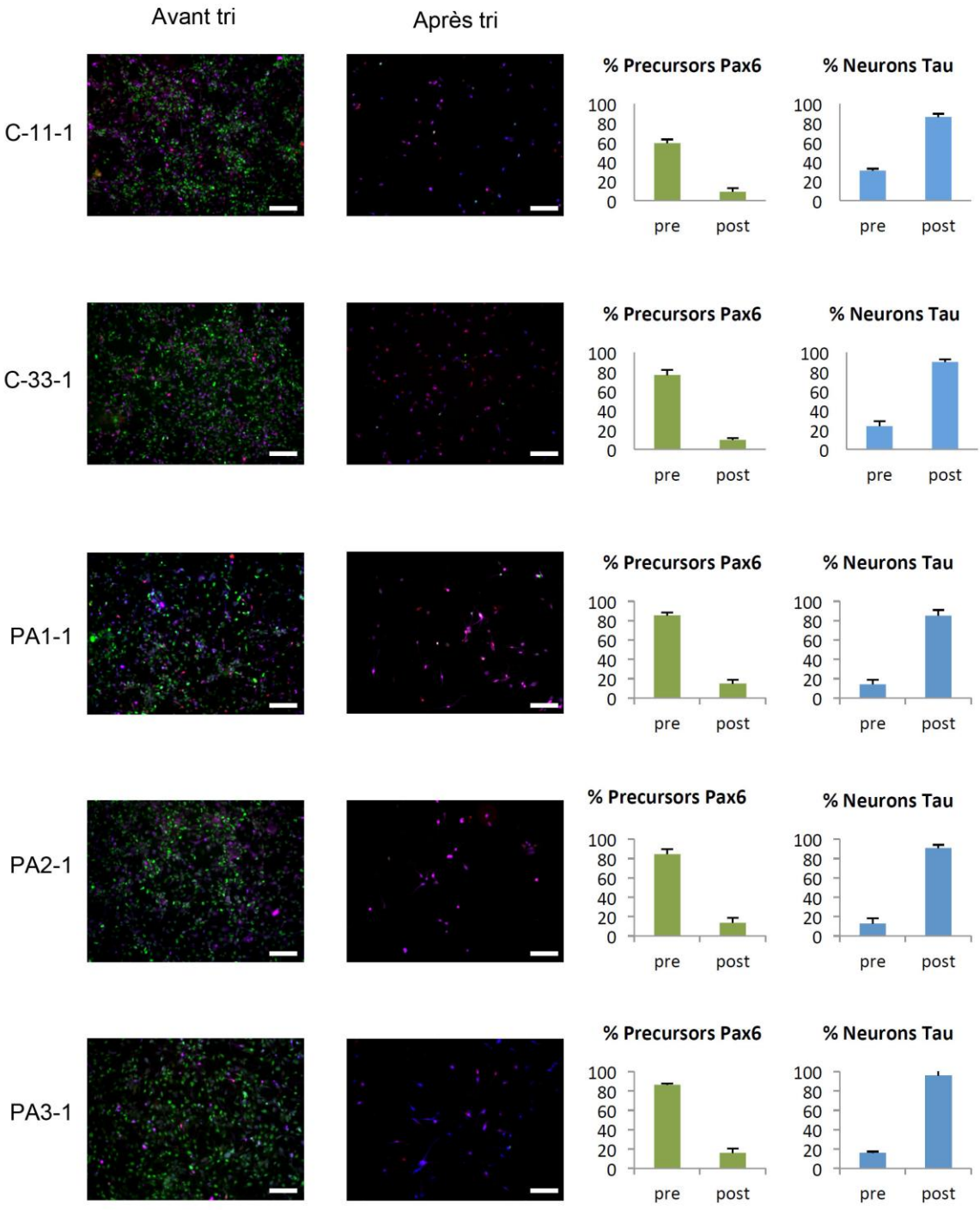



**Figure 29.** Quantification des cellules exprimant Pax6 et tau avant et après tri cellulaire.
A gauche : Exemples d'immunomarquages Pax6 (en vert) et tau (en bleu) sur les cultures de PNs différenciés avant et après tri.
A droite : histogrammes montrant les pourcentages de cellules exprimant Pax6 ou Tau avant et après tri. Alors que les pourcentages de cellules Pax6 diminuent après tri (avant tri : 60-80% ; après tri : 10-30%), les pourcentages de neurones augmentent (avant tri : 10-40% ; après tri : 80-90%).
Les barres d'échelle représentent 100µm.
Ces résultats ont été obtenus en collaboration avec D. Buttigieg (laboratoire du Dr Haase).

### 3.2.4. Expression de l'Alsine dans les précurseurs neuraux

L'alsine est une protéine ubiquitaire mais il a été montré que son expression varie selon les tissus et les types cellulaires. Elle est fortement exprimée dans le SNC et en particulier dans le cervelet (Hadano et al., 2001; Yang et al., 2001; Yamanaka et al., 2003). Au niveau cellulaire, l'alsine est exprimée dans les neurones comme les motoneurones ou les neurones corticaux mais pas dans les astrocytes (Jacquier et al., 2009). L'expression de l'alsine dans des précurseurs neuraux murins ou humains n'a pas été décrite.

Nous avons tout d'abord réalisé des analyses en RT-qPCR afin d'analyser la transcription du gène Alsine chez les différents patients (Figure 30). Les amorces utilisées sont situées dans le premier exon et doivent détecter les formes courtes (qui comportent la moitié du domaine RLD) et longues de l'alsine (Figure 7). Les résultats ont montré la présence des transcrits de l'alsine dans les cellules iPS et dans les PNs des contrôles et des patients. Dans les cellules iPS, l'expression de l'alsine était fortement réduite, de 10 à 130 fois dans les cellules de patients par rapport aux contrôles (Figure 30A). Par contre, dans les PN, l'expression de l'alsine ne différait pas de manière significative.

Afin de comprendre ces différences au niveau de la transcription, nous avons réalisé des immuno-marquages pour révéler la protéine Alsin dans des iPS, des PNs et des neurones humains en culture avec des anticorps commerciaux. Mais ces marquages n'ont pas donné de résultats interprétables. La protéine n'a pas été détectée. Il est possible que cet échec soit lié aux anticorps utilisés car la plupart des articles publiés utilisent des anticorps non commerciaux. Malheureusement nous n'avons pas réussi à obtenir d'anticorps des laboratoires les produisant. D'autre part il a été rapporté que la protéine Alsine endogène était présente en quantité très faible dans les tissus murins (0.0003% de fractions détergent-soluble de lysats de cerveaux de souris (Yamanaka et al., 2003) et qu'elle était essentiellement détectable en western blot et non en immunofluorescence. D'autres expériences sont à présent nécessaires afin d'analyser l'expression, la localisation et la stabilité des protéines Alsine sauvage et mutante dans les différents types cellulaires d'intérêt.

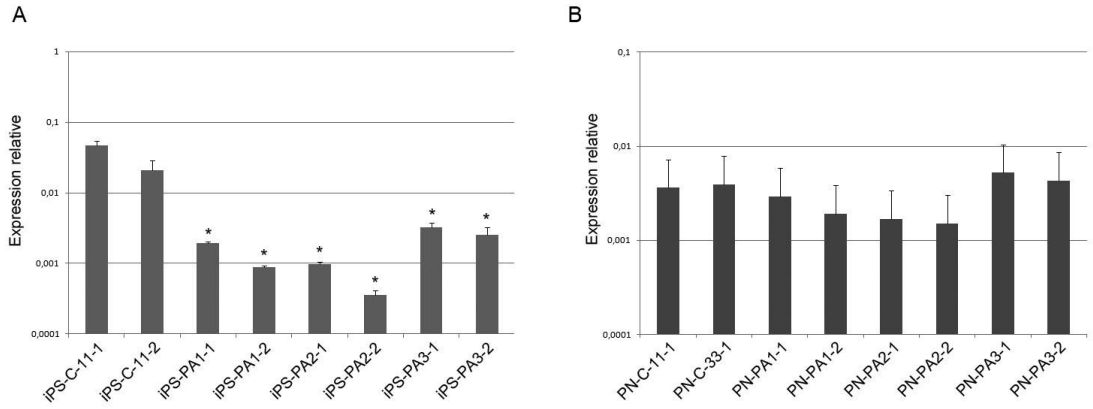



**Figure 30.** Analyse en RT-qPCR de l'expression du gène Alsine dans les iPS et précurseurs neuraux.
**A.** Expression de l'alsine dans les clones d'iPS de contrôles et de patients. L'expression de l'alsine est rapportée à l'expression de GAPDH. Les rapports d'expression de l'alsine dans les patient par rapport aux contrôles sont : Par rapport au C-11-1 : PA1-1 : 23 ; PA1-2 : 52 ; PA2-1 : 47 ; PA2-2 :130 ; PA3-1 : 14 ; PA3-2 :18. Par rapport au C-11-2, PA1-1 : 10 ; PA1-2 : 23 ; PA2-1 : 21 ; PA2-2 :57 ; PA3-1 : 6 ; PA3-2 :8. Différences statistiquement significatives en T-test entre les patients et les deux contrôles, * : $P<0,01$.
**B.** Expression de l'alsine dans les PN issus des clones d'iPS de contrôles et de patients. L'expression de l'alsine est rapportée à l'expression de GAPDH.

### 3.2.5. Les endosomes sont-ils altérés en absence de l'Alsine ?

Afin de valider les modèles iPS générés à partir des fibroblastes des patients ALS2, nous avons cherché à reproduire un phénotype précédemment décrit dans la littérature. Contrairement au modèle iPS généré à partir des cellules de patients MPSIIIB pour lequel il existait des phénotypes décrits dans un modèle murin reproduisant la pathologie humaine et dans des biopsies post-mortem, les phénotypes décrits pour la SLA2/Alsine ne le sont que dans des modèles cellulaires de surexpression ou inhibition de l'expression de l'alsine.

N'ayant pas observé de mort neuronale évidente des neurones dans des cultures maintenues environ 4 semaines, nous avons décidé d'analyser un phénotype décrit dans la littérature : l'altération de la dynamique des endosomes. En effet, il a été montré que l'alsine est un facteur d'échange de nucléotides guanyliques pour la petite GTPase Rab5 (Otomo et al., 2003; Kunita et al., 2004; Topp et al., 2004). Or la protéine Rab5 est un important régulateur de l'endocytose, de la fusion des endosomes et du trafic endosomal (Stenmark, 2009). Il a été montré que l'alsine était impliquée dans la régulation de la fusion et du trafic des endosomes via l'activation de Rab5 (Otomo et al., 2003; Topp et al., 2004), et que l'extinction de l'expression de l'alsine dans des motoneurones par des ARN interférant (ARNsi) entraînait une diminution de la surface des endosomes (Jacquier et al., 2006), alors que sa surexpression dans des lignées cellulaires entraînait un élargissement des endosomes (Topp et al., 2004).

Nous avons comparé des cultures de neurones humains dérivés des PNs de contrôles et de patients 5 jours après leur adhésion à faible densité. Les neurones ont été immunomarqués avec l'anticorps anti-EEA1 et des photos de neurones individualisés ont été prises pour des analyses avec le logiciel ImageJ. Nous avons analysé la surface des endosomes exprimant EEA1 dans le corps cellulaire des neurones. Des exemples de neurones sont présentés Figure 31 (A et C). Deux expériences indépendantes ont été réalisées pour comparer les neurones dérivés des patients PA2 et PA3. Les résultats ont montré que les neurones de patients PA2-1 et PA2-2 présentaient une réduction significative de la surface moyenne des endosomes EEA1 par rapport aux contrôles C-33-2 (Figure 31B). De même, les neurones de patients PA3-1 et PA3-2 ont présenté une réduction significative de la surface endosomale en comparaison des contrôles C-11-1 et C-33-1 (Figure 31D).

En reproduisant dans les neurones de patients un phénotype précédemment observés dans des modèles cellulaires murins, ces résultats nous ont permis de valider les modèles iPS de patients atteints de SLA2/Alsine.

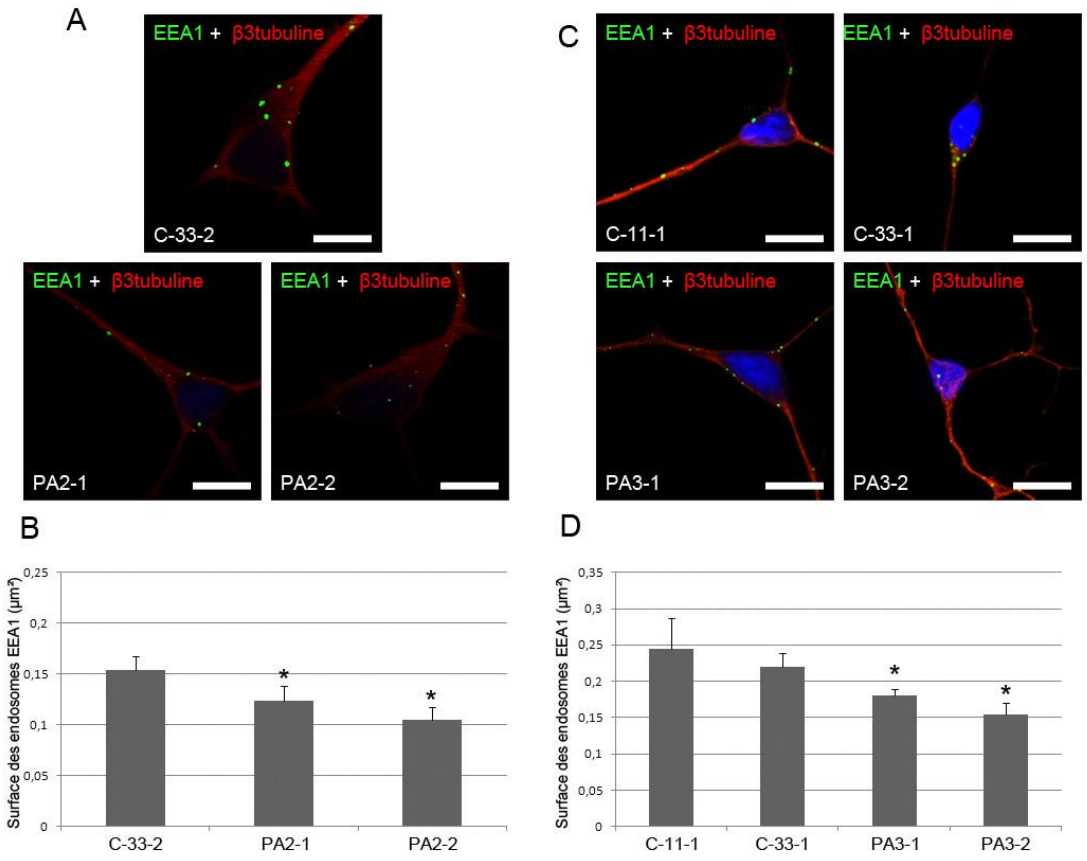



**Figure 31.** Quantification de la surface des endosomes dans les neurones dérivés des iPS de patients.
Deux expériences indépendantes sont présentées (A, B) et (C, D).
**A.** Immunomarquage des endosomes avec un anticorps spécifique de EEA1 sur des neurones (adhérés 5 jours) marqués avec un anticorps anti-β3-tubuline. L'expérience a été réalisée sur des neurones issus des clones C-33-2 (n=28), PA2-1 (n=27) et PA2-2 (23).
**B.** Quantification de la surface de marquage EEA1 après binarisation du signal. Différences statistiquement significatives en T-test entre les patients (PA2-1 et PA2-2) et le contrôle (C-33-2), * : P<0,05.
**C.** Immunomarquage des endosomes avec un anticorps spécifique de EEA1 sur des neurones (adhérés 5 jours) marqués avec un anticorps anti-β3-tubuline. L'expérience a été réalisée sur des neurones issus des clones C-11-1 (n=12), C-33-1 (n=16), PA3-1 (n=15) et PA3-2 (15).
**D.** Quantification de la surface de marquage EEA1 après binarisation du signal. Différences statistiquement significatives en T-test entre les patients (PA3-1 et PA3-2) et les deux contrôles (C-33-2), * : P<0,05.
Les barres d'échelle représentent 10µm.

### 3.2.6. La capacité de branchement des neurones de patients est-elle altérée ?

Un second phénotype décrit dans la littérature est la modification de pousse neuritique liée aux mutations dans le gène ALS2/Alsine. Il a été montré que l'alsine interagit avec Rac1 qui est une protéine impliquée dans la croissance neuritique (Nikolic, 2002). Dans des cultures de neurones d'hippocampe la surexpression de l'alsine a entrainé un allongement des neurites (Tudor et al., 2005), alors que l'extinction de son expression dans des motoneurones par des ARNsi entrainait une diminution de la longueur de l'axone (Jacquier et al., 2006). Des neurones issus de souris inactivés pour le gène de l'alsine ont également présenté des axones plus courts (Otomo et al., 2008).

Nous avons comparé des cultures de neurones humains dérivés des PNs de contrôles et de patients 5 jours après leur adhésion à faible densité. Les neurones ont été immunomarqués avec l'anticorps anti-β3-tubuline et des photos de neurones individualisés ont été prises pour des analyses avec le logiciel NeuronJ. Nous avons focalisé notre analyse sur le branchement des neurites proche des corps cellulaires des neurones. Pour cela nous avons utilisé le plugin Sholl (SHOLL, 1953) qui permet de quantifier le nombre de branchements neuritiques (Figure 32). Des exemples des morphologies des neurones issus de chacun des clones analysés sont montrés en Figure 32. Alors que la majorité des neurones de contrôles C11-1 et C33-1 étaient bipolaires, les neurones des patients P1-1, P2-1, P3-1 et P3-2 ont montré des arborescences beaucoup plus développées. Les analyses statistiques ont montré que les neurones mutants dérivés de chacun des trois patients avaient des altérations significatives du nombre de branchements neuritiques proches des corps cellulaires ($P<0,0001$ pour tous les clones) (Figure 32).

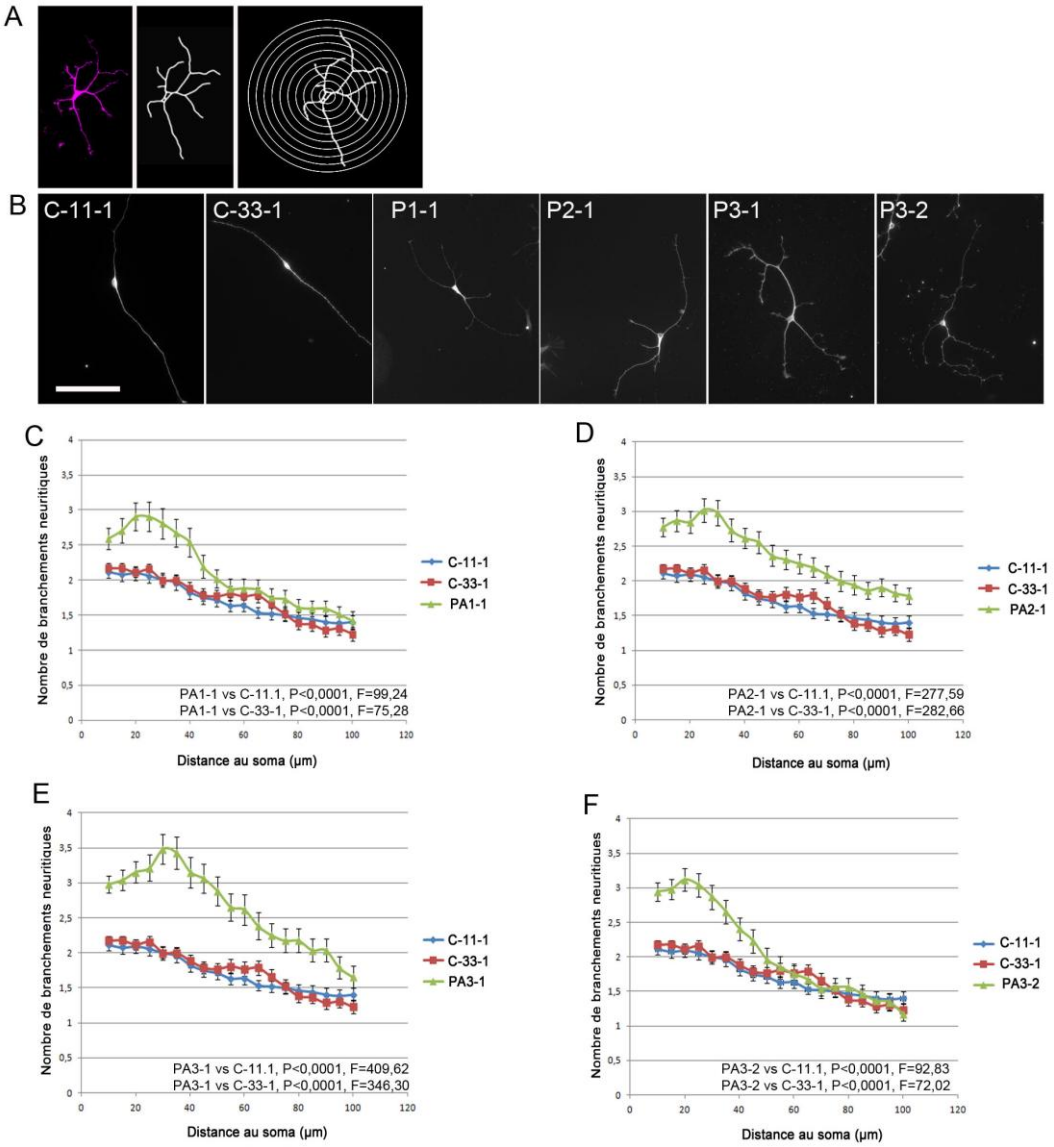



**Figure 32.** Augmentation du nombre de neurites à proximité des corps cellulaires des neurones dérivés des iPS de patients.
**A**. Exemple d'un neurone dont les prolongements neuritiques ont été redessinés à l'aide du plugin NeuronJ du logiciel ImageJ. Le nombre de prolongements est ensuite analysé avec le plugin sholl analysis d'imageJ (Milosević and Ristanović, 2007). Ce logiciel va quantifier le nombre de neurites en comptant les intersections entre les neurites et des cercles concentriques, centrés sur le corps cellulaire du neurone et dont le diamètre augmente graduellement (image de droite).
**B**. Marquages fluorescents de la β3-tubuline dans des neurones représentatifs issus des différents clones de cellules iPS. Les barres d'échelle représentent 100µm.
**C-F.** Graphes montrant les nombres de branchements neuritiques entre le corps cellulaire et jusqu'à 100µm de celui-ci. Les différents graphes montrent un accroissement du nombre de neurites à proximité du corps cellulaire des neurones des patients alsine PA1-1 (C), PA2-1(D), PA3-1 (E) et PA3-2 (F). Les quatre clones présentés montrent des différences significatives par rapport aux deux clones contrôles ($p < 0.0001$, Test Anova, Bonferony).

## *3.3. Conclusion*

Lors de ce travail, nous avons montré que des fibroblastes de patients atteints de maladies du motoneurone causées par des mutations dans le gène ALS2 pouvaient être reprogrammés en cellules iPS avec la même efficacité que des fibroblastes contrôles. Nous avons également montré que tous les clones d'iPS obtenus étaient capables de se différencier vers les trois feuillets embryonnaires *in vitro* comme *in vivo.*

Afin d'étudier la physiopathologie de la maladie, nous avons ensuite développé un protocole de différenciation en neurones permettant de générer des cultures stables de PNs à partir des cellules iPS. Ces PNs générés à partir de rosettes ont pu être amplifiés, conservés et différenciés en neurones. D'autre part, dans le but de pouvoir étudier des neurones purs, nous avons développé une méthode de tri en collaboration avec le laboratoire du Dr G. Haase. Cette technique a permis d'éliminer les PNs persistant dans les cultures de cellules différenciées en neurones. L'élimination de ces cellules de la culture peut permettre d'éviter leur possible influence sur les neurones étudiés car elles peuvent potentiellement altérer les phénotypes observés (Hedlund and Isacson, 2008; Jacquier et al., 2009). Il est désormais possible de trier les neurones dans les cultures générées et de les remettre en culture plusieurs jours pour pouvoir comparer les phénotypes des neurones mutants par rapport aux neurones contrôles.

Parallèlement au développement de cette technique de purification, nous avons validé nos modèles de cellules iPS de patients. Pour cela nous avons analysé des phénotypes précédemment décrits dans cette maladie. Nous avons tout d'abord montré que les neurones de patients avaient une réduction de la surface de leurs endosomes exprimant EEA1. Ces résultats sont en accord avec une perte de fonction de l'alsine en accord avec les travaux de Jacquier et col. qui ont montré un phénotype identique dans des motoneurones murins traités avec de RNAsi (Jacquier et al., 2006). Une hypothèse est que ce phénotype soit lié à une perte de l'activité GEF de l'alsine pour Rab5.

Le second phénotype que nous avons montré a été un accroissement du nombre de neurites à proximité des corps cellulaires des neurones de patients. Ce phénotype est lié aux observations qui ont rapporté des altérations de la neuritogénèse dans des modèles cellulaires murins de sous ou sur-expression de l'alsine (Tudor et al., 2005; Jacquier et al., 2006; Otomo et al., 2008). Les altérations que nous avons observées pourraient être liées aux interactions de l'alsine avec la GTPase Rac1 (Li et al., 2000).

Nos résultats ont ainsi montré que les modèles d'iPS générés à partir de trois patients différents reproduisaient des phénotypes liés à la pathologie. Ces modèles pourront être utilisés pour mieux comprendre le développement de la maladie.

## *3.4. Matériel et méthodes*

- **Génération des clones d'iPS**

Les fibroblastes issus de biopsies cutanées de trois patients atteints d'IAHSP et de deux volontaires sains ont été obtenus de la Banque de Cytogénétique de Clermont-Ferrand (Dr O. Boespflug-Tanguy; Dr E. Eymard-Pierre) en collaboration avec le Dr G. Haase (CNRS, Marseille), et du Centre de Ressources Biologiques de Lyon (Mme Zabot), respectivement. Les autorisations réglementaires pour utiliser ces cellules pour nos travaux de recherche ont été obtenues ou bien sont en cours d'obtention avec l'aide du Pole Intégré de Recherche Clinique de l'Institut Pasteur.

Les fibroblastes ont été cultivés avec du DMEM Glutamax (Invitrogen) complété par 10% de sérum de veau fœtal (SVF) (Sigma). La reprogrammation des fibroblastes en cellules iPS a été faite comme décrite précédemment (Park et al., 2008b; Lemonnier et al., 2011). Brièvement, les fibroblastes ($10^5$ cellules) ont été transduits deux jours de suite avec des particules rétrovirales pseudo-typées avec la protéine G de l'enveloppe du Virus de la Stomatite Vésiculaire (VSV-G) et codant pour les facteurs de transcription OCT4, SOX2, KLF4 et c-MYC (Addgene plasmides 17217, 17218, 17219, 17220). Le transfert de gène a été fait en présence de protamine sulfate (5mg/mL, Sigma). Cinq jours après le transfert de gène, les fibroblastes ont été traités à la trypsine puis déposés sur un tapis de cellules nourricières composées de fibroblastes embryonnaires murins irradiés (iMEF = irradiated mouse embryonic fibroblasts). Le milieu de culture a été changé pour un milieu spécifique adapté aux cellules souches ES humaines (« milieu iPS » = DMEM/F12 (Invitrogen), 20% de KnockOut Serum Replacement (Invitrogen), 10 ng/ml bFGF (Miltenyi Biotech, Paris, France), 100µM acides aminés non essentiels (Invitrogen), 100µM 2-mercaptoethanol (Invitrogen). Des clones présentant la morphologie de clones de cellules ES humaines ont été observés dès 3 semaines après le transfert de gène. Ils ont été sélectionnés manuellement 1 à 2 semaines plus tard. Les clones d'iPS ont ensuite été cultivés sur iMEF puis amplifiés pendant plusieurs passages. Les clones ont été passés tout les 5 à 10 jours soit manuellement, soit avec de la collagénase de type IV (1mg/ML) (Invitrogen). Les clones d'iPS n'ont jamais été gardés en culture plus de 20 passages pour éviter d'analyser des cellules pouvant présenter des anomalies chromosomiques qui peuvent apparaître dans ce genre de cultures.

- **Différenciation en corps embryonnaires**

Pour induire la différenciation en précurseurs neuraux, les iPS sont traitées à la collagénase de type IV. Des fragments de clones sont récupérés puis cultivés en suspension pendant 3 jours dans du milieu iPS sans bFGF. Après 3 jours, les fragments sont cultivés dans un milieu de différenciation neurale composé de DMEM/F12 (Invitrogen) complété de 2% de B27 sans vitamine A (Invitrogen), 5µg/mL d'héparine (Sigma), de 100µM de 2-mercaptoethanol (Invitrogen), de 100ng/mL de bFGF, de 10µM de SB431542 (Sigma) et 5µM Dorsomorphine (Sigma).

- **Différenciation en précurseurs neuraux et en neurones**.

Pour induire la différenciation en précurseurs neuraux, les iPS sont traitées à la collagénases de type IV. Des fragments de clones sont récupérés puis cultivés en suspension pendant 3 jours dans du milieu iPS sans bFGF. Après 3 jours, les fragments sont cultivés dans un milieu de différenciation neurale composé de DMEM/F12 (Invitrogen) complété de 2% de B27 (supplément pour la culture des neurones) sans vitamine A (Invitrogen), 5µg/mL d'héparine (Sigma), de 100µM de 2-mercaptoethanol (Invitrogen), de 100ng/mL de bFGF, de 10µM de SB431542 (Sigma) et 5µM Dorsomorphine (Sigma).

Après 10 jours, les sphères sont mises à adhérer dans des puits couverts de polyornithine (20µg/mL) et de laminine (10µg/mL) et cultivées pendant 10 jours dans un milieu composé de DMEM/F12 (Invitrogen) et de Neurobasal (Invitrogen) à 1 pour 1 complété par 2% de B27 sans vitamine A, 1% de N2 (Invitrogen), de 100µM de 2-mercaptoethanol (Invitrogen), de 10µM de SB431542 (Sigma) et 5µM Dorsomorphine (Sigma). Après ces 10 jours, Les rosettes formées par les sphères sont prélevées manuellement puis dissociées en Accutase (Invitrogen). Les cellules sont alors cultivées à haute densité ($2.10^5$ cellules par $cm^2$) pour conserver des PNs ou mises à adhérer à faible densité pour générer des neurones ($10^4$ cellules par $cm^2$). Les précurseurs neuraux sont passés une fois par semaine par un traitement en Accutase.

- **Autres**

Les immonu-marquages, les RT-PCR, les RT-PCR quantitatives, la formation des tératomes, le génotypage et caryotypage ont été réalisés comme décrit précédemment (Lemonnier et al., 2011).

Les amorces et sondes utilisées en RT-PCR quantitative non décrites précédemment ont été commandées chez Applied Biosystem et sont : Alsine : Hs00363612_m1*, Pax6 : Hs00240871_m1 et Nestine Hs00707120_s1. Pour le génotypage des couples d'amorces spécifiques de chaque mutation ont été utilisés.

# Discussion

## 1. Modélisation et étude physiopathologique de la MPSIIIB

Durant ce travail de thèse un nouveau modèle cellulaire d'étude de la MPSIIIB a été mis en place avec la génération de cellules iPS humaines de patients. Ce modèle unique a permis la recherche de nouveaux processus pathologiques découlant de l'accumulation d'HSO dans cette pathologie qui aboutit à un retard mental, à une neurodégénérescence et à la mort prématurée des enfants atteints.

Ce modèle généré à partir de fibroblastes de patients MPSIIIB a permis de comparer et d'étudier pour la première fois la physiopathologie de la maladie dans différents types de cellules humaines qui sont les fibroblastes, les cellules souches pluripotentes, les précurseurs neuraux et les neurones qui en dérivent.

La pertinence de ce nouveau système cellulaire d'étude est aujourd'hui avérée puisque des phénotypes caractéristiques de la maladie observés précédemment avec les modèles murins de MPSIIIB et chez les patients ont été reproduits avec ce modèle. Nous avons notamment observé une accumulation d'HSO provoquée par l'absence de l'enzyme NAGLU, accompagnée de l'accumulation secondaire du ganglioside GM3. Nous avons également montré la formation de vésicules distendues exprimant le marqueur lysosomal LAMP1 dans les neurones des patients. Ces vésicules présentaient en microscopie électronique une morphologie caractéristique des vésicules précédemment décrites dans la MPSIIIB.

Une fois le modèle validé dans les neurones humains de patients, nous avons montré que des altérations similaires étaient présentes dans les cellules souches iPS alors que les précurseurs neuraux présentaient peu d'anomalies. Enfin nous avons décrit de nouveaux phénotypes liés à la migration et la polarisation des cellules de patients.

### *1.1. Génération des cellules iPS de MPSIIIB*

Le premier phénotype que nous avons observé lors de la reprogrammation a été le fait qu'au moment de leur apparition les clones d'iPS de patients ont été incapables de proliférer en absence de l'enzyme NAGLU. Or les fibroblastes des patients ne présentaient pas d'altération évidente de leur croissance. Nous avons donc émis l'hypothèse qu'au cours du processus de reprogrammation les cellules

génétiquement modifiées avaient perdu leur capacité à proliférer en présence d'HSO. Par contre lorsque les cellules ont été reprogrammées en étant cultivées sur des cellules nourricières sur-exprimant l'enzyme déficiente et donc apte à trans-complémenter les cellules iPS naissantes, les clones de cellules iPS ont alors proliféré normalement, suggérant que les HSO étaient responsables du défaut de croissance des iPS générées.

Le processus de reprogrammation en iPS entraine une « remise à zéro » de l'état épigénétique des cellules et pourrait donc avoir effacé des mécanismes de compensation qui permettaient aux fibroblastes de survivre en présence d'HSO. De façon intéressante, une fois isolées, et après plusieurs passages, les cellules iPS de patients on pu être cultivées et amplifiées en absence d'enzyme, et ceci bien qu'elles accumulent à nouveau des HSO. Ce résultat a donc indiqué que les cellules iPS de patients MPSIIIB avaient acquis des mécanismes de compensation leur permettant de proliférer comme des iPS non malades.

Nous avons donc pu établir que les HSO pouvaient empêcher la croissance des cellules iPS, mais la manière dont ils ont joué un rôle n'a pas pu être identifiée notamment parce que quelques clones ont échappé à ce phénomène et ont proliféré normalement sans l'enzyme manquante mais en présence de faible quantité d'enzyme produite naturellement par les cellules nourricières non mutantes.

Néanmoins, une hypothèse fortement probable implique le bFGF, l'un des facteurs clés dans le maintien de la capacité d'auto-renouvellement et de prolifération des cellules iPS humaines en culture. En effet pour activer sa voie de signalisation, deux molécules de bFGF doivent se fixer à deux récepteurs au FGF entrainant une dimérisation et la formation d'un complexe qui doit être stabilisé par des HSPG (Sasisekharan et al., 2006). Cette hypothèse est également soutenue par le fait que la signalisation du bFGF est perturbée dans les cerveaux de souris MPSIIIB (Pye et al., 2000).

Deux situations peuvent être envisagées pour expliquer l'incapacité des clones de cellules iPS de MPSIIIB à proliférer. Dans la première, le récepteur resterait dimérisé car stabilisé par des HSO. Il serait alors activé trop fortement et internalisé par la cellule et non recyclé à la membrane. Dans ces conditions, les cellules seraient alors incapables de proliférer en réponse au bFGF présent dans le milieu. Dans une seconde situation, le récepteur aurait des difficultés à se dimériser à cause de fragments d'HSO se fixant sur les sites de fixation des protéoglycanes. Les HSO agiraient alors comme inhibiteurs. Dans cette situation aussi, les cellules seraient incapables de répondre à la présence de bFGF dans le milieu.

Comme dit ci-dessus, après plusieurs passages en culture, les cellules iPS de patients, cultivées en absence d'enzyme ont été capables de proliférer comme les iPS contrôles, indiquant la mise en place de mécanisme d'adaptation. Le mécanisme ici serait la capacité à répondre au bFGF pour proliférer.

L'ensemble de ces résultats a montré que les cellules chroniquement déficientes en NAGLU étaient capables d'activer des mécanismes de compensation leur permettant de survivre en présence de grande quantité d'HSO.

## *1.2. Modélisation des caractéristiques pathologiques*

Nous avons montré que les cellules iPS de patients ainsi que les neurones qui en dérivaient présentaient un phénotype caractéristique de la pathologie avec notamment l'accumulation de vésicules de surcharge dans le cytoplasme des cellules. Ces vésicules exprimaient le marqueur lysosomal LAMP1 et présentaient des morphologies caractéristiques déjà observées chez la souris mutante et dans les biopsies post-mortem de patients. Nous avons également montré dans ces deux types cellulaires, qu'une partie de ces vésicules distendues exprimaient à leur membrane la protéine de la matrice golgienne GM130. Cette observation avait été faite dans les neurones chez le modèle murin conjointement à la mise en place du modèle iPS (Vitry et al., 2010). La présence de cette protéine golgienne a conduit à formuler l'hypothèse que l'appareil de Golgi pouvait être impliqué dans la pathologie.

En accord avec ces résultats, nous avons décrit que les vésicules de surcharge présentes dans les cellules iPS et dans les neurones de patients étaient fréquemment apposées à l'appareil de Golgi et que la structure de celui-ci présentait de fortes altérations. L'appareil de Golgi est habituellement constitué de plusieurs saccules allongés, liés et alignés les uns aux autres. Dans les cellules iPS et dans les neurones de patients, l'appareil de Golgi était désorganisé. Il était constitué de petits saccules non liés, souvent non alignés. De plus, les saccules étaient souvent distendus. Cette désorganisation n'était pas corrélée avec des défauts de survie cellulaire ni de différenciation. De plus, la vésicularisation de l'appareil de Golgi se faisait normalement durant la mitose ou suite à un traitement avec de la brefeldine A, suggérant un trafic vésiculaire non perturbé dans les compartiments pré-golgiens.

Ce phénotype étant similaire à celui décrit dans des cellules appauvries en GM130 à l'aide d'ARNsi (siRNA) (Puthenveedu et al., 2006; Marra et al., 2007), nous avons émis l'hypothèse qu'il pouvait y avoir une perte de fonction de GM130 dans les cellules malades. Cependant, nous avons montré que dans les cellules iPS et dans les neurones de patients, la protéine GM130 était à l'inverse surexprimée. Ce résultat a suggéré que la protéine GM130 serait, au moins en partie, non fonctionnelle dans les cellules iPS et les neurones de patients.

Les interactions de GM130 avec p115 et GRASP65 (Figure 33), deux de ses partenaires protéiques les plus importants, sont nécessaires pour différentes fonctions de GM130 comme la fusion des vésicules avec l'appareil de Golgi ou le maintien de la structure du Golgi (Nakamura, 2010). Une hypothèse permettant

d’expliquer la perte de fonction de GM130 serait qu’elle est bloquée dans ses interactions avec ses partenaires. En accord avec cela il a été montré que GRASP65 et p115 n’étaient pas présents dans les vésicules de surcharge dans les neurones de souris MPSIIIB (Vitry et al., 2010).

En accord avec nos travaux, une autre étude menée dans le laboratoire dans un système « aigu » de cellules HeLa privées d’enzyme NAGLU à l’aide d’ARNsh a permis de montrer des anomalies de l’appareil de Golgi accompagnées d’une augmentation de l’expression de la protéine GM130. Dans ce modèle, l’appareil de Golgi est désorganisé avec des saccules plus allongés (Roy et al., 2012), rappelant nos observations de dispersion des éléments golgiens GM130 dans les neurites humains MPSIIIB. De plus, dans ces cellules HeLa privées de NAGLU, l’extinction de l’expression de GM130 a conduit à une absence presque totale de vésicules distendues. Enfin, dans des cellules HeLa normales, la surexpression de GM130 a entrainé la formation vésicules présentant les mêmes caractéristiques que celles accumulées dans les cellules déficientes pour la NAGLU (Roy et al., 2012).

En conclusion, l’ensemble de ces résultats a montré qu’il existait dans les cellules souches et les neurones de patients MPSIIIB des altérations de l’appareil de Golgi avec une implication de la protéine GM130 et la formation de vésicules distinctes des lysosomes et qui s’accumuleraient sans possibilité de fusionner ou d’être dégradées. GM130 serait une cible de la pathogénicité induite par les HS accumulés dans les cellules des patients. La perte des fonctions normales de cette protéine pourrait affecter de nombreux processus cellulaires, comme la polarité, la migration et la mobilité des cellules et par conséquent affecter la neurogénèse et la neuritogénèse.

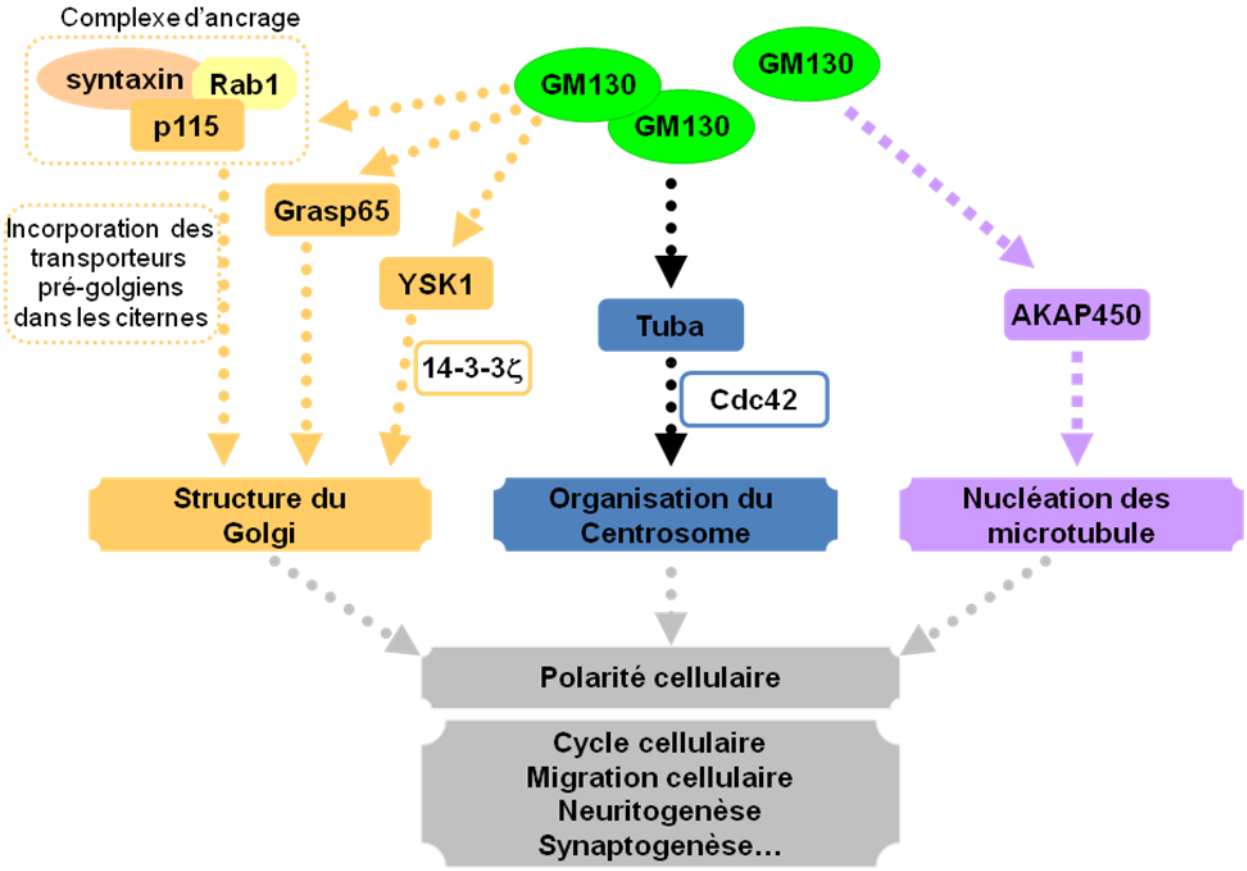



**Figure 33.** Partenaires de GM130 et processus cellulaires dans lesquels GM130 est impliquée. Du fait du grand nombre de partenaires avec lesquels elle interagit, GM130 est impliquée dans la structure de l'appareil de Golgi, dans l'organisation du centrosome et dans la nucléation des microtubules au niveau de l'appareil de Golgi. L'ensemble de ces fonctions indique que GM130 joue un rôle dans la polarité cellulaire, dans le cycle cellulaire, dans la migration, dans la neuritogénèse et la synaptogénèse.

### *1.3. Interaction avec la matrice extracellulaire*

Les analyses de l'expression des gènes dans les fibroblastes et dans les précurseurs neuraux contrôles et MPSIIIB ont permis d'identifier des modifications de l'expression de nombreux gènes. Nous avons observé la modification de l'expression de gènes impliqués dans la formation de la MEC comme ceux de la fibronectine, de la laminine ou de certains collagènes. De plus, l'expression de gènes codant pour des molécules impliquées dans les interactions entre les cellules et la MEC (telles que les intégrines), pour des facteurs de croissance (tels que les FGFs), pour des morphogènes (tels que des composants de la voie wnt/wingless) et pour des molécules impliquées dans la détection des signaux environnementaux

(sémaphorines, ephrine) était également affectée. Ces résultats ont montré que les gènes impliqués dans les interactions des cellules avec leur environnement étaient parmi les plus affectés dans les précurseurs neuraux ou dans les fibroblastes accumulant des HS partiellement dégradés, suggérant des altérations des interactions des cellules avec la MEC.

Les HSPG sont des composants majeurs des interactions des cellules avec leur environnement. Ils agissent comme des corécepteurs dans de nombreux processus cellulaires tels que l'adhésion cellulaire, la prolifération ou encore la différenciation.

Les HS sont normalement totalement dégradés après avoir été endocytés. Dans les cellules déficientes en NAGLU, la dégradation des HS s'arrête dans les endosomes précoces après l'action de l'héparanase qui libère des HSO. Ces métabolites s'accumulent en intracellulaire mais sont également libérés dans le milieu extracellulaire. Etant donné le grand nombre de protéines avec lesquelles les HSPG interagissent normalement, les HSO peuvent vraisemblablement se fixer à de nombreuses protéines de la MEC. Par exemple, les HSO sont capables de se fixer aux récepteurs TLR4 des cellules microgliales et les activer (Ausseil et al., 2008). Cette fixation des HSO peut ainsi entraîner des modifications dans la signalisation de nombreuses protéines et donc altérer la perception de l'environnement des cellules pouvant ainsi perturber les interactions des cellules avec la matrice.

Nos résultats sur l'activation des plaques d'adhérence focales par les HSO extra-cellulaires ont montré que les HS partiellement dégradés et s'accumulant dans cellules MPSIIIB entraînaient une stimulation anormale de la signalisation par les intégrines et une activation constitutive de la formation d'adhésions focales dans les cellules malades et que les astrocytes malades présentaient des défauts de polarisation et migration. Les HS partiellement dégradés perturberaient la migration polarisée en empêchant la génération de nouvelles adhésions focales nécessaires à cette migration.

Compte tenu du grand nombre de partenaires protéiques des HS, cette perturbation est vraisemblablement causée par une altération des capacités des cellules à percevoir les signaux environnementaux. Les processus impliquant la polarisation, la migration et la capacité des cellules à répondre à des stimuli du milieu extracellulaire sont sans doute altérés chez les patients.

## *1.4. Problèmes développementaux dans la MPSIIIB*

Dans le système nerveux, des altérations comme celles que nous avons décrites peuvent conduire, en plus des défauts de migration et de polarisation, à des défauts de la croissance des neurites et de la croissance et de la guidance axonale. Ces

fonctions étant particulièrement importantes pour le développement du SNC et pour sa plasticité, leurs perturbations pourraient entrainer d'importantes atteintes dans le cerveau des enfants.

Alors que les altérations cellulaires identifiées dans les cellules souches iPS pourraient altérer leur potentiel de différenciation, nous n'avons pas observé de défauts dans la différenciation des cellules iPS de MPSIIIB en neurones en termes d'efficacité comme de cinétique. Ce résultat est cohérent avec le fait que *in utero* et à la naissance, les enfants atteints de MPSIIIB (Greenwood et al., 1978; Minelli et al., 1988) et les animaux modèles de la maladie (Li et al., 1999; Ellinwood et al., 2003) ne présentent pas de manifestations cliniques de la pathologie. Ces résultats ont suggéré que jusqu'à la naissance, la neurogénèse, la migration et la neuritogénèse étaient normales. Cependant, ces résultats ne permettent pas d'exclure la possibilité d'altérations plus discrètes du développement cérébral anténatal. Par exemple, même si les cellules iPS de MPSIIIB ont formé des tératomes contenant les trois feuillets embryonnaires, elles l'ont fait dans des souris qui possédait l'enzyme NAGLU et qui étaient donc capables de trans-complémenter les cellules. De même les protocoles de différenciation que nous avons utilisés, que ce soit pour générer des PNs et des neurones ou pour générer des corps embryonnaires contenant des cellules des trois feuillets, ne permettent pas d'analyser de fines variations du développement.

Plusieurs études réalisées sur d'autres MPS (MPSIIID et MPSVII) (Casal and Wolfe, 2000; Jones et al., 2004) et dans d'autres maladies de surcharge lysosomale (maladie de Pompe) (Miyagawa-Tomita et al., 1996) ont montré que les fœtus accumulaient progressivement les métabolites partiellement digérés et que certaines cellules commençaient à accumuler très tôt des vésicules de surcharge. Il est vraisemblable qu'il en soit de même dans les cellules de MPSIIIB et que les fœtus accumulent lentement et progressivement des HS partiellement dégradés. L'absence d'altérations importantes du SNC à la naissance des enfants suggèrent que la migration des neuroblastes pour former les couches corticales ainsi que la migration tangentielle des interneurones plus tardive se feraient normalement et que la quantité d'HSO accumulés dans la MEC serait encore faible. Néanmoins cela n'exclut pas des effets délétères plus subtils des HSO. En effet le développement et la maturation du SNC impliquent des processus comme la migration, la polarisation ainsi que la neurogenèse et la neuritogénèse. Or, ces processus sont affectés par la présence d'HSO *in vitro* (Hocquemiller et al., 2010).

L'ensemble de nos résultats suggèrent aujourd'hui que les défauts observés dans la pathologie MPSIIIB pourraient impliquer des anomalies du développement. De plus, le développement du SNC se poursuit après la naissance et il implique alors des processus comme la migration des neurones, la neurogénèse et la neuritogénèse (Ghashghaei et al., 2007). Au vu du rôle prépondérant des interactions entre les cellules et la MEC dans ces différents processus, de nombreux troubles du

développement pourraient se produire chez les enfants très tôt après la naissance si ce n'est avant, au fur et à mesure de l'accumulation des HSO. Des études sur des embryons de souris MPSIIIB pourraient permettre d'apporter des éléments de réponse à cette question.

La mise en évidence d'altérations précoces dans le développement du SNC pourrait avoir des conséquences majeures pour le développement des traitements potentiels. Au vu de ces résultats, il semble particulièrement important de pouvoir traiter les enfants le plus tôt possible afin d'éviter que les dommages causés par l'accumulation des HSO ne soient irréparables.

## *1.5. Cascade physiopathologique*

Les résultats obtenus par le laboratoire (Vitry et al., 2010; Roy et al., 2012) et dans nos travaux (Chapitre résultats 1 et 2) durant ces dernières années nous permettent de proposer un modèle de la cascade physiopathologique dans la MPSIIIB (Figure 34).

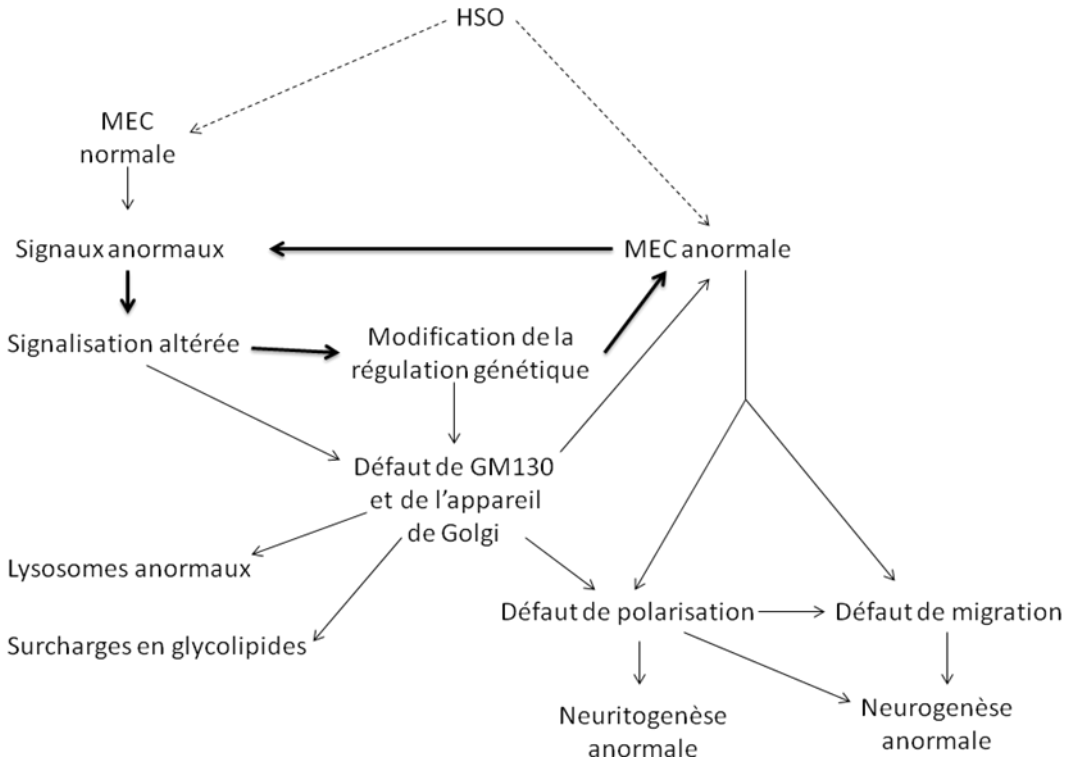



**Figure 34.** Conception actuelle de la physiopathologie de la MPSIIIB.
Les flèches en pointillés représentent la fixation des HSO aux molécules de la MEC. Les flèches pleines indiquent les effets induits par cette fixation. Le cercle vicieux qui perpétue les anomalies de la perception cellulaire de l'environnement est indiqué par les flèches en gras.

Suite à l'absence de l'enzyme lysosomale, des HS partiellement dégradés s'accumulent dans les cellules et dans l'espace extra-cellulaire. La première étape est la fixation de ces HSO partiellement digérés à la MEC. Ces fixations sur différents partenaires entrainent des signaux anormaux et des altérations dans la perception de l'environnement par les cellules. Comme nous l'avons montré dans nos travaux, les HSO vont par exemple activer des récepteurs comme les intégrines, ou bloquer des récepteurs au bFGF. Ces signaux anormaux vont provoquer une altération de la signalisation cellulaire qui va conduire à une modification de l'expression génique, comme les profils d'expression l'ont montré dans les PNs humains. L'expression modifiée des gènes va entrainer de nombreuses anomalies et notamment la constitution d'une MEC anormale. La fixation des HSO sur cette MEC va ensuite initier un cercle vicieux perpétuant l'altération de la perception cellulaire de l'environnement. Les altérations de la réponse cellulaire aux signaux environnementaux vont alors avoir de multiples conséquences avec notamment des défauts de polarisation, de migration conduisant à des défauts de neurogénèse et neuritogénèse.

Dans ce modèle les altérations de l'appareil de Golgi et notamment celles liées à la protéine GM130 semblent être centrales. Le dysfonctionnement de GM130 conduit à la formation et à l'accumulation progressive de vésicules anormales distinctes des lysosomes. De plus, les altérations de l'appareil de Golgi entraînent des anomalies du cytosquelette avec de nouveau de possibles conséquences sur la polarisation et la migration cellulaire.

Le lien entre fixation des HS partiellement digérés aux molécules de la MEC et aux récepteurs cellulaires et les différentes anomalies ci-dessus citées n'est pas encore clairement élucidé.

Afin de déterminer l'impact de GM130 dans la pathologie, le développement d'une souris transgénique sur-exprimant cette protéine dans un contexte non malade est en cours dans le laboratoire. L'objectif est de déterminer si la surexpression de GM130 qui conduit au développement des défauts vésiculaires et de l'appareil de Golgi dans des cellules HeLa, provoque chez les souris des phénotypes similaires.

# 2. Modélisation de la SLA ALS2/Alsine

## *2.1. Développement du modèle cellulaire humain.*

Les travaux présentés ici ont permis de mettre au point pour la première fois un modèle humain d'étude de la forme ALS2/Alsine. Comme dans le cas de la MPSIIIB,

ce modèle permet d'étudier la maladie dans plusieurs types cellulaires (cellules souches, PN, neurones) et devrait pouvoir faciliter l'identification de processus physiopathologiques impliqués dans cette maladie.

Les fibroblastes que nous avons reprogrammés en cellules iPS étaient porteurs de mutations responsables de la forme infantile de SLA2, l'IAHSP. Cette maladie ne touche que les motoneurones supérieurs présents dans le cortex moteur. Alors que dans l'étude sur la MPSIIIB nous disposions d'un modèle murin pertinent pour valider notre modèle humain avec les iPS, nous avions dans cette étude moins d'éléments pertinents pour valider la modélisation de la pathologie. En effet il n'existe pas de tissus post-mortem de patients et les modèles murins ne reproduisent pas la pathologie humaine. Les seuls modèles publiés qui ont reproduit la gravité du phénotype observé chez les patients sont des cellules dans lesquelles la perte de l'expression de l'alsine était induite rapidement avec des siRNA. Il n'existait pas jusque là de modèle humain de cette pathologie.

## *2.2. Phénotypes observés dans les neurones de patients.*

Deux phénotypes ont été analysés dans les neurones des patients. Nous avons tout d'abord montré une diminution significative de la surface des endosomes dans les neurones des patients. Ce phénotype était similaire à celui rapporté dans différents modèles cellulaires de la maladie (Otomo et al., 2003; Hadano et al., 2006; Jacquier et al., 2006), montrant la possibilité de modéliser cette pathologie.

La réduction de la surface des endosomes pourrait être provoquée par le défaut d'activation de Rab5 par l'alsine mutante qui serait instable dans les cellules. Rab5 est impliquée dans la fusion des vésicules d'endocytose avec les endosomes précoces, mais aussi dans la fusion des endosomes précoces entre eux. L'activation de Rab5 est également requise pour la maturation des endosomes précoces (Zerial and McBride, 2001). Les perturbations de la dynamique endosomale peuvent être particulièrement délétères pour les motoneurones, qu'ils soient corticaux ou spinaux, compte tenu de la longueur de leurs axones.

Le second phénotype analysé était celui de l'arborescence des neurones. L'obtention de neurones isolés et synchronisés dans leur différenciation étant difficile et délicate, nous nous sommes d'abord intéressés au nombre de prolongements émis à proximité du corps cellulaire des neurones, plutôt qu'à la longueur totale des neurites. Les résultats obtenus ont montré que les neurones des trois patients (1 ou 2 clones par patient) émettaient un nombre de prolongements significativement plus important que les neurones contrôles.

L'alsine est impliquée dans la neuritogénèse notamment via ses interactions avec la protéine Rac1 qui est impliquée dans la croissance axonale. Il a été montré que la surexpression de l'alsine dans des neurones corticaux de rat entrainait un accroissement de la longueur du plus long neurite (Tudor et al., 2005), et que l'extinction de son expression dans des motoneurones spinaux de rat à l'aide d'ARNsi entraînait une diminution de la longueur de l'axone (Jacquier et al., 2006). Des axones plus courts ont été mesurés dans des cultures de neurones issus de souris inactivées pour le gène de l'alsine (Otomo et al., 2008). Alors que ces différents résultats ont suggéré que la perte de l'alsine inhibait la croissance de l'axone et des neurites, nos résultats ont suggéré que son absence dans les neurones de patients entraînait des branchements surnuméraires par rapport aux neurones de donneurs sains. Ceci étant nous n'avons pas de preuve définitive de l'absence de la protéine mutante dans nos cellules et nous ne savons pas non plus si la mutation induit seulement une déstabilisation et une perte de fonction ou bien si certaines altérations pourraient être aussi liées à un gain de fonction de la protéine mutante.

Néanmoins l'hypothèse la plus probable est liée à une perte de fonction de l'alsine et la perturbation des voies de signalisation impliquant Rac1 et Rab5 qui pourraient être altérées.

Rac1 est impliquée dans la micropinocytose. Il a été montré que lorsque Rac1 est activée, elle interagit avec l'alsine qui est alors relocalisée aux extensions de membrane induites par Rac1, ainsi qu'aux macropinosomes (Kunita et al., 2007). L'alsine relocalisée aux compartiments membranaires va activer Rab5 et induire la fusion des macropinosomes avec les endosomes précoces et la maturation des endosomes (Zerial and McBride, 2001).

D'autre part Rac1 et Rab5 sont impliquées dans la croissance des neurites (Li et al., 2000). Il a été montré que lorsque Rac1 est activée, elle se fixe à la kinase Pak1 entraînant son activation, une modification de la dynamique du cytosquelette d'actine et l'induction d'une augmentation du nombre de neurites (Hayashi et al., 2002). Par contre lorsque Rab5 est activée, la croissance neuritique induite par le NGF est inhibée (Liu et al., 2007; Heo et al., 2010). Rab5 inhiberait la croissance des neurites en limitant la signalisation du NGF. Les rôles des deux protéines activées dans la pousse des neurites sont donc opposés.

La signalisation du NGF débute après sa fixation à son récepteur TrkA qui est associé à RabGAP5 (Rab5-specific GTPase Activating Protein) après son endocytose. Or cette protéine est capable d'inactiver Rab5 (Liu et al., 2007). La signalisation du NGF induisant la croissance neuritique se ferait via des endosomes dit de 'signalisation' où TrkA recruterait de nouveaux adaptateurs qui induiraient la croissance des neurites (Liu et al., 2007). Les endosomes de 'signalisation' seraient impliqués dans le transport rétrograde sur de longues distances du NGF et ils

auraient une durée de vie plus longue que les endosomes précoces conventionnels. Il a été montré que leur maintien impliquait que l'activité de Rab5 soit stoppée afin d'éviter la fusion avec les endosomes précoces (Rink et al., 2005). Suite à la fixation du NGF sur son récepteur et son endocytose, RabGAP5 associée à TrkA diminuerait alors l'activité de Rab5. Les vésicules contenant le récepteur TrkA ne fusionneraient pas avec les endosomes précoces. Il en résulterait que ces vésicules formeraient des 'endosomes' de signalisation permettant l'induction de la croissance neuritique.

L'alsine interagit donc avec deux protéines impliquées différemment dans la croissance neuritique. Différents mécanismes pourraient expliquer nos résultats sur l'accroissement des branchements neuritiques dans les neurones des patients.

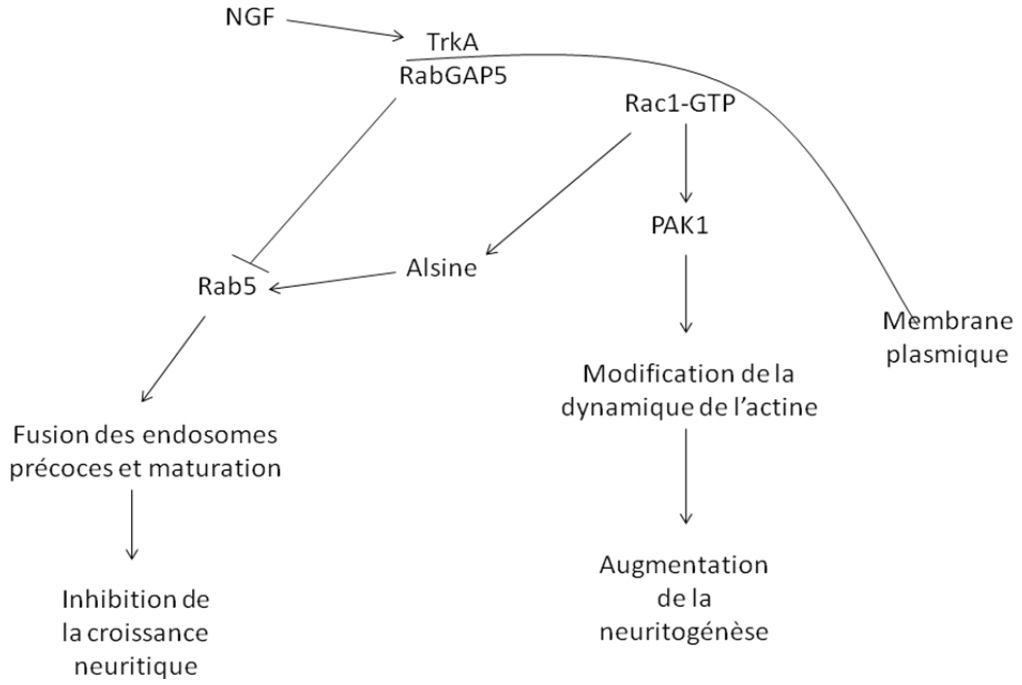



**Figure 35.** La fixation du NGF à son récepteur TrkA induit sont endocytose associé à RabGAP5 qui va inactiver Rab5. Dans ce cas, la croissance des neurites est activée.
L'activation de Rac1 entraine d'une par l'activation de la kinase PAK1 qui entraîne une augmentation de la neuritogénèse. De plus, lorsque Rac1 est activée elle recrute l'alsine et entraîne sa relocalisation aux compartiments membranaire ce qui entraîne l'activation de Rab5. Or l'activation de Rab5 conduit à une diminution de la neuritogénèse. L'alsine pourrait donc être au cœur de la régulation de la neuritogénèse.

Un premier mécanisme impliquerait principalement Rac1. L'étude sur les interactions de l'alsine avec Rac1 semblent plutôt indiquer une diminution de la neuritogénèse en cas de baisse d'activité de Rac1 et donc en cas d'absence de l'alsine (Tudor et al., 2005; Jacquier et al., 2006). Néanmoins de façon intéressante, il a été également montré que Rac1 favorisait à la fois la pousse des neurites et leur rétraction (Li et al., 2000). L'alsine pourrait ainsi avoir une action régulatrice sur Rac1 et, en son absence, la rétraction des neurites pourrait être moins efficace, ce qui expliquerait le

phénotype que nous avons observé. Des analyses dynamiques de la pousse et de la rétraction des neurites permettraient de valider ou non cette hypothèse.

Un second mécanisme impliquerait principalement Rab5 et sa perte de fonction. La relocalisation de l'alsine aux compartiments membranaires et en particulier aux macropinosomes et aux endosomes (Kunita et al., 2007) est suivie d'une interaction entre l'alsine et Rab5 qui est activé. Or comme nous l'avons vu précédemment, l'activation de Rab5 peut bloquer la croissance neuritique induite par le NGF. La perte de l'alsine dans les neurones humains pourrait donc conduire, a une inactivation de Rab5 et une augmentation de la croissance des neurites avec un excès de branchement.

Quelque soit le mécanisme impliqué, des anomalies dans le développement neuritique pourraient être responsables de nombreuses altérations dans le fonctionnement des neurones pouvant ainsi les rendre plus fragiles. L'impact des défauts que nous avons observés ici sur des neurones gabaergiques pourrait être encore plus important sur les motoneurones supérieurs et inférieurs en raison de leurs très longs axones. Des altérations de leur croissance neuritique pourraient conduire à leur dégénérescence.

## *2.3. iPS AL2/Alsin et développement*

Dans cette étude, nous n'avons pas observé d'anomalie évidente dans la différenciation des cellules iPS de patients. Les cellules iPS ont été générées comme les iPS contrôles et elles ont formé normalement les trois feuillets embryonnaires *in vitro* comme *in vivo*. D'autre part la différenciation en PNs et en neurones n'a pas semblé altérée. Ces résultats sont en accord avec les observations dans les modèles murins inactivés pour l'ALS2/Alsine qui ne présentaient pas de défaut de développement. Néanmoins, chez les enfants touchés par les différentes formes de maladies du motoneurone provoquées par des mutations dans le gène ALS2/Alsine, la maladie se déclare souvent avant l'âge de 2 ans laissant tout de même penser que le développement neuronal de ces enfants pourrait être anormal. Comme dans le cas de la modélisation de la MPSIIIB, il est possible que les protocoles de différenciation utilisés n'ont pas permis d'observer de fines anomalies du développement. Contrairement à l'étude sur les MPSIIIB dans laquelle nous avons analysé le phénotype dans les cellules souches iPS, nous n'avons pas recherché de défauts pathologiques dans les cellules souches iPS des patients ALS2/Alsine. Or nous avons montré une diminution significative des ARNs codant pour l'alsine dans les iPS des patients, suggérant une possible altération précoce dans les cellules souches. Des analyses, notamment des défauts des endosomes, pourront être

réalisées sur les iPS des patients afin de rechercher d'éventuels défauts pathologiques dans les cellules indifférenciées.

## *2.4. La différenciation neuronale des iPS ALS2/Alsin.*

Il n'existe pas actuellement de protocole pour générer spécifiquement des motoneurones corticaux glutamatergiques qui sont ceux affectés dans l'IAHSP. Le protocole de différenciation que nous avons développé a permis d'obtenir une population de neurones, dont une majorité de neurones gabaergiques qui sont vraisemblablement des interneurones. Néanmoins, des études réalisées sur des neurones corticaux incluant les neurones pyramidaux (dont les motoneurones corticaux font partie), mais aussi des interneurones, ont montré des altérations, sans distinction du type de neurones, lorsque l'expression de l'alsine était bloquée à l'aide de ARNsi (Jacquier et al., 2009). Notre protocole de différenciation a donc permis de modéliser des phénotypes dans un type cellulaire précédemment étudié *in vitro* pour démontrer des phénotypes pathologiques, même s'il ne s'agissait pas des motoneurones glutamatergiques ou cholinergiques principalement affectés dans la pathologie. Il sera cependant maintenant important de développer un protocole permettant de générer des motoneurones corticaux.

D'autre part différentes études ont montré que la présence d'autres types cellulaires pouvait protéger ou au contraire être toxique pour les motoneurones de patients SLA (Marchetto et al., 2008; Jacquier et al., 2009). Afin de pouvoir étudier les phénotypes intrinsèques aux neurones, nous avons initié des travaux pour développer des systèmes de tri des neurones. La méthode de tri que nous avons développée dans ce but, en collaboration avec l'équipe du Dr Haase, est basée sur l'utilisation d'un vecteur lentiviral permettant l'expression de la RFP sous contrôle du promoteur de la synapsine (SYN::RFP). La synapsine est une protéine spécifique des neurones. Elle a permis d'obtenir des cultures de neurones purs mais n'a pas permis de trier une sous-population de neurones tels que des neurones glutamatergiques. Cependant, le développement de ce type de purification de neurones pourrait permettre de réaliser différentes études jusqu'ici difficilement réalisables sur des neurones humains purs dès les stades précoces de la maladie et au cours de leur maturation.

## *2.5. Utilisation des cellules iPS pour modéliser la SLA*

Depuis le développement de la technique de reprogrammation de cellules somatiques en iPS, d'autres équipes l'ont utilisées afin de modéliser différentes formes de SLA.

En 2008, Dimos et col. ont généré des iPS à partir de fibroblastes de deux sœurs présentant une mutation dans le gène SOD1 (L144F). Cette étude a montré que les fibroblastes de patients pouvaient être reprogrammés en cellules iPS et que ces dernières pouvaient être différenciées en motoneurones. Néanmoins, ces travaux ne décrivaient aucun phénotype associés à la pathologie (Dimos et al., 2008).

En 2011, Mitne-Neto et col. ont décrit la génération d'iPS à partir de fibroblaste de quatre patients atteints de SLA causée par une mutation dans le gène VAPB (P56S). Comme pour les travaux de Dimos et col., ces travaux ont montré que les fibroblastes de patients atteins de SLA pouvaient être reprogrammés en cellules iPS puis différenciés en motoneurones. Ils ont de plus montré un défaut de l'augmentation de l'expression de la protéine VAPB lors de la différenciation en motoneurones mais ceci a été réalisé dans des cultures non pures (Mitne-Neto et al., 2011). Enfin, ils n'ont pas montré la présence d'inclusions cytoplasmiques dans les motoneurones et n'ont pas décrit non plus d'altération de la survie des motoneurones de patients.

Plus récemment, deux publications ont décrit la génération de cellules iPS à partir de fibroblastes de patients atteints de SLA causée par des mutations dans le gène TARDBP. Dans une première étude, Bilican et col. ont reprogrammé des fibroblastes d'un patient présentant la mutation M337V. Comme dans les précédentes études, ils ont montré que les fibroblastes mutants pouvaient être reprogrammés en iPS comme des fibroblastes contrôles et que les iPS de patient pouvaient être différenciées en motoneurones. Mais ils ont également décrit une augmentation de la protéine TDP43 sous formes soluble et insoluble dans les iPS et dans les motoneurones de patients ainsi qu'une plus grande fragilité des motoneurones de patients (Bilican et al., 2012). Dans la seconde étude publiée très récemment, Egawa et col. ont décrit la génération d'iPS à partir de fibroblastes de neufs patients présentant les mutations Q334R, M337V et G298S. Les iPS ont été différenciées en motoneurones qui ont été purifiés par cytométrie de flux. Ils ont montré que les motoneurones issus de patients présentaient des neurites plus courts et qu'ils accumulaient la protéine TDP43 sous forme insoluble. De plus, ils ont montré que les motoneurones issus d'iPS de patients étaient plus sensibles au stress oxydatif que des motoneurones contrôles. Ils ont enfin identifié une molécule (l'acide anacardique) qui permettrait de corriger certains des phénotypes relatifs à cette forme de SLA (Egawa et al., 2012).

L'ensemble de ces études, ainsi que les résultats que nous avons obtenu, montrent que la technique de reprogrammation en cellules iPS permet de développer des modèles d'études de la SLA, que les cellules différenciées à partir de ces iPS (neurones et motoneurones) présentent des altérations en relation avec la pathologie et qu'elles peuvent être utilisées pour réaliser du criblage de molécules d'intérêts thérapeutiques.

# 3. Utilisation des cellules iPS comme outil de modélisation des maladies neurodégénératives

Nous avons généré des cellules iPS humaines afin de développer des modèles d'étude de deux maladies neurodégénératives, la MPSIIIB et la SLA2/Alsine. De nombreuses autres pathologies, neurodégénératives ou non, ont également été modélisées à l'aide de ces cellules depuis la mise au point de cette nouvelle technologie (Grskovic et al., 2011b). Les travaux que nous avons réalisés ont permis de montrer que les cellules iPS et les cellules différenciées à partir de ces iPS de patients pouvaient reproduire des phénotypes observés dans d'autres modèles mais aussi pouvaient être utilisées pour dévoiler de nouveaux mécanismes pathologiques. Pendant la réalisation de nos travaux, de nombreuses publications ont montré qu'il est aujourd'hui possible de modéliser de nombreuses maladies directement avec les cellules issues de patients. Néanmoins, un certain nombre de points conviennent d'être discutés quant aux véritables potentialités des cellules iPS comme outil de modélisation de maladies.

## *3.1. Variabilité du comportement des clones de cellules iPS*

Le premier point à prendre en compte lors de l'utilisation des cellules iPS pour développer des modèles est la variabilité de comportement qui existe entre les clones. En effet, des clones générés à partir d'une même lignée de cellules somatiques peuvent présenter des différences dans leur comportement en culture, que ce soit dans leur croissance ou dans leur capacité de différenciation.

L'utilisation de vecteurs intégratifs pour reprogrammer les cellules pourrait être une des causes de ces variabilités car ces vecteurs s'intègrent au hasard dans le génome, parfois en plusieurs copies, et l'intégration peut influencer l'expression de gènes voisins. Il a été montré, et nous l'avons aussi observé, qu'une expression, plus ou moins résiduelle, des gènes transduits pouvait persister dans les différents clones d'iPS. De plus l'expression des transgènes peut être réactivée au cours de la

différenciation des iPS (Okita et al., 2007). Nous n'avons pas observé de réactivation de l'expression des vecteurs dans les clones que nous avons générés. Ceci étant nous avons observé des différences de comportement en culture entre des clones de cellules iPS, au niveau de la vitesse de croissance, de leur propension à se différencier spontanément en culture ou de leur efficacité de différenciation, alors que l'extinction des vecteurs était similaire entre eux. Malgré cela, que ce soit pour modéliser la MPSIIIB ou la SLA2/Alsine, nous avons toujours observé des phénotypes dans tous les clones générés même si l'intensité de ces phénotypes pouvait varier d'un clone à l'autre.

L'intégration des vecteurs ne semble pas être la seule explication à cette variabilité entre les clones d'iPS. En effet il a été montré que les cellules reprogrammées avec des méthodes non intégratives présentaient aussi des variabilités dans leur comportement en culture. De même les cellules ES présentent elles aussi des variabilités dans leurs comportements entre deux lignées (Ward et al., 2004; Osafune et al., 2008). L'origine des différences dans les iPS pourrait être associée à l'apparition de modifications génétiques ou de modifications épigénétiques qui ont lieu au cours de la reprogrammation et qui contrôlent l'expression des gènes des cellules, mais également aux conditions de culture.

## *3.2. Modifications génétiques*

Plusieurs études ont montré que la reprogrammation des cellules pouvait entraîner l'accumulation d'altérations génétiques au niveau chromosomique, sous-chromosomique ou au niveau de la séquence d'ADN.

Des aneuploïdies ont été observées dans différentes lignées de cellules iPS qui vont de duplications de fragments de chromosome à des trisomies. Elles vont généralement apporter un avantage de croissance aux cellules. Par exemple la trisomie du chromosome 12 entraine une surexpression de NANOG (Mayshar et al., 2010) favorisant l'auto-renouvellement des cellules et pourrait donc provenir d'un processus d'adaptation des cellules à la culture. Ce type d'aneuploïdie, comme la trisomie du chromosome 12, est également fréquemment observée dans les cellules ES humaines (Baker et al., 2007).

Une augmentation du nombre de copies (CNV : copy number variation) a également été observée dans les cellules iPS. Ce type d'altération génétique est généralement observé très tôt après l'isolement des clones et se produirait durant le processus de reprogrammation. Il semble cependant qu'il y ait une sorte de sélection négative des cellules présentant ces anomalies au cours de la croissance (Hussein et al., 2011) et donc que la plupart soit plutôt délétères pour les cellules. Parmi ces altérations, celles qui persistent dans les iPS sont généralement des délétions qui concernent

des gènes suppresseurs de tumeur et qui se produiraient durant le processus de reprogrammation, ou bien des duplications de gènes favorisant la croissance des cellules et qui se produiraient au cours de la culture après isolement des clones (Laurent et al., 2011).

Enfin, des mutations génétiques ponctuelles ont pu être observées dans le génome des cellules iPS. Ce type de mutations se produirait durant le processus de reprogrammation. La plupart de ces mutations se retrouverait dans des gènes impliqués dans des tumeurs et ces mutations pourraient favoriser le processus de reprogrammation.

Néanmoins, un certain nombre de ces mutations ont pu être retrouvées au sein de sous-populations de cellules présentes parmi les cellules de départ (avant la reprogrammation) (Gore et al., 2011). En d'autres termes, au moins une partie de ces mutations sont présentes dans la population cellulaire avant la reprogrammation. Des études plus récentes ont suggéré que les altérations génétiques sélectionnées lors du processus de reprogrammation pouvaient provenir de mutations préexistantes dans la population de cellules d'origine et seraient donc indépendantes du processus de reprogrammation (Cheng et al., 2012; Young et al., 2012). Les cellules iPS étant des populations clonales, les variations génétiques présentes à un faible niveau dans les cellules d'origine, si elles confèrent un avantage en termes de croissance cellulaire, pourraient devenir beaucoup plus visibles au sein de ce type de population. De plus, les mutations favorisant le processus de reprogrammation présentes au sein de sous-populations dans les cellules de départ vont être amplifiées dans les clones de cellules iPS. Ce type de mutations pourrait par ailleurs permettre de déterminer de nouvelles voies de signalisation impliquées dans le processus de reprogrammation et ainsi identifier de nouvelles approches permettant de le favoriser.

Enfin, des études menées sur les iPS murines ont montré que les clones de cellules iPS de souris capables de former de nouveaux animaux ne présentaient que très peu d'altérations génétiques avec des iPS présentant 1 ou 2 mutations ponctuelles par lignée d'iPS (Quinlan et al., 2011), montrant que le génome des cellules somatiques reprogrammées peut rester stable durant la reprogrammation.

En conclusion, il est clair aujourd'hui que les cellules iPS peuvent contenir des altérations génétiques. Néanmoins, le processus de reprogrammation en iPS n'est pas forcément à l'origine de ces altérations. Des modifications génétiques ont également été rapportées dans les cellules souches ES. Afin d'obtenir des clones de cellules iPS qui ne présentent pas d'altération, il semble nécessaire de mieux contrôler et comprendre le processus de reprogrammation. Il est également important de pouvoir contrôler le génome des cellules iPS au niveau du caryotype et de potentielles mutations principalement dans des gènes impliqués dans le développement ou dans la formation des tumeurs (Gore et al., 2011).

## *3.3. Modifications épigénétiques*

Durant le processus de reprogrammation, de nombreuses modifications épigénétiques se produisent, telles que des déméthylations de l'ADN et des histones. Ces modifications épigénétiques permettent de réactiver le programme d'expression génétique spécifique des cellules souches pluripotentes et en parallèle d'éteindre celui des cellules différenciées. Plusieurs études ont montré que le statut global de la méthylation de l'ADN entre des cellules iPS et des cellules ES était similaire (Wernig et al., 2007; Guenther et al., 2010). De plus des analyses globales d'expression génique ont montré de grandes similitudes entre les cellules iPS et les ES (Bock et al., 2011).

Malgré cela, il a été montré que les cellules iPS conservaient des marques épigénétiques de leurs cellules d'origine (Kim et al., 2010b) qui pouraient éventuellement limiter leur capacité de différenciation. Elles présenteraient également des méthylations anormales par rapport aux cellules ES humaines, telles que la persistance de méthylations sur des promoteurs de gènes somatiques, au niveau des centromères, des télomères ou encore des histones (Lister et al., 2011). En parallèle il a été montré que les cellules ES présentaient elles aussi des variations dans leur épigénomes entre des lignées indépendantes (Allegrucci and Young, 2007).

Néanmoins, il semble que la mémoire épigénétique des cellules iPS soit la plus forte juste après leur isolement et qu'elle disparaisse au cours des passages en culture (Chin et al., 2009, 2010; Polo et al., 2010). Le fait de traiter les cellules avec des molécules affectant les mécanismes épigénétiques, tels que les méthylations ou les acétylations de l'ADN ou des histones, peut également améliorer l'effacement de la mémoire épigénétique de cellules iPS (Kim et al., 2010b).

Bien que le statut épigénétique des cellules iPS semble être variable à l'issue du processus de reprogrammation, il semble aujourd'hui possible de favoriser le retour à un état de statut épigénétique de pluripotence fortement déméthylé et similaire à celui de cellules ES humaines (Kim et al., 2010b).

Le statut du chromosome X est également un point intéressant du point de vue du statut épigénétique des cellules iPS. En effet, dans les cellules murines, lors de la reprogrammation le chromosome X est réactivé. Puis lors de la différenciation, l'un des deux est inactivé au hasard (Maherali et al., 2007b). Chez l'homme, le statut de la réactivation du chromosome X est moins clair. Certains groupes ont montré une réactivation (Marchetto et al., 2010; Kim et al., 2011; Cheung et al., 2012) dans les clones d'iPS alors que d'autres ont obtenu des cellules iPS dans lesquelles le chromosome X demeurait inactivé (Ananiev et al., 2011; Cheung et al., 2011). De manière intéressante, le statut du chromosome X évolue lors de la culture des

cellules ES humaines, s'inactivant au fur et à mesure de la culture mais sans influer sur leur capacité de différenciation *in vitro* (Silva et al., 2008b). L'état de réactivation du chromosome X dans les cellules iPS pourrait être le reflet du niveau de reprogrammation des cellules, les cellules iPS ayant leur chromosome X réactivé étant « mieux » reprogrammées que celles où il demeure inactivé.

L'existence de différences de statut épigénétique entre les lignées de cellules ES comme entre les clones d'iPS est sans doute normale. Elle pourrait refléter d'une part la différence de fond génétique entre les lignées et d'autre part, pour les iPS, être le reflet des évènements stochastiques qui ont lieu lors du processus de reprogrammation. Il convient néanmoins de s'assurer que ces différences n'induisent pas l'expression de gènes tumoraux.

## *3.4. Différenciation des iPS*

La capacité des cellules iPS à se différencier en différents types cellulaires a fait l'objet de nombreuses études. La plupart de ces études a permis de montrer que les protocoles de différenciation développés pour les cellules ES humaines pouvaient être appliqués aux cellules iPS humaines. Ainsi les iPS peuvent être différenciés en de nombreux types cellulaires tels que des neurones, des hépatocytes ou encore des cardiomyocytes.

Néanmoins des études contradictoires ont été réalisées sur l'efficacité de la différenciation des cellules iPS comparées à celle des cellules ES. Quelques unes ont indiqué que la capacité des cellules iPS à générer des cellules différenciées était plus limitée que celle des cellules ES (Hu et al., 2010), alors que d'autres études ont montré des capacités équivalentes (Boulting et al., 2011).

Une première étude sur la différenciation des cellules iPS en hémangioblastes (précurseurs de toute la lignée hématopoïétique) a suggéré qu'elles se différenciaient de manière moins efficace que les cellules hES et qu'elles avaient un phénotype de cellules apoptotiques. De plus, cette étude a montré que lorsque les hémangioblastes dérivés de cellules iPS étaient différenciés en cellules endothéliales, ces dernières présentaient très rapidement un phénotype de sénescence. Ce phénotype se retrouverait également lorsque les cellules iPS sont différenciées en cellules de l'épithélium pigmentaire de la rétine (Feng et al., 2010). Une seconde étude a indiqué que la différenciation des cellules iPS en cellules neurales semblait plus variable et moins efficace que celle des cellules ES humaines (Hu et al., 2010). Cependant, une autre étude sur la différenciation des cellules iPS humaines, cette fois en motoneurones, a montré que sur 16 lignées de cellules iPS testées, 13 se différenciaient avec des efficacités similaires à celle des cellules ES humaines (Boulting et al., 2011). La question concernant la capacité des cellules iPS

humaines à se différencier avec une même efficacité que les cellules ES humaines reste donc ouverte. Les résultats des différentes études ont principalement montré que cette capacité était variable suivant les clones et il est clair que si tous les clones d'iPS générés n'ont pas les mêmes potentialités que les cellules ES humaines, certains les ont.

D'autre part, la différenciation des cellules iPS, comme celle des cellules ES humaines, n'est pas encore parfaitement contrôlée. En effet, même s'il est possible de fortement stimuler la voie de différenciation vers un type cellulaire particulier, il n'est pas possible d'obtenir une culture pure d'un type de cellule spécifique. Par exemple, dans nos travaux, mais aussi dans des études publiées récemment (Yuan et al., 2011a) il a été observé que lors de l'induction de la différenciation des iPS en neurones, des PNs persistaient dans les cultures.

Dans le cas de la différenciation en un sous-type de neurone particulier, tels que les motoneurones ou les neurones dopaminergiques, les cultures différenciées contiennent également des PNs et des cellules gliales ainsi que d'autres sous-types de neurones comme des neurones gabaergiques. Cette propension à former plusieurs types cellulaires lors de l'induction en neurones est sans doute provoquée par le fait que les PNs issus des cellules souches ES ou iPS n'ont pas vocation à ne donner qu'un seul type cellulaire. De plus, la balance des signaux extracellulaires induisant la formation d'un type de cellule plutôt qu'un autre peut être très subtile, et pourrait expliquer la génération de différents types cellulaires dans les cultures.

Le développement des modèles cellulaires dérivés des cellules iPS nécessite aujourd'hui des efforts particuliers pour un meilleur contrôle des processus de différenciation vers des cultures différenciées complètement comparables en termes de synchronisation et de type neuronal généré. De plus, l'obtention de lignées cellulaires pures permettant l'observation de phénotypes intrinsèques à un type cellulaire donné est aujourd'hui indispensable et nécessite le développement d'outils de purification des cellules d'intérêt. C'est le cas en particulier pour la SLA qui est une maladie, au moins pour partie, intrinsèque aux motoneurones.

Sur ces différents sujets, les nombreuses études sont contradictoires quant à la similarité des cellules iPS et ES humaines, aussi bien d'un point de vue de leurs caractéristiques moléculaires que fonctionnelles. Il existe une grande variabilité au sein de la population de cellules iPS générées dans les différents laboratoires qui peut provenir à la fois des lignées de cellules de départ, des méthodes de reprogrammation, des conditions de cultures, ou encore des critères de validation. Il faut noter qu'il existe également au sein des cellules ES une grande variabilité entre les lignées. L'utilisation des cellules iPS que ce soit pour modéliser des maladies, réaliser des criblages de molécules ou encore pour d'éventuelles futures applications médicales nécessite des critères stricts de validation de leur pluripotence, mais aussi de s'assurer de l'intégrité de leurs génomes et de leurs épigénomes.

## *3.5. Trans-différenciation*

Peu après la mise au point de la technologie de génération des cellules iPS, un autre procédé de reprogrammation a été décrit. Il s'agit de la trans-différenciation. Elle permet de reprogrammer directement une cellule d'un type cellulaire en un autre sans passer par le stade de cellule souche. Par exemple, des cellules pancréatiques exocrines murines ont été reprogrammées en cellules pancréatiques β (Zhou et al., 2008), des fibroblastes murins ont été reprogrammés en neurones (Vierbuchen et al., 2010) ou encore des fibroblastes humains et murins ont été reprogrammés en neurones dopaminergiques (Caiazzo et al., 2011; Pfisterer et al., 2011).

Cette technique nécessite, tout comme pour la génération des iPS, d'induire l'expression d'un certain nombre de facteurs exogènes, qui sont spécifiques du type cellulaire désiré. Pour l'instant les outils utilisés pour trans-différencier les cellules étaient des vecteurs viraux intégratifs. Alors que la surexpression des gènes Ascl1, Brn2, and Myt1l a permis d'induire la formation de neurones (Pfisterer et al., 2011), il a fallu la surexpression de jusqu'à dix facteurs supplémentaires, pour générer des neurones dopaminergiques (Pfisterer et al., 2011). Ceci étant une autre étude a montré la possibilité d'obtenir des neurones dopaminergiques à partir de fibroblastes humains avec seulement les trois facteurs Mash1, Nurr1, Lmx1a (Caiazzo et al., 2011). A l'heure actuelle l'utilisation de vecteurs intégratifs pose le problème de la mutagénèse insertionnelle, mais il est clair que les techniques non intégratives mises au point pour générer les iPS pourront s'appliquer aussi pour cette technique.

L'un des principaux avantages de cette technique est le fait de pouvoir générer les cellules d'intérêt sans avoir à passer par le stade de cellules pluripotentes et donc d'éviter les risques tumoraux inhérents à ces cellules, notamment lors de la différenciation. Ce processus permet également de gagner du temps dans la génération des cellules d'intérêt en évitant les étapes de caractérisation et les étapes de re-différenciation des iPS. Ceci peut être important pour de futures thérapies.

Néanmoins, l'utilisation de ces techniques pour la modélisation de maladies à partir de cellules parait plus limitée qu'avec des cellules souches. En effet, les cellules issues des patients sont des lignées primaires de cellules et ne peuvent être amplifiées qu'un nombre limité de fois avant d'entrer en sénescence. Or la trans-différenciation nécessite de repartir de la cellule de départ à chaque manipulation alors que les cellules iPS peuvent être fortement amplifiées sans entrer en sénescence et donc fournir de grande quantité de matériel. Néanmoins, il a été décrit récemment la génération à partir de fibroblastes murins de PNs capables de s'auto-renouveler (Lujan et al., 2012) permettant de résoudre ce problème chez la souris. Le développement de techniques équivalentes à partir de cellules humaines permettrait d'utiliser ces techniques afin de modéliser des pathologies.

## *3.6. Conclusions*

La technologie de reprogrammation de cellules somatiques en cellules iPS est très récente et très prometteuse mais elle pose encore de nombreuses questions. Il est nécessaire aujourd'hui de mieux comprendre les processus impliqués au cours de la reprogrammation. Une meilleure connaissance de ces processus pourrait permettre de mieux les maitriser ainsi que d'améliorer la sécurité des cellules iPS obtenues, notamment pour de futures applications de thérapie cellulaire avec ces cellules. De plus il est nécessaire de mieux contrôler leur différenciation vers des cultures de cellules clairement identifiés et pures.

Malgré cela, la technologie iPS permet aujourd'hui de disposer de modèles cellulaires humains pour étudier des maladies et notamment des maladies neurodégénératives incurables et pour lesquelles il existe des formes génétiques et des formes sporadiques. Il reste cependant nécessaire lors des études sur des modèles de pathologies générés avec des iPS de travailler avec plusieurs patients et plusieurs donneurs sains et pour chacun d'entre eux, de travailler avec plusieurs clones de cellules iPS afin de s'assurer de ne pas observer des artéfacts de cultures. Après s'être s'assuré que les cellules générées à partir des cellules iPS de patients reproduisent des phénotypes connus, le modèle peut permettre d'identifier de nouveaux phénotypes sur lesquels des criblages de molécules thérapeutiques pourraient être envisagés.

# Conclusion et perspectives

## 1. Etude de la MPSIIIB

L'analyse des liens entre la fixation des HSO à la MEC et les défauts de l'appareil de Golgi constitue le prochain objectif de l'étude de la pathologie. L'hypothèse est que le lien entre les HS partiellement dégradés et l'appareil de Golgi serait la stabilisation excessive des microtubules.

Deux explications seraient possibles. Dans la première, les HS partiellement dégradés s'accumuleraient dans la MEC et entraineraient l'activation de FAK qui serait alors responsable de la stabilisation des microtubules au niveau des plaques d'adhérences focales (Palazzo et al., 2004). Cette stabilisation au niveau des plaques d'adhérences focales pourrait entrainer une stabilisation des microtubules au niveau de l'appareil de Golgi. Dans la seconde, les HS partiellement dégradés activeraient les intégrines et entraineraient l'activation de Cdc42 qui serait alors responsable de la stabilisation des microtubules au niveau du front de migration (Etienne-Manneville, 2010). Cette stabilisation se faisant via la protéine CLIP170 et ses interactions avec les protéines CLASP, ces dernières seraient également responsables de la stabilisation des microtubules au niveau de l'appareil de Golgi (Efimov et al., 2007; Miller et al., 2009).

Il a été montré que la stabilisation des microtubules au niveau de l'appareil de Golgi entraînait la déformation de l'appareil de Golgi ainsi que la stabilisation des protéines GM130 et AKAP450 à sa surface (Miller et al., 2009). L'hypothèse que l'appareil de Golgi serait stabilisé dans les cellules MPSIIIB est soutenue par le fait que son collapse suite à un traitement avec de la brefeldine A est ralenti dans les neurones murins MPSIIIB (Vitry et al., 2010) ou dans des cellules HeLa déprivées en NAGLU (Roy et al., 2012).

Le lien entre la stabilisation des microtubules au niveau des plaques d'adhérence ou du front de migration et leur stabilisation au niveau de l'appareil de Golgi est manquant. Différentes expériences pourraient être menées, notamment sur les cellules iPS ou leurs dérivés afin de répondre à ces questions.

Le rôle des protéines CLASP dans la pathologie pourrait être étudié en les sur-exprimant ou en bloquant leur expression. Ces expériences pourraient permettre de savoir si la sur-expression des CLASP induit un phénotype dans les cellules normales proche de celui des cellules MPSIIIB. Au contraire, l'extinction de leur

expression pourrait permettre une correction du phénotype dans les cellules MPSIIIB.

Une autre expérience consisterait à stabiliser les microtubules avec du Taxol ce qui entrainerait une déformation de l'appareil de Golgi. Cette expérience pourrait permettre de reproduire les déformations observées dans les cellules MPSIIIB dans des cellules contrôles. Une dernière expérience consisterait à traiter des cellules contrôles avec des HS partiellement digérés afin de reproduire la stabilisation de l'appareil de Golgi observée dans les cellules MPSIIIB.

## 2. Etude de la ALS2/SLA

La description de phénotypes altérés en relation avec des phénotypes précédemment décrits dans des systèmes cellulaires murins a permis de montrer que les iPS des patients étaient des modèles cellulaires pertinents pour l'étude de la pathologie. Les premières indications ont montré que dans les iPS des trois patients exprimant des protéines alsine tronquées ou non, les phénotypes étaient équivalents, suggérant dans les trois cas une perte de fonction de la protéine mutante. Des analyses de stabilité de la protéine devront être réalisées pour confirmer la perte de fonction.

La poursuite des études sur cette forme de SLA implique à présent de répéter les analyses sur des neurones purifiés et clairement identifiés (GABAergiques) afin de confirmer les défauts des endosomes et de branchements neuritiques.

Il s'agira ensuite d'étudier en détails le trafic endosomal par des analyses en temps réel afin d'étudier la fusion des endosomes. L'implication de Rac1 et Rab5 pourra également être analysée. Les études des défauts de neuritogénèse seront également poursuivies sur des neurones purifiés soit par des analyses en temps réel afin de déterminer si la pousse ou la rétraction des neurites sont affectées, soit en analysant la longueur de l'axone des neurones par des immunomarquages spécifiques des axones et dendrites. Enfin, le fait d'avoir accès à des neurones purs offre la possibilité de réaliser des expériences telles que des analyses du transcriptome ou du protéome afin d'identifier de nouvelles pistes de recherche.

Les travaux présentés ici ont été réalisés sur des cultures de neurones en majorité GABAergique. Mais la pathologie IAHSP affecte les neurones moteurs du cortex qui sont glutamatergiques. Il s'agira donc de développer des protocoles pour obtenir ce sous-type de neurones pour comparer et étudier leurs défauts.

Afin d'étudier d'autres formes de SLA telles que la SLA2 juvénile ou les SLA de l'adulte, il apparait également nécessaire de parvenir à développer des protocoles

permettant la génération de motoneurones spinaux purs. La mise au point de tels protocoles est en cours dans le laboratoire.

La SLA est un syndrome dont les causes sont multiples. La modélisation de différentes formes génétiques, juvéniles et adultes, et de formes sporadiques, pourrait permettre de mieux comprendre les différents mécanismes physiopathologiques responsables de SLA. En particulier, la modélisation de formes sporadiques, qui ont potentiellement des défauts génétiques, pourrait dans un premier temps permettre d'analyser pour la première fois la physiopathologie de ces formes avant le stade terminal. Dans un second temps, les modèles générés à partir de SLA familiales ou sporadiques pourraient permettre de comparer les phénotypes dans les différentes formes de SLA afin d'identifier des molécules d'intérêt thérapeutiques adaptées à chacune.

## 3. Les iPS comme outils

Les cellules iPS sont devenues des modèles cellulaires permettant d'étudier la physiopathologie des maladies neurodégénératives. Aujourd'hui, de très nombreux modèles ont été développés. Néanmoins, la majeure partie des phénotypes qui ont été observés concernent des pathologies se développant relativement jeunes, même si pour certaines maladies plus tardives cette même approche a pu aussi s'avérer prometteuse (Grskovic et al., 2011b).

S'il est vrai que la technologie de reprogrammation en iPS doit encore être améliorée, elle permet tout de même en l'état actuel de mettre au point des modèles d'étude et de développer des tests permettant d'évaluer pré-cliniquement l'intérêt thérapeutique potentiel de molécules susceptibles de corriger ces phénotypes pathologiques.

Par exemple le modèle cellulaire dérivé des iPS de patients MPSIIIB pourrait dès à présent permettre de réaliser des tests de criblage de molécules à visée thérapeutique notamment dans le cadre de l'essai clinique qui va être initié en 2013.

L'utilisation des cellules iPS en médecine, en offrant la possibilité de générer des cellules saines susceptibles de se substituer aux cellules malades est une perspective à plus long terme. Un certain nombre de points devront être résolus avant de pouvoir greffer ces cellules reprogrammées et « corrigées ». Le premier concerne la génération de cellules qui devront être reprogrammées sans intégration de matériel exogène. De plus, la sélection des 'bons' clones sera indispensable. Cette sélection nécessite notamment la définition de critères de sélection précis concernant l'état de reprogrammation des cellules, le statut épigénétique de ces

cellules et l'absence dans ces cellules de mutations génétiques ou d'anomalies caryotypiques.

Une fois la sélection de clones effectuée, deux options sont envisageables. La première consisterait à générer des cellules patient par patient de manière à pouvoir réaliser des greffes homotypiques et donc ne posant à priori pas de problème d'histocompatibilité. Néanmoins, il est plus probable de voir se développer des banques de cellules iPS de donneurs sains permettant d'obtenir des cellules pouvant être greffées au plus grand nombre mais nécessitant des thérapies immunosuppressives.

Enfin, à terme, l'espoir suscité par ces cellules en thérapie serait de pouvoir les utiliser afin de générer des organes fonctionnels *in vitro*. Cette perspective peut paraitre encore lointaine. Néanmoins récemment, pour la première fois, un organe humain fonctionnel a pu être généré à partir de cellules iPS. En effet, l'équipe du professeur H. Taniguchi a réussi à générer un foie humain fonctionnel (http://www.bulletins-electroniques.com/actualites/70233.htm). Même si en l'état, il ne pourrait évidemment pas être greffé à des êtres humains, ce travail démontre qu'il est possible de développer des organes à partir de cellules souches et donc, à terme, de pouvoir utiliser ces cellules comme source d'organes à greffer.

# Bibliographie


**A**

Aasen, T., Raya, A., Barrero, M.J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilić, J., Pekarik, V., Tiscornia, G., et al. (2008). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. Nat. Biotechnol. *26*, 1276–1284.

Abramov, A.Y., Gegg, M., Grunewald, A., Wood, N.W., Klein, C., and Schapira, A.H.V. (2011). Bioenergetic consequences of PINK1 mutations in Parkinson disease. PLoS ONE *6*, e25622.

Agarwal, S., Loh, Y.-H., McLoughlin, E.M., Huang, J., Park, I.-H., Miller, J.D., Huo, H., Okuka, M., Dos Reis, R.M., Loewer, S., et al. (2010). Telomere elongation in induced pluripotent stem cells from dyskeratosis congenita patients. Nature *464*, 292–296.

Allegrucci, C., and Young, L.E. (2007). Differences between human embryonic stem cell lines. Hum. Reprod. Update *13*, 103–120.

Ananiev, G., Williams, E.C., Li, H., and Chang, Q. (2011). Isogenic pairs of wild type and mutant induced pluripotent stem cell (iPSC) lines from Rett syndrome patients as in vitro disease model. PLoS ONE *6*, e25255.

Antony, P.M.A., Diederich, N.J., and Balling, R. (2011). Parkinson's disease mouse models in translational research. Mamm. Genome *22*, 401–419.

Ausseil, J., Desmaris, N., Bigou, S., Attali, R., Corbineau, S., Vitry, S., Parent, M., Cheillan, D., Fuller, M., Maire, I., et al. (2008). Early neurodegeneration progresses independently of microglial activation by heparan sulfate in the brain of mucopolysaccharidosis IIIB mice. PLoS ONE *3*, e2296.

**B**

Badcock, G., Pigott, C., Goepel, J., and Andrews, P.W. (1999). The human embryonal carcinoma marker antigen TRA-1-60 is a sialylated keratan sulfate proteoglycan. Cancer Res. *59*, 4715–4719.

Baker, D.E.C., Harrison, N.J., Maltby, E., Smith, K., Moore, H.D., Shaw, P.J., Heath, P.R., Holden, H., and Andrews, P.W. (2007). Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis in vivo. Nat. Biotechnol. *25*, 207–215.

Ban, H., Nishishita, N., Fusaki, N., Tabata, T., Saeki, K., Shikamura, M., Takada, N., Inoue, M., Hasegawa, M., Kawamata, S., et al. (2011). Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *108*, 14234–14239.

Barinaga-Rementeria Ramirez, I., and Lowe, M. (2009). Golgins and GRASPs: Holding the Golgi together. Seminars in Cell & Developmental Biology *20*, 770–779.

Batista, L.F.Z., Pech, M.F., Zhong, F.L., Nguyen, H.N., Xie, K.T., Zaug, A.J., Crary, S.M., Choi, J., Sebastiano, V., Cherry, A., et al. (2011). Telomere shortening and loss of self-renewal in dyskeratosis congenita induced pluripotent stem cells. Nature *474*, 399–402.

Benowitz, L.I., and Routtenberg, A. (1997). GAP-43: an intrinsic determinant of neuronal development and plasticity. Trends Neurosci. *20*, 84–91.

Bernfield, M., Götte, M., Park, P.W., Reizes, O., Fitzgerald, M.L., Lincecum, J., and Zako, M. (1999). Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. Annu. Rev. Biochem. *68*, 729–777.

Bertram, L., and Tanzi, R.E. (2005). The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. J. Clin. Invest. *115*, 1449–1457.

Bialkowska, K., Zaffran, Y., Meyer, S.C., and Fox, J.E.B. (2003). 14-3-3 zeta mediates integrin-induced activation of Cdc42 and Rac. Platelet glycoprotein Ib-IX regulates integrin-induced signaling by sequestering 14-3-3 zeta. J. Biol. Chem. *278*, 33342–33350.

Bilican, B., Serio, A., Barmada, S.J., Nishimura, A.L., Sullivan, G.J., Carrasco, M., Phatnani, H.P., Puddifoot, C.A., Story, D., Fletcher, J., et al. (2012). Mutant induced pluripotent stem cell lines recapitulate aspects of TDP-43 proteinopathies and reveal cell-specific vulnerability. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *109*, 5803–5808.

Blauw, H.M., van Rheenen, W., Koppers, M., Van Damme, P., Waibel, S., Lemmens, R., van Vught, P.W.J., Meyer, T., Schulte, C., Gasser, T., et al. (2012). NIPA1 polyalanine repeat expansions are associated with amyotrophic lateral sclerosis. Hum. Mol. Genet. *21*, 2497–2502.

Blelloch, R., Venere, M., Yen, J., and Ramalho-Santos, M. (2007). Generation of induced pluripotent stem cells in the absence of drug selection. Cell Stem Cell *1*, 245–247.

Bock, C., Kiskinis, E., Verstappen, G., Gu, H., Boulting, G., Smith, Z.D., Ziller, M., Croft, G.F., Amoroso, M.W., Oakley, D.H., et al. (2011). Reference Maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines. Cell *144*, 439–452.

Boillée, S., Vande Velde, C., and Cleveland, D.W. (2006a). ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. Neuron *52*, 39–59.

Boillée, S., Yamanaka, K., Lobsiger, C.S., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Kassiotis, G., Kollias, G., and Cleveland, D.W. (2006b). Onset and Progression in Inherited ALS Determined by Motor Neurons and Microglia. Science *312*, 1389–1392.

Boulting, G.L., Kiskinis, E., Croft, G.F., Amoroso, M.W., Oakley, D.H., Wainger, B.J., Williams, D.J., Kahler, D.J., Yamaki, M., Davidow, L., et al. (2011). A functionally

characterized test set of human induced pluripotent stem cells. Nat. Biotechnol. *29*, 279–286.

Brambrink, T., Foreman, R., Welstead, G.G., Lengner, C.J., Wernig, M., Suh, H., and Jaenisch, R. (2008). Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. Cell Stem Cell *2*, 151–159.

Braulke, T., and Bonifacino, J.S. (2009). Sorting of lysosomal proteins. Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research *1793*, 605–614.

Brennand, K.J., Simone, A., Jou, J., Gelboin-Burkhart, C., Tran, N., Sangar, S., Li, Y., Mu, Y., Chen, G., Yu, D., et al. (2011). Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. Nature *473*, 221–225.

Bright, N.A., Gratian, M.J., and Luzio, J.P. (2005). Endocytic Delivery to Lysosomes Mediated by Concurrent Fusion and Kissing Events in Living Cells. Current Biology *15*, 360–365.

Brons, I.G.M., Smithers, L.E., Trotter, M.W.B., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Chuva de Sousa Lopes, S.M., Howlett, S.K., Clarkson, A., Ahrlund-Richter, L., Pedersen, R.A., et al. (2007). Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. Nature *448*, 191–195.

Browne, S.E., Yang, L., DiMauro, J.-P., Fuller, S.W., Licata, S.C., and Beal, M.F. (2006). Bioenergetic abnormalities in discrete cerebral motor pathways presage spinal cord pathology in the G93A SOD1 mouse model of ALS. Neurobiol. Dis. *22*, 599–610.

Bruijn, L.I., Houseweart, M.K., Kato, S., Anderson, K.L., Anderson, S.D., Ohama, E., Reaume, A.G., Scott, R.W., and Cleveland, D.W. (1998). Aggregation and motor neuron toxicity of an ALS-linked SOD1 mutant independent from wild-type SOD1. Science *281*, 1851–1854.

Burgess, T.L., and Kelly, R.B. (1987). Constitutive and Regulated Secretion of Proteins. Annual Review of Cell Biology *3*, 243–293.

Byrne, J.A., Pedersen, D.A., Clepper, L.L., Nelson, M., Sanger, W.G., Gokhale, S., Wolf, D.P., and Mitalipov, S.M. (2007). Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. Nature *450*, 497–502.

## C

Cai, H., Lin, X., Xie, C., Laird, F.M., Lai, C., Wen, H., Chiang, H.-C., Shim, H., Farah, M.H., Hoke, A., et al. (2005). Loss of ALS2 function is insufficient to trigger motor neuron degeneration in knock-out mice but predisposes neurons to oxidative stress. J. Neurosci. *25*, 7567–7574.

Cai, H., Reinisch, K., and Ferro-Novick, S. (2007). Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. Dev. Cell *12*, 671–682.

Cai, H., Shim, H., Lai, C., Xie, C., Lin, X., Yang, W.J., and Chandran, J. (2008). ALS2/alsin knockout mice and motor neuron diseases. Neurodegener Dis *5*, 359–366.

Caiazzo, M., Dell'Anno, M.T., Dvoretskova, E., Lazarevic, D., Taverna, S., Leo, D., Sotnikova, T.D., Menegon, A., Roncaglia, P., Colciago, G., et al. (2011). Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. Nature *476*, 224–227.

Carey, B.W., Markoulaki, S., Hanna, J., Saha, K., Gao, Q., Mitalipova, M., and Jaenisch, R. (2009). Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *106*, 157–162.

CARLSSON, A. (1959). The occurrence, distribution and physiological role of catecholamines in the nervous system. Pharmacol. Rev. *11*, 490–493.

Carney, D.S., Davies, B.A., and Horazdovsky, B.F. (2006). Vps9 domain-containing proteins: activators of Rab5 GTPases from yeast to neurons. Trends Cell Biol. *16*, 27–35.

Carr, A.-J., Vugler, A.A., Hikita, S.T., Lawrence, J.M., Gias, C., Chen, L.L., Buchholz, D.E., Ahmado, A., Semo, M., Smart, M.J.K., et al. (2009). Protective Effects of Human iPS-Derived Retinal Pigment Epithelium Cell Transplantation in the Retinal Dystrophic Rat. PLoS ONE *4*, e8152.

Carvajal-Vergara, X., Sevilla, A., D'Souza, S.L., Ang, Y.-S., Schaniel, C., Lee, D.-F., Yang, L., Kaplan, A.D., Adler, E.D., Rozov, R., et al. (2010). Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome. Nature *465*, 808–812.

De Carvalho Bittencourt, M., Herren, S., Graber, P., Vilbois, F., Pasquali, C., Berney, C., Plitz, T., Nicoletti, F., and Kosco-Vilbois, M.H. (2005). Extracellular lysosome-associated membrane protein-1 (LAMP-1) mediates autoimmune disease progression in the NOD model of type 1 diabetes. Eur. J. Immunol. *35*, 1501–1509.

Casal, M.L., and Wolfe, J.H. (2000). Mucopolysaccharidosis Type VII in the Developing Mouse Fetus. Pediatric Research *47*, 750–756.

Chambers, S.M., Fasano, C.A., Papapetrou, E.P., Tomishima, M., Sadelain, M., and Studer, L. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. Nat. Biotechnol. *27*, 275–280.

Chandran, J., Ding, J., and Cai, H. (2007). Alsin and the molecular pathways of amyotrophic lateral sclerosis. Mol. Neurobiol. *36*, 224–231.

Chang, C.-W., Lai, Y.-S., Pawlik, K.M., Liu, K., Sun, C.-W., Li, C., Schoeb, T.R., and Townes, T.M. (2009). Polycistronic lentiviral vector for "hit and run" reprogramming of adult skin fibroblasts to induced pluripotent stem cells. Stem Cells *27*, 1042–1049.

Chang, Y., Kong, Q., Shan, X., Tian, G., Ilieva, H., Cleveland, D.W., Rothstein, J.D., Borchelt, D.R., Wong, P.C., and Lin, C.G. (2008). Messenger RNA Oxidation Occurs

Early in Disease Pathogenesis and Promotes Motor Neuron Degeneration in ALS. PLoS ONE *3*, e2849.

Chen, F., Vitry, S., Hocquemiller, M., Desmaris, N., Ausseil, J., and Heard, J.-M. (2006). alpha-L-Iduronidase transport in neurites. Mol. Genet. Metab. *87*, 349–358.

Cheng, L., Hansen, N.F., Zhao, L., Du, Y., Zou, C., Donovan, F.X., Chou, B.-K., Zhou, G., Li, S., Dowey, S.N., et al. (2012). Low incidence of DNA sequence variation in human induced pluripotent stem cells generated by nonintegrating plasmid expression. Cell Stem Cell *10*, 337–344.

Cheung, A.Y.L., Horvath, L.M., Carrel, L., and Ellis, J. (2012). X-chromosome inactivation in rett syndrome human induced pluripotent stem cells. Front Psychiatry *3*, 24.

Cheung, A.Y.L., Horvath, L.M., Grafodatskaya, D., Pasceri, P., Weksberg, R., Hotta, A., Carrel, L., and Ellis, J. (2011). Isolation of MECP2-null Rett Syndrome patient hiPS cells and isogenic controls through X-chromosome inactivation. Hum. Mol. Genet. *20*, 2103–2115.

Chin, M.H., Mason, M.J., Xie, W., Volinia, S., Singer, M., Peterson, C., Ambartsumyan, G., Aimiuwu, O., Richter, L., Zhang, J., et al. (2009). Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. Cell Stem Cell *5*, 111–123.

Chin, M.H., Pellegrini, M., Plath, K., and Lowry, W.E. (2010). Molecular analyses of human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. Cell Stem Cell *7*, 263–269.

Chow, C.Y., Landers, J.E., Bergren, S.K., Sapp, P.C., Grant, A.E., Jones, J.M., Everett, L., Lenk, G.M., McKenna-Yasek, D.M., Weisman, L.S., et al. (2009). Deleterious variants of FIG4, a phosphoinositide phosphatase, in patients with ALS. Am. J. Hum. Genet. *84*, 85–88.

Clement, A.M., Nguyen, M.D., Roberts, E.A., Garcia, M.L., Boillée, S., Rule, M., McMahon, A.P., Doucette, W., Siwek, D., Ferrante, R.J., et al. (2003). Wild-type nonneuronal cells extend survival of SOD1 mutant motor neurons in ALS mice. Science *302*, 113–117.

Cole, N.B., Smith, C.L., Sciaky, N., Terasaki, M., Edidin, M., and Lippincott-Schwartz, J. (1996). Diffusional mobility of Golgi proteins in membranes of living cells. Science *273*, 797–801.

Coutinho, M.F., Prata, M.J., and Alves, S. (2012). Mannose-6-phosphate pathway: A review on its role in lysosomal function and dysfunction. Molecular Genetics and Metabolism *105*, 542–550.

Cowan, C.A., Atienza, J., Melton, D.A., and Eggan, K. (2005). Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. Science *309*, 1369–1373.

Cox, L.E., Ferraiuolo, L., Goodall, E.F., Heath, P.R., Higginbottom, A., Mortiboys, H., Hollinger, H.C., Hartley, J.A., Brockington, A., Burness, C.E., et al. (2010). Mutations in CHMP2B in Lower Motor Neuron Predominant Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). PLoS One *5*,.

Cressant, A., Desmaris, N., Verot, L., Bréjot, T., Froissart, R., Vanier, M.-T., Maire, I., and Heard, J.M. (2004). Improved behavior and neuropathology in the mouse model of Sanfilippo type IIIB disease after adeno-associated virus-mediated gene transfer in the striatum. J. Neurosci. *24*, 10229–10239.

**D**

Dadon-Nachum, M., Melamed, E., and Offen, D. (2011). The “dying-back” phenomenon of motor neurons in ALS. J. Mol. Neurosci. *43*, 470–477.

Damiano, M., Starkov, A.A., Petri, S., Kipiani, K., Kiaei, M., Mattiazzi, M., Flint Beal, M., and Manfredi, G. (2006). Neural mitochondrial Ca2+ capacity impairment precedes the onset of motor symptoms in G93A Cu/Zn-superoxide dismutase mutant mice. Journal of Neurochemistry *96*, 1349–1361.

Van Damme, P., Dewil, M., Robberecht, W., and Van Den Bosch, L. (2005). Excitotoxicity and amyotrophic lateral sclerosis. Neurodegener Dis *2*, 147–159.

Dasso, M. (2001). Running on Ran: nuclear transport and the mitotic spindle. Cell *104*, 321–324.

DeJesus-Hernandez, M., Mackenzie, I.R., Boeve, B.F., Boxer, A.L., Baker, M., Rutherford, N.J., Nicholson, A.M., Finch, N.A., Flynn, H., Adamson, J., et al. (2011). Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. Neuron *72*, 245–256.

Deng, H.-X., Zhai, H., Fu, R., Shi, Y., Gorrie, G.H., Yang, Y., Liu, E., Dal Canto, M.C., Mugnaini, E., and Siddique, T. (2007). Distal axonopathy in an alsin-deficient mouse model. Hum. Mol. Genet. *16*, 2911–2920.

Devon, R.S., Helm, J.R., Rouleau, G.A., Leitner, Y., Lerman-Sagie, T., Lev, D., and Hayden, M.R. (2003). The first nonsense mutation in alsin results in a homogeneous phenotype of infantile-onset ascending spastic paralysis with bulbar involvement in two siblings. Clin. Genet. *64*, 210–215.

Devon, R.S., Orban, P.C., Gerrow, K., Barbieri, M.A., Schwab, C., Cao, L.P., Helm, J.R., Bissada, N., Cruz-Aguado, R., Davidson, T.-L., et al. (2006). Als2-deficient mice exhibit disturbances in endosome trafficking associated with motor behavioral abnormalities. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *103*, 9595–9600.

Devon, R.S., Schwab, C., Topp, J.D., Orban, P.C., Yang, Y.-Z., Pape, T.D., Helm, J.R., Davidson, T.-L., Rogers, D.A., Gros-Louis, F., et al. (2005). Cross-species characterization of the ALS2 gene and analysis of its pattern of expression in development and adulthood. Neurobiol. Dis. *18*, 243–257.

Diao, A., Frost, L., Morohashi, Y., and Lowe, M. (2008). Coordination of golgin tethering and SNARE assembly: GM130 binds syntaxin 5 in a p115-regulated manner. J. Biol. Chem. *283*, 6957–6967.

Diao, A., Rahman, D., Pappin, D.J.C., Lucocq, J., and Lowe, M. (2003). The coiled-coil membrane protein golgin-84 is a novel rab effector required for Golgi ribbon formation. J. Cell Biol. *160*, 201–212.

Diekstra, F.P., Saris, C.G.J., van Rheenen, W., Franke, L., Jansen, R.C., van Es, M.A., van Vught, P.W.J., Blauw, H.M., Groen, E.J.N., Horvath, S., et al. (2012). Mapping of Gene Expression Reveals CYP27A1 as a Susceptibility Gene for Sporadic ALS. PLoS ONE *7*, e35333.

Dimos, J.T., Rodolfa, K.T., Niakan, K.K., Weisenthal, L.M., Mitsumoto, H., Chung, W., Croft, G.F., Saphier, G., Leibel, R., Goland, R., et al. (2008). Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. Science *321*, 1218–1221.

Duan, W., Li, X., Shi, J., Guo, Y., Li, Z., and Li, C. (2010). Mutant TAR DNA-binding protein-43 induces oxidative injury in motor neuron-like cell. Neuroscience *169*, 1621–1629.

Duckett, S., and Torre, J.C.D.L. (2001). Pathology of the Aging Human Nervous System (Oxford University Press).

De Duve, C., Pressman B., C., Gianetto, R., Wattiaux, R., and Appelmans, F. (1955). Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. Biochemical Journa 604–617.

**E**

Ebert, A.D., Yu, J., Rose, F.F., Jr, Mattis, V.B., Lorson, C.L., Thomson, J.A., and Svendsen, C.N. (2009). Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. Nature *457*, 277–280.

Efimov, A., Kharitonov, A., Efimova, N., Loncarek, J., Miller, P.M., Andreyeva, N., Gleeson, P., Galjart, N., Maia, A.R.R., McLeod, I.X., et al. (2007). Asymmetric CLASP-dependent nucleation of noncentrosomal microtubules at the trans-Golgi network. Dev. Cell *12*, 917–930.

Egawa, N., Kitaoka, S., Tsukita, K., Naitoh, M., Takahashi, K., Yamamoto, T., Adachi, F., Kondo, T., Okita, K., Asaka, I., et al. (2012). Drug Screening for ALS Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. Sci Transl Med *4*, 145ra104.

Ellinwood, N.M., Ausseil, J., Desmaris, N., Bigou, S., Liu, S., Jens, J.K., Snella, E.M., Mohammed, E.E.A., Thomson, C.B., Raoul, S., et al. (2011). Safe, efficient, and reproducible gene therapy of the brain in the dog models of Sanfilippo and Hurler syndromes. Mol. Ther. *19*, 251–259.

Ellinwood, N.M., Wang, P., Skeen, T., Sharp, N.J.H., Cesta, M., Decker, S., Edwards, N.J., Bublot, I., Thompson, J.N., Bush, W., et al. (2003). A model of

mucopolysaccharidosis IIIB (Sanfilippo syndrome type IIIB): N-acetyl-alpha-D-glucosaminidase deficiency in Schipperke dogs. J. Inherit. Metab. Dis. *26*, 489–504.

Etienne-Manneville, S. (2006). In vitro assay of primary astrocyte migration as a tool to study Rho GTPase function in cell polarization. Meth. Enzymol. *406*, 565–578.

Etienne-Manneville, S. (2010). From signaling pathways to microtubule dynamics: the key players. Curr. Opin. Cell Biol. *22*, 104–111.

Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature *292*, 154–156.

Eymard-Pierre, E., Lesca, G., Dollet, S., Santorelli, F.M., di Capua, M., Bertini, E., and Boespflug-Tanguy, O. (2002). Infantile-onset ascending hereditary spastic paralysis is associated with mutations in the alsin gene. Am. J. Hum. Genet. *71*, 518–527.

Eymard-Pierre, E., Yamanaka, K., Haeussler, M., Kress, W., Gauthier-Barichard, F., Combes, P., Cleveland, D.W., and Boespflug-Tanguy, O. (2006). Novel missense mutation in ALS2 gene results in infantile ascending hereditary spastic paralysis. Ann. Neurol. *59*, 976–980.

**F**

Farhan, H., and Rabouille, C. (2011). Signalling to and from the secretory pathway. J Cell Sci *124*, 171–180.

Farquhar, M.G. (1985). Progress in unraveling pathways of Golgi traffic. Annu. Rev. Cell Biol. *1*, 447–488.

Farquhar, M.G., and Palade, G.E. (1981). The Golgi apparatus (complex)-(1954-1981)-from artifact to center stage. J. Cell Biol. *91*, 77s–103s.

Farquhar, M.G., and Palade, G.E. (1998). The Golgi apparatus: 100 years of progress and controversy. Trends in Cell Biology *8*, 2–10.

Faye, C., Moreau, C., Chautard, E., Jetne, R., Fukai, N., Ruggiero, F., Humphries, M.J., Olsen, B.R., and Ricard-Blum, S. (2009). Molecular interplay between endostatin, integrins, and heparan sulfate. J. Biol. Chem. *284*, 22029–22040.

Fehrenbacher, N., and Jäättelä, M. (2005). Lysosomes as targets for cancer therapy. Cancer Res. *65*, 2993–2995.

Feng, Q., Lu, S.-J., Klimanskaya, I., Gomes, I., Kim, D., Chung, Y., Honig, G.R., Kim, K.-S., and Lanza, R. (2010). Hemangioblastic derivatives from human induced pluripotent stem cells exhibit limited expansion and early senescence. Stem Cells *28*, 704–712.

Ferraiuolo, L., Kirby, J., Grierson, A.J., Sendtner, M., and Shaw, P.J. (2011). Molecular pathways of motor neuron injury in amyotrophic lateral sclerosis. Nat Rev Neurol *7*, 616–630.

Friedl, P., and Wolf, K. (2009). Proteolytic interstitial cell migration: a five-step process. Cancer Metastasis Rev. *28*, 129–135.

Friel, R., van der Sar, S., and Mee, P.J. (2005). Embryonic stem cells: understanding their history, cell biology and signalling. Adv. Drug Deliv. Rev. *57*, 1894–1903.

Fu, H., Samulski, R.J., McCown, T.J., Picornell, Y.J., Fletcher, D., and Muenzer, J. (2002). Neurological correction of lysosomal storage in a mucopolysaccharidosis IIIB mouse model by adeno-associated virus-mediated gene delivery. Mol. Ther. *5*, 42–49.

Fujimoto, Y., Abematsu, M., Falk, A., Tsujimura, K., Sanosaka, T., Juliandi, B., Semi, K., Namihira, M., Komiya, S., Smith, A., et al. (2012). Treatment of a Mouse Model of Spinal Cord Injury by Transplantation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Long-Term Self-Renewing Neuroepithelial-Like Stem Cells. STEM CELLS *30*, 1163–1173.

Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., and Hasegawa, M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. Proc. Jpn. Acad., Ser. B, Phys. Biol. Sci. *85*, 348–362.

**G**

Gautier, C.A., Giaime, E., Caballero, E., Núñez, L., Song, Z., Chan, D., Villalobos, C., and Shen, J. (2012). Regulation of mitochondrial permeability transition pore by PINK1. Molecular Neurodegeneration *7*, 22.

Ghashghaei, H.T., Lai, C., and Anton, E.S. (2007). Neuronal migration in the adult brain: are we there yet? Nature Reviews Neuroscience *8*, 141–151.

Ghodsizadeh, A., Taei, A., Totonchi, M., Seifinejad, A., Gourabi, H., Pournasr, B., Aghdami, N., Malekzadeh, R., Almadani, N., Salekdeh, G.H., et al. (2010). Generation of liver disease-specific induced pluripotent stem cells along with efficient differentiation to functional hepatocyte-like cells. Stem Cell Rev *6*, 622–632.

Di Giorgio, F.P., Boulting, G.L., Bobrowicz, S., and Eggan, K.C. (2008). Human Embryonic Stem Cell-Derived Motor Neurons Are Sensitive to the Toxic Effect of Glial Cells Carrying an ALS-Causing Mutation. Cell Stem Cell *3*, 637–648.

Giorgio, F.P.D., Carrasco, M.A., Siao, M.C., Maniatis, T., and Eggan, K. (2007). Non–cell autonomous effect of glia on motor neurons in an embryonic stem cell–based ALS model. Nature Neuroscience *10*, 608–614.

Glick, B.S., Elston, T., and Oster, G. (1997). A cisternal maturation mechanism can explain the asymmetry of the Golgi stack. FEBS Lett. *414*, 177–181.

Glick, B.S., and Luini, A. (2011). Models for Golgi Traffic: A Critical Assessment. Cold Spring Harb Perspect Biol *3*,.

Gomes, C., Escrevente, C., and Costa, J. (2010). Mutant superoxide dismutase 1 overexpression in NSC-34 cells: Effect of trehalose on aggregation, TDP-43 localization and levels of co-expressed glycoproteins. Neuroscience Letters *475*, 145–149.

Gonatas, N.K., Stieber, A., and Gonatas, J.O. (2006). Fragmentation of the Golgi apparatus in neurodegenerative diseases and cell death. J. Neurol. Sci. *246*, 21–30.

Gonatas, N.K., Stieber, A., Mourelatos, Z., Chen, Y., Gonatas, J.O., Appel, S.H., Hays, A.P., Hickey, W.F., and Hauw, J.J. (1992). Fragmentation of the Golgi apparatus of motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. Am J Pathol *140*, 731–737.

Gong, Y.H., Parsadanian, A.S., Andreeva, A., Snider, W.D., and Elliott, J.L. (2000). Restricted expression of G86R Cu/Zn superoxide dismutase in astrocytes results in astrocytosis but does not cause motoneuron degeneration. J. Neurosci. *20*, 660–665.

Gonzalez, F., Barragan Monasterio, M., Tiscornia, G., Montserrat Pulido, N., Vassena, R., Batlle Morera, L., Rodriguez Piza, I., and Izpisua Belmonte, J.C. (2009). Generation of mouse-induced pluripotent stem cells by transient expression of a single nonviral polycistronic vector. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *106*, 8918–8922.

González, F., Boué, S., and Izpisúa Belmonte, J.C. (2011). Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming à la carte. Nat. Rev. Genet. *12*, 231–242.

Gore, A., Li, Z., Fung, H.-L., Young, J.E., Agarwal, S., Antosiewicz-Bourget, J., Canto, I., Giorgetti, A., Israel, M.A., Kiskinis, E., et al. (2011). Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. Nature *471*, 63–67.

Greenwood, R.S., Hillman, R.E., Alcala, H., and Sly, W.S. (1978). Sanfilippo A syndrome in the fetus. Clin. Genet. *13*, 241–250.

Gros-Louis, F., Kriz, J., Kabashi, E., McDearmid, J., Millecamps, S., Urushitani, M., Lin, L., Dion, P., Zhu, Q., Drapeau, P., et al. (2008). Als2 mRNA splicing variants detected in KO mice rescue severe motor dysfunction phenotype in Als2 knock-down zebrafish. Hum. Mol. Genet. *17*, 2691–2702.

Gros-Louis, F., Meijer, I.A., Hand, C.K., Dubé, M.-P., MacGregor, D.L., Seni, M.-H., Devon, R.S., Hayden, M.R., Andermann, F., Andermann, E., et al. (2003). An ALS2 gene mutation causes hereditary spastic paraplegia in a Pakistani kindred. Ann. Neurol. *53*, 144–145.

Grskovic, M., Javaherian, A., Strulovici, B., and Daley, G.Q. (2011a). Induced pluripotent stem cells - opportunities for disease modelling and drug discovery. Nat Rev Drug Discov *10*, 915–929.

Grskovic, M., Javaherian, A., Strulovici, B., and Daley, G.Q. (2011b). Induced pluripotent stem cells--opportunities for disease modelling and drug discovery. Nat Rev Drug Discov *10*, 915–929.

Guenther, M.G., Frampton, G.M., Soldner, F., Hockemeyer, D., Mitalipova, M., Jaenisch, R., and Young, R.A. (2010). Chromatin structure and gene expression programs of human embryonic and induced pluripotent stem cells. Cell Stem Cell *7*, 249–257.

Gurney, M.E., Pu, H., Chiu, A.Y., Dal Canto, M.C., Polchow, C.Y., Alexander, D.D., Caliendo, J., Hentati, A., Kwon, Y.W., and Deng, H.X. (1994). Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. Science *264*, 1772–1775.

**H**

Hadano, S., Benn, S.C., Kakuta, S., Otomo, A., Sudo, K., Kunita, R., Suzuki-Utsunomiya, K., Mizumura, H., Shefner, J.M., Cox, G.A., et al. (2006). Mice deficient in the Rab5 guanine nucleotide exchange factor ALS2/alsin exhibit age-dependent neurological deficits and altered endosome trafficking. Hum. Mol. Genet. *15*, 233–250.

Hadano, S., Hand, C.K., Osuga, H., Yanagisawa, Y., Otomo, A., Devon, R.S., Miyamoto, N., Showguchi-Miyata, J., Okada, Y., Singaraja, R., et al. (2001). A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. Nat. Genet. *29*, 166–173.

Hadano, S., Kunita, R., Otomo, A., Suzuki-Utsunomiya, K., and Ikeda, J.-E. (2007). Molecular and cellular function of ALS2/alsin: implication of membrane dynamics in neuronal development and degeneration. Neurochem. Int. *51*, 74–84.

Hadano, S., Otomo, A., Suzuki-Utsunomiya, K., Kunita, R., Yanagisawa, Y., Showguchi-Miyata, J., Mizumura, H., and Ikeda, J.-E. (2004). ALS2CL, the novel protein highly homologous to the carboxy-terminal half of ALS2, binds to Rab5 and modulates endosome dynamics. FEBS Lett. *575*, 64–70.

Hadfield, M.G., Ghatak, N.R., Nakoneczna, I., Lippman, H.R., Myer, E.C., Constantopoulos, G., and Bradley, R.M. (1980). Pathologic findings in mucopolysaccharidosis type IIIB (Sanfilippo's sydnrome B). Arch. Neurol. *37*, 645–650.

Hamano, K., Hayashi, M., Shioda, K., Fukatsu, R., and Mizutani, S. (2008). Mechanisms of neurodegeneration in mucopolysaccharidoses II and IIIB: analysis of human brain tissue. Acta Neuropathol. *115*, 547–559.

Hanna, J., Cheng, A.W., Saha, K., Kim, J., Lengner, C.J., Soldner, F., Cassady, J.P., Muffat, J., Carey, B.W., and Jaenisch, R. (2010). Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *107*, 9222–9227.

Hanna, J., Saha, K., Pando, B., van Zon, J., Lengner, C.J., Creyghton, M.P., van Oudenaarden, A., and Jaenisch, R. (2009). Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. Nature *462*, 595–601.

Hargus, G., Cooper, O., Deleidi, M., Levy, A., Lee, K., Marlow, E., Yow, A., Soldner, F., Hockemeyer, D., Hallett, P.J., et al. (2010). Differentiated Parkinson patient-derived induced pluripotent stem cells grow in the adult rodent brain and reduce motor asymmetry in Parkinsonian rats. PNAS *107*, 15921–15926.

Hayashi, K., Ohshima, T., and Mikoshiba, K. (2002). Pak1 is involved in dendrite initiation as a downstream effector of Rac1 in cortical neurons. Mol. Cell. Neurosci. *20*, 579–594.

Hedlund, E., and Isacson, O. (2008). ALS model glia can mediate toxicity to motor neurons derived from human embryonic stem cells. Cell Stem Cell *3*, 575–576.

Helenius, A., Mellman, I., Wall, D., and Hubbard, A. (1983). Endosomes. Trends in Biochemical Sciences *8*, 245–250.

Heng, J.-C.D., Feng, B., Han, J., Jiang, J., Kraus, P., Ng, J.-H., Orlov, Y.L., Huss, M., Yang, L., Lufkin, T., et al. (2010). The nuclear receptor Nr5a2 can replace Oct4 in the reprogramming of murine somatic cells to pluripotent cells. Cell Stem Cell *6*, 167–174.

Heo, H.Y., Kim, K.-S., and Seol, W. (2010). Coordinate Regulation of Neurite Outgrowth by LRRK2 and Its Interactor, Rab5. Experimental Neurobiology *19*, 97.

Héron, B., Mikaeloff, Y., Froissart, R., Caridade, G., Maire, I., Caillaud, C., Levade, T., Chabrol, B., Feillet, F., Ogier, H., et al. (2011). Incidence and natural history of mucopolysaccharidosis type III in France and comparison with United Kingdom and Greece. American Journal of Medical Genetics Part A *155*, 58–68.

Hirai, H., Firpo, M., and Kikyo, N. (2012). Establishment of LIF-Dependent Human iPS Cells Closely Related to Basic FGF-Dependent Authentic iPS Cells. PLoS ONE *7*, e39022.

Ho, J.C.Y., Zhou, T., Lai, W.-H., Huang, Y., Chan, Y.-C., Li, X., Wong, N.L.Y., Li, Y., Au, K.-W., Guo, D., et al. (2011a). Generation of induced pluripotent stem cell lines from 3 distinct laminopathies bearing heterogeneous mutations in lamin A/C. Aging (Albany NY) *3*, 380–390.

Ho, R., Chronis, C., and Plath, K. (2011b). Mechanistic insights into reprogramming to induced pluripotency. J. Cell. Physiol. *226*, 868–878.

Hocquemiller, M., Vitry, S., Bigou, S., Bruyère, J., Ausseil, J., and Heard, J.M. (2010). GAP43 overexpression and enhanced neurite outgrowth in mucopolysaccharidosis type IIIB cortical neuron cultures. J. Neurosci. Res. *88*, 202–213.

Hotta, A., Cheung, A.Y.L., Farra, N., Vijayaragavan, K., Séguin, C.A., Draper, J.S., Pasceri, P., Maksakova, I.A., Mager, D.L., Rossant, J., et al. (2009). Isolation of human iPS cells using EOS lentiviral vectors to select for pluripotency. Nat. Methods *6*, 370–376.

Howden, S.E., Gore, A., Li, Z., Fung, H.-L., Nisler, B.S., Nie, J., Chen, G., McIntosh, B.E., Gulbranson, D.R., Diol, N.R., et al. (2011). Genetic correction and analysis of

induced pluripotent stem cells from a patient with gyrate atrophy. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *108*, 6537–6542.

Hu, B.-Y., Weick, J.P., Yu, J., Ma, L.-X., Zhang, X.-Q., Thomson, J.A., and Zhang, S.-C. (2010). Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *107*, 4335–4340.

Hu, B.-Y., and Zhang, S.-C. (2009). Differentiation of spinal motor neurons from pluripotent human stem cells. Nat Protoc *4*, 1295–1304.

Huang, J., Chen, T., Liu, X., Jiang, J., Li, J., Li, D., Liu, X.S., Li, W., Kang, J., and Pei, G. (2009). More synergetic cooperation of Yamanaka factors in induced pluripotent stem cells than in embryonic stem cells. Cell Res. *19*, 1127–1138.

Huotari, J., and Helenius, A. (2011). Endosome maturation. EMBO J. *30*, 3481–3500.

Hussein, S.M., Batada, N.N., Vuoristo, S., Ching, R.W., Autio, R., Närvä, E., Ng, S., Sourour, M., Hämäläinen, R., Olsson, C., et al. (2011). Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. Nature *471*, 58–62.

Huttenlocher, A., and Horwitz, A.R. (2011). Integrins in cell migration. Cold Spring Harb Perspect Biol *3*, a005074.

**I**

Ichida, J.K., Blanchard, J., Lam, K., Son, E.Y., Chung, J.E., Egli, D., Loh, K.M., Carter, A.C., Di Giorgio, F.P., Koszka, K., et al. (2009). A small-molecule inhibitor of tgf-Beta signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing nanog. Cell Stem Cell *5*, 491–503.

Israel, M.A., Yuan, S.H., Bardy, C., Reyna, S.M., Mu, Y., Herrera, C., Hefferan, M.P., Van Gorp, S., Nazor, K.L., Boscolo, F.S., et al. (2012). Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. Nature *482*, 216–220.

Itoh, M., Kiuru, M., Cairo, M.S., and Christiano, A.M. (2011). Generation of keratinocytes from normal and recessive dystrophic epidermolysis bullosa-induced pluripotent stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *108*, 8797–8802.

Itzhaki, I., Maizels, L., Huber, I., Zwi-Dantsis, L., Caspi, O., Winterstern, A., Feldman, O., Gepstein, A., Arbel, G., Hammerman, H., et al. (2011). Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. Nature *471*, 225–229.

**J**

Jaarsma, D., Teuling, E., Haasdijk, E.D., Zeeuw, C.I.D., and Hoogenraad, C.C. (2008). Neuron-Specific Expression of Mutant Superoxide Dismutase Is Sufficient to Induce Amyotrophic Lateral Sclerosis in Transgenic Mice. J. Neurosci. *28*, 2075–2088.

Jacquier, A., Bellouze, S., Blanchard, S., Bohl, D., and Haase, G. (2009). Astrocytic protection of spinal motor neurons but not cortical neurons against loss of Als2/alsin function. Hum. Mol. Genet. *18*, 2127–2139.

Jacquier, A., Buhler, E., Schäfer, M.K.E., Bohl, D., Blanchard, S., Beclin, C., and Haase, G. (2006). Alsin/Rac1 signaling controls survival and growth of spinal motoneurons. Ann. Neurol. *60*, 105–117.

Jaenisch, R., and Young, R. (2008). Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. Cell *132*, 567–582.

Jang, J., Kang, H.-C., Kim, H.-S., Kim, J.Y., Huh, Y.J., Kim, D.-S., Yoo, J.-E., Lee, J.-A., Lim, B., Lee, J., et al. (2011). Induced pluripotent stem cell models from X-linked adrenoleukodystrophy patients. Ann. Neurol. *70*, 402–409.

Jin, Z.-B., Okamoto, S., Osakada, F., Homma, K., Assawachananont, J., Hirami, Y., Iwata, T., and Takahashi, M. (2011). Modeling retinal degeneration using patient-specific induced pluripotent stem cells. PLoS ONE *6*, e17084.

Johnson, J.O., Mandrioli, J., Benatar, M., Abramzon, Y., Van Deerlin, V.M., Trojanowski, J.Q., Gibbs, J.R., Brunetti, M., Gronka, S., Wuu, J., et al. (2010). Exome sequencing reveals VCP mutations as a cause of familial ALS. Neuron *68*, 857–864.

Jones, M.Z., Alroy, J., Downs-Kelly, E., Lucas, R.E., Kraemer, S.A., Cavanagh, K.T., King, B., and Hopwood, J.J. (2004). Caprine mucopolysaccharidosis IIID: fetal and neonatal brain and liver glycosaminoglycan and morphological perturbations. J. Mol. Neurosci. *24*, 277–291.

Jovic, M., Sharma, M., Rahajeng, J., and Caplan, S. (2010). The early endosome: a busy sorting station for proteins at the crossroads. Histol. Histopathol. *25*, 99–112.

**K**

Kabashi, E., Lin, L., Tradewell, M.L., Dion, P.A., Bercier, V., Bourgouin, P., Rochefort, D., Bel Hadj, S., Durham, H.D., Vande Velde, C., et al. (2010). Gain and loss of function of ALS-related mutations of TARDBP (TDP-43) cause motor deficits in vivo. Hum. Mol. Genet. *19*, 671–683.

Kaji, K., Norrby, K., Paca, A., Mileikovsky, M., Mohseni, P., and Woltjen, K. (2009). Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. Nature *458*, 771–775.

Kanekura, K., Hashimoto, Y., Kita, Y., Sasabe, J., Aiso, S., Nishimoto, I., and Matsuoka, M. (2005). A Rac1/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt3 anti-apoptotic pathway, triggered by AlsinLF, the product of the ALS2 gene, antagonizes Cu/Zn-superoxide dismutase (SOD1) mutant-induced motoneuronal cell death. J. Biol. Chem. *280*, 4532–4543.

Kato, S. (2007). Amyotrophic lateral sclerosis models and human neuropathology: similarities and differences. Acta Neuropathologica *115*, 97–114.

Kazuki, Y., Hiratsuka, M., Takiguchi, M., Osaki, M., Kajitani, N., Hoshiya, H., Hiramatsu, K., Yoshino, T., Kazuki, K., Ishihara, C., et al. (2010). Complete genetic correction of ips cells from Duchenne muscular dystrophy. Mol. Ther. *18*, 386–393.

Kieran, D., Hafezparast, M., Bohnert, S., Dick, J.R.T., Martin, J., Schiavo, G., Fisher, E.M.C., and Greensmith, L. (2005). A mutation in dynein rescues axonal transport defects and extends the life span of ALS mice. J. Cell Biol. *169*, 561–567.

Kim, D., Kim, C.-H., Moon, J.-I., Chung, Y.-G., Chang, M.-Y., Han, B.-S., Ko, S., Yang, E., Cha, K.Y., Lanza, R., et al. (2009a). Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. Cell Stem Cell *4*, 472–476.

Kim, D.H., Jeon, Y., Anguera, M.C., and Lee, J.T. (2011). X-chromosome epigenetic reprogramming in pluripotent stem cells via noncoding genes. Semin. Cell Dev. Biol. *22*, 336–342.

Kim, D.-S., Lee, J.S., Leem, J.W., Huh, Y.J., Kim, J.Y., Kim, H.-S., Park, I.-H., Daley, G.Q., Hwang, D.-Y., and Kim, D.-W. (2010a). Robust enhancement of neural differentiation from human ES and iPS cells regardless of their innate difference in differentiation propensity. Stem Cell Rev *6*, 270–281.

Kim, J.B., Greber, B., Araúzo-Bravo, M.J., Meyer, J., Park, K.I., Zaehres, H., and Schöler, H.R. (2009b). Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. Nature *461*, 649–643.

Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., Kim, J., Aryee, M.J., Ji, H., Ehrlich, L.I.R., et al. (2010b). Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. Nature *467*, 285–290.

Kiskinis, E., and Eggan, K. (2010). Progress toward the clinical application of patient-specific pluripotent stem cells. J. Clin. Invest. *120*, 51–59.

Koch, P., Opitz, T., Steinbeck, J.A., Ladewig, J., and Brüstle, O. (2009). A rosette-type, self-renewing human ES cell-derived neural stem cell with potential for in vitro instruction and synaptic integration. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *106*, 3225–3230.

Kodani, A., Kristensen, I., Huang, L., and Sütterlin, C. (2009). GM130-dependent control of Cdc42 activity at the Golgi regulates centrosome organization. Mol. Biol. Cell *20*, 1192–1200.

Kodani, A., and Sütterlin, C. (2009). A new function for an old organelle: microtubule nucleation at the Golgi apparatus. EMBO J. *28*, 995–996.

Koestenbauer, S., Zech, N.H., Juch, H., Vanderzwalmen, P., Schoonjans, L., and Dohr, G. (2006). Embryonic stem cells: similarities and differences between human and murine embryonic stem cells. Am. J. Reprod. Immunol. *55*, 169–180.

Kress, J.A., Kühnlein, P., Winter, P., Ludolph, A.C., Kassubek, J., Müller, U., and Sperfeld, A.-D. (2005). Novel mutation in the ALS2 gene in juvenile amyotrophic lateral sclerosis. Ann. Neurol. *58*, 800–803.

Kunita, R., Otomo, A., Mizumura, H., Suzuki, K., Showguchi-Miyata, J., Yanagisawa, Y., Hadano, S., and Ikeda, J.-E. (2004). Homo-oligomerization of ALS2 through its unique carboxyl-terminal regions is essential for the ALS2-associated Rab5 guanine nucleotide exchange activity and its regulatory function on endosome trafficking. J. Biol. Chem. *279*, 38626–38635.

Kunita, R., Otomo, A., Mizumura, H., Suzuki-Utsunomiya, K., Hadano, S., and Ikeda, J.-E. (2007). The Rab5 activator ALS2/alsin acts as a novel Rac1 effector through Rac1-activated endocytosis. J. Biol. Chem. *282*, 16599–16611.

Kwak, S., and Weiss, J.H. (2006). Calcium-permeable AMPA channels in neurodegenerative disease and ischemia. Curr. Opin. Neurobiol. *16*, 281–287.

**L**

Lai, C., Xie, C., McCormack, S.G., Chiang, H.-C., Michalak, M.K., Lin, X., Chandran, J., Shim, H., Shimoji, M., Cookson, M.R., et al. (2006). Amyotrophic lateral sclerosis 2-deficiency leads to neuronal degeneration in amyotrophic lateral sclerosis through altered AMPA receptor trafficking. J. Neurosci. *26*, 11798–11806.

Lamba, D.A., McUsic, A., Hirata, R.K., Wang, P.-R., Russell, D., and Reh, T.A. (2010). Generation, purification and transplantation of photoreceptors derived from human induced pluripotent stem cells. PLoS ONE *5*, e8763.

Lapasset, L., Milhavet, O., Prieur, A., Besnard, E., Babled, A., Aït-Hamou, N., Leschik, J., Pellestor, F., Ramirez, J.-M., Vos, J.D., et al. (2011). Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state. Genes Dev. *25*, 2248–2253.

Laurent, L.C., Ulitsky, I., Slavin, I., Tran, H., Schork, A., Morey, R., Lynch, C., Harness, J.V., Lee, S., Barrero, M.J., et al. (2011). Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. Cell Stem Cell *8*, 106–118.

Lee, G., Papapetrou, E.P., Kim, H., Chambers, S.M., Tomishima, M.J., Fasano, C.A., Ganat, Y.M., Menon, J., Shimizu, F., Viale, A., et al. (2009). Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. Nature *461*, 402–406.

Legate, K.R., Wickström, S.A., and Fässler, R. (2009). Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. Genes Dev. *23*, 397–418.

Lemonnier, T., Blanchard, S., Toli, D., Roy, E., Bigou, S., Froissart, R., Rouvet, I., Vitry, S., Heard, J.M., and Bohl, D. (2011). Modeling neuronal defects associated with a lysosomal disorder using patient-derived induced pluripotent stem cells. Hum. Mol. Genet. *20*, 3653–3666.

Lesca, G., Eymard-Pierre, E., Santorelli, F.M., Cusmai, R., Di Capua, M., Valente, E.M., Attia-Sobol, J., Plauchu, H., Leuzzi, V., Ponzone, A., et al. (2003). Infantile ascending hereditary spastic paralysis (IAHSP): clinical features in 11 families. Neurology *60*, 674–682.

Li, H.H., Yu, W.H., Rozengurt, N., Zhao, H.Z., Lyons, K.M., Anagnostaras, S., Fanselow, M.S., Suzuki, K., Vanier, M.T., and Neufeld, E.F. (1999). Mouse model of Sanfilippo syndrome type B produced by targeted disruption of the gene encoding alpha-N-acetylglucosaminidase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *96*, 14505–14510.

Li, H.H., Zhao, H.-Z., Neufeld, E.F., Cai, Y., and Gómez-Pinilla, F. (2002). Attenuated plasticity in neurons and astrocytes in the mouse model of Sanfilippo syndrome type B. J. Neurosci. Res. *69*, 30–38.

Li, R., Liang, J., Ni, S., Zhou, T., Qing, X., Li, H., He, W., Chen, J., Li, F., Zhuang, Q., et al. (2010a). A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. Cell Stem Cell *7*, 51–63.

Li, Y., Ray, P., Rao, E.J., Shi, C., Guo, W., Chen, X., Woodruff, E.A., Fushimi, K., and Wu, J.Y. (2010b). A Drosophila model for TDP-43 proteinopathy. PNAS *107*, 3169–3174.

Li, Z., Aelst, L.V., and Cline, H.T. (2000). Rho GTPases regulate distinct aspects of dendritic arbor growth in Xenopus central neurons in vivo. Nature Neuroscience *3*, 217–225.

Liao, J., Wu, Z., Wang, Y., Cheng, L., Cui, C., Gao, Y., Chen, T., Rao, L., Chen, S., Jia, N., et al. (2008). Enhanced efficiency of generating induced pluripotent stem (iPS) cells from human somatic cells by a combination of six transcription factors. Cell Res. *18*, 600–603.

Lino, M.M., Schneider, C., and Caroni, P. (2002). Accumulation of SOD1 mutants in postnatal motoneurons does not cause motoneuron pathology or motoneuron disease. J. Neurosci. *22*, 4825–4832.

Lister, R., Pelizzola, M., Kida, Y.S., Hawkins, R.D., Nery, J.R., Hon, G., Antosiewicz-Bourget, J., O'Malley, R., Castanon, R., Klugman, S., et al. (2011). Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. Nature *471*, 68–73.

Liu, D., Wen, J., Liu, J., and Li, L. (1999). The roles of free radicals in amyotrophic lateral sclerosis: reactive oxygen species and elevated oxidation of protein, DNA, and membrane phospholipids. FASEB J. *13*, 2318–2328.

Liu, G.-H., Barkho, B.Z., Ruiz, S., Diep, D., Qu, J., Yang, S.-L., Panopoulos, A.D., Suzuki, K., Kurian, L., Walsh, C., et al. (2011a). Recapitulation of premature ageing with iPSCs from Hutchinson-Gilford progeria syndrome. Nature *472*, 221–225.

Liu, G.-H., Suzuki, K., Qu, J., Sancho-Martinez, I., Yi, F., Li, M., Kumar, S., Nivet, E., Kim, J., Soligalla, R.D., et al. (2011b). Targeted gene correction of laminopathy-associated LMNA mutations in patient-specific iPSCs. Cell Stem Cell *8*, 688–694.

Liu, J., Lamb, D., Chou, M.M., Liu, Y.-J., and Li, G. (2007). Nerve Growth Factor-mediated Neurite Outgrowth via Regulation of Rab5. Mol. Biol. Cell *18*, 1375–1384.

Lowe, M., Gonatas, N.K., and Warren, G. (2000). The mitotic phosphorylation cycle of the cis-Golgi matrix protein GM130. J. Cell Biol. *149*, 341–356.

Lujan, E., Chanda, S., Ahlenius, H., Südhof, T.C., and Wernig, M. (2012). Direct conversion of mouse fibroblasts to self-renewing, tripotent neural precursor cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *109*, 2527–2532.

Luzio, J.P., Pryor, P.R., and Bright, N.A. (2007). Lysosomes: fusion and function. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *8*, 622–632.

Lyssiotis, C.A., Foreman, R.K., Staerk, J., Garcia, M., Mathur, D., Markoulaki, S., Hanna, J., Lairson, L.L., Charette, B.D., Bouchez, L.C., et al. (2009). Reprogramming of murine fibroblasts to induced pluripotent stem cells with chemical complementation of Klf4. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *106*, 8912–8917.

**M**

Mackenzie, I.R., Rademakers, R., and Neumann, M. (2010). TDP-43 and FUS in amyotrophic lateral sclerosis and frontotemporal dementia. The Lancet Neurology *9*, 995–1007.

Maehr, R., Chen, S., Snitow, M., Ludwig, T., Yagasaki, L., Goland, R., Leibel, R.L., and Melton, D.A. (2009). Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *106*, 15768–15773.

Maherali, N., Ahfeldt, T., Rigamonti, A., Utikal, J., Cowan, C., and Hochedlinger, K. (2008). A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. Cell Stem Cell *3*, 340–345.

Maherali, N., Sridharan, R., Xie, W., Utikal, J., Eminli, S., Arnold, K., Stadtfeld, M., Yachechko, R., Tchieu, J., Jaenisch, R., et al. (2007a). Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. Cell Stem Cell *1*, 55–70.

Maherali, N., Sridharan, R., Xie, W., Utikal, J., Eminli, S., Arnold, K., Stadtfeld, M., Yachechko, R., Tchieu, J., Jaenisch, R., et al. (2007b). Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. Cell Stem Cell *1*, 55–70.

Manzano, R., Toivonen, J.M., Calvo, A.C., Oliván, S., Zaragoza, P., Rodellar, C., Montarras, D., and Osta, R. (2012). Altered in vitro Proliferation of Mouse SOD1-G93A Skeletal Muscle Satellite Cells. Neurodegenerative Diseases.

Marchetto, M.C.N., Carromeu, C., Acab, A., Yu, D., Yeo, G.W., Mu, Y., Chen, G., Gage, F.H., and Muotri, A.R. (2010). A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. Cell *143*, 527–539.

Marchetto, M.C.N., Muotri, A.R., Mu, Y., Smith, A.M., Cezar, G.G., and Gage, F.H. (2008). Non-cell-autonomous effect of human SOD1 G37R astrocytes on motor neurons derived from human embryonic stem cells. Cell Stem Cell *3*, 649–657.

Marra, P., Salvatore, L., Mironov, A., Jr, Di Campli, A., Di Tullio, G., Trucco, A., Beznoussenko, G., Mironov, A., and De Matteis, M.A. (2007). The biogenesis of the Golgi ribbon: the roles of membrane input from the ER and of GM130. Mol. Biol. Cell *18*, 1595–1608.

Marsh, B.J., and Howell, K.E. (2002). The mammalian Golgi — complex debates. Nature Reviews Molecular Cell Biology *3*, 789–795.

Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *78*, 7634–7638.

Mateizel, I., Spits, C., De Rycke, M., Liebaers, I., and Sermon, K. (2010). Derivation, culture, and characterization of VUB hESC lines. In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim. *46*, 300–308.

Mateizel, I., De Temmerman, N., Ullmann, U., Cauffman, G., Sermon, K., Van De Velde, H., De Rycke, M., Degreef, E., Devroey, P., Liebaers, I., et al. (2006). Derivation of Human Embryonic Stem Cell Lines from Embryos Obtained After IVF and After PGD for Monogenic Disorders. Hum. Reprod. *21*, 503–511.

Matsui, T., Leung, D., Miyashita, H., Maksakova, I.A., Miyachi, H., Kimura, H., Tachibana, M., Lorincz, M.C., and Shinkai, Y. (2010). Proviral silencing in embryonic stem cells requires the histone methyltransferase ESET. Nature *464*, 927–931.

Matsuki, T., Matthews, R.T., Cooper, J.A., van der Brug, M.P., Cookson, M.R., Hardy, J.A., Olson, E.C., and Howell, B.W. (2010). Reelin and stk25 have opposing roles in neuronal polarization and dendritic Golgi deployment. Cell *143*, 826–836.

Maury, Y., Gauthier, M., Peschanski, M., and Martinat, C. (2012). Human pluripotent stem cells for disease modelling and drug screening. Bioessays *34*, 61–71.

Mayshar, Y., Ben-David, U., Lavon, N., Biancotti, J.-C., Yakir, B., Clark, A.T., Plath, K., Lowry, W.E., and Benvenisty, N. (2010). Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. Cell Stem Cell *7*, 521–531.

Meikle, P.J., Hopwood, J.J., Clague, A.E., and Carey, W.F. (1999). Prevalence of lysosomal storage disorders. JAMA *281*, 249–254.

Meissner, A., Wernig, M., and Jaenisch, R. (2007). Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. Nat. Biotechnol. *25*, 1177–1181.

Menzies, F.M., Ince, P.G., and Shaw, P.J. (2002). Mitochondrial involvement in amyotrophic lateral sclerosis. Neurochem. Int. *40*, 543–551.

Michel, F., Bonnefont-Rousselot, D., Mas, E., Drai, J., and Thérond, P. (2008). [Biomarkers of lipid peroxidation: analytical aspects]. Ann. Biol. Clin. (Paris) *66*, 605–620.

Mikkelsen, T.S., Hanna, J., Zhang, X., Ku, M., Wernig, M., Schorderet, P., Bernstein, B.E., Jaenisch, R., Lander, E.S., and Meissner, A. (2008). Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. Nature *454*, 49–55.

Millecamps, S., Boillée, S., Le Ber, I., Seilhean, D., Teyssou, E., Giraudeau, M., Moigneu, C., Vandenberghe, N., Danel-Brunaud, V., Corcia, P., et al. (2012). Phenotype difference between ALS patients with expanded repeats in C9ORF72 and patients with mutations in other ALS-related genes. J. Med. Genet. *49*, 258–263.

Millecamps, S., Gentil, B.J., Gros-Louis, F., Rouleau, G., and Julien, J.-P. (2005). Alsin is partially associated with centrosome in human cells. Biochim. Biophys. Acta *1745*, 84–100.

Miller, P.M., Folkmann, A.W., Maia, A.R.R., Efimova, N., Efimov, A., and Kaverina, I. (2009). Golgi-derived CLASP-dependent microtubules control Golgi organization and polarized trafficking in motile cells. Nat. Cell Biol. *11*, 1069–1080.

Milosević, N.T., and Ristanović, D. (2007). The Sholl analysis of neuronal cell images: semi-log or log-log method? J. Theor. Biol. *245*, 130–140.

Minelli, A., Danesino, C., Lo Curto, F., Tenti, P., Zampatti, C., Simoni, G., Rossella, F., and Fois, A. (1988). First trimester prenatal diagnosis of Sanfilippo disease (MPSIII) type B. Prenat. Diagn. *8*, 47–52.

Mitne-Neto, M., Machado-Costa, M., Marchetto, M.C.N., Bengtson, M.H., Joazeiro, C.A., Tsuda, H., Bellen, H.J., Silva, H.C.A., Oliveira, A.S.B., Lazar, M., et al. (2011). Downregulation of VAPB expression in motor neurons derived from induced pluripotent stem cells of ALS8 patients. Hum. Mol. Genet. *20*, 3642–3652.

Miyagawa-Tomita, S., Morishima, M., Nakazawa, M., Mizutani, M., and Kikuchi, T. (1996). Pathological study of Japanese quail embryo with acid alpha-glucosidase deficiency during early development. Acta Neuropathol. *92*, 249–254.

**N**

Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N., and Yamanaka, S. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. Nat. Biotechnol. *26*, 101–106.

Nakamura, N. (2010). Emerging new roles of GM130, a cis-Golgi matrix protein, in higher order cell functions. J. Pharmacol. Sci. *112*, 255–264.

Nakamura, N., Rabouille, C., Watson, R., Nilsson, T., Hui, N., Slusarewicz, P., Kreis, T.E., and Warren, G. (1995). Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130. J. Cell Biol. *131*, 1715–1726.

Nassif, M., Matus, S., Castillo, K., and Hetz, C. (2010). Amyotrophic lateral sclerosis pathogenesis: a journey through the secretory pathway. Antioxid. Redox Signal. *13*, 1955–1989.

Nathanson, J.L., Yanagawa, Y., Obata, K., and Callaway, E.M. (2009). Preferential labeling of inhibitory and excitatory cortical neurons by endogenous tropism of AAV and lentiviral vectors. Neuroscience *161*, 441–450.

Neufeld, E.F., and Muenzer, J. (2001). The Mucopolysaccharidoses. In The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease, 8th Ed, (McGraw-Hill, New York: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S. and Valle, D. (eds.)), pp. 3421–3452.

Neumann, M., Sampathu, D.M., Kwong, L.K., Truax, A.C., Micsenyi, M.C., Chou, T.T., Bruce, J., Schuck, T., Grossman, M., Clark, C.M., et al. (2006). Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. Science *314*, 130–133.

Nguyen, H.N., Byers, B., Cord, B., Shcheglovitov, A., Byrne, J., Gujar, P., Kee, K., Schüle, B., Dolmetsch, R.E., Langston, W., et al. (2011). LRRK2 mutant iPSC-derived DA neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress. Cell Stem Cell *8*, 267–280.

Nicaise, C., Soyfoo, M.S., Authelet, M., De Decker, R., Bataveljic, D., Delporte, C., and Pochet, R. (2009). Aquaporin-4 overexpression in rat ALS model. Anat Rec (Hoboken) *292*, 207–213.

Niciu, M.J., Kelmendi, B., and Sanacora, G. (2012). Overview of glutamatergic neurotransmission in the nervous system. Pharmacol. Biochem. Behav. *100*, 656–664.

Nikolic, M. (2002). The role of Rho GTPases and associated kinases in regulating neurite outgrowth. Int. J. Biochem. Cell Biol. *34*, 731–745.

Nishimura, A.L., Mitne-Neto, M., Silva, H.C.A., Richieri-Costa, A., Middleton, S., Cascio, D., Kok, F., Oliveira, J.R.M., Gillingwater, T., Webb, J., et al. (2004). A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. Am. J. Hum. Genet. *75*, 822–831.

Nishimura, K., Sano, M., Ohtaka, M., Furuta, B., Umemura, Y., Nakajima, Y., Ikehara, Y., Kobayashi, T., Segawa, H., Takayasu, S., et al. (2011). Development of defective and persistent Sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming. J. Biol. Chem. *286*, 4760–4771.

Nishishita, N., Shikamura, M., Takenaka, C., Takada, N., Fusak, N., and Kawamata, S. (2012). Generation of Virus-Free Induced Pluripotent Stem Cell Clones on a Synthetic Matrix via a Single Cell Subcloning in the Naïve State. PLoS ONE *7*, e38389.

Nixon, R.A., and Cataldo, A.M. (2006). Lysosomal system pathways: genes to neurodegeneration in Alzheimer's disease. J. Alzheimers Dis. *9*, 277–289.

Nonaka, T., Arai, T., Buratti, E., Baralle, F.E., Akiyama, H., and Hasegawa, M. (2009). Phosphorylated and ubiquitinated TDP-43 pathological inclusions in ALS and FTLD-U are recapitulated in SH-SY5Y cells. FEBS Letters *583*, 394–400.

**O**

Oeda, T., Shimohama, S., Kitagawa, N., Kohno, R., Imura, T., Shibasaki, H., and Ishii, N. (2001). Oxidative stress causes abnormal accumulation of familial amyotrophic lateral sclerosis-related mutant SOD1 in transgenic Caenorhabditis elegans. Hum. Mol. Genet. *10*, 2013–2023.

Ohmi, K., Greenberg, D.S., Rajavel, K.S., Ryazantsev, S., Li, H.H., and Neufeld, E.F. (2003). Activated microglia in cortex of mouse models of mucopolysaccharidoses I and IIIB. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *100*, 1902–1907.

Ohmi, K., Kudo, L.C., Ryazantsev, S., Zhao, H.-Z., Karsten, S.L., and Neufeld, E.F. (2009). Sanfilippo syndrome type B, a lysosomal storage disease, is also a tauopathy. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *106*, 8332–8337.

Okamoto, K., Mizuno, Y., and Fujita, Y. (2008). Bunina bodies in amyotrophic lateral sclerosis. Neuropathology *28*, 109–115.

Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. Nature *448*, 313–317.

Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2008). Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. Science *322*, 949–953.

Okita, K., and Yamanaka, S. (2011). Induced pluripotent stem cells: opportunities and challenges. Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci. *366*, 2198–2207.

Osafune, K., Caron, L., Borowiak, M., Martinez, R.J., Fitz-Gerald, C.S., Sato, Y., Cowan, C.A., Chien, K.R., and Melton, D.A. (2008). Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. Nature Biotechnology *26*, 313–315.

Otomo, A., Hadano, S., Okada, T., Mizumura, H., Kunita, R., Nishijima, H., Showguchi-Miyata, J., Yanagisawa, Y., Kohiki, E., Suga, E., et al. (2003). ALS2, a novel guanine nucleotide exchange factor for the small GTPase Rab5, is implicated in endosomal dynamics. Hum. Mol. Genet. *12*, 1671–1687.

Otomo, A., Kunita, R., Suzuki-Utsunomiya, K., Mizumura, H., Onoe, K., Osuga, H., Hadano, S., and Ikeda, J.-E. (2008). ALS2/alsin deficiency in neurons leads to mild defects in macropinocytosis and axonal growth. Biochem. Biophys. Res. Commun. *370*, 87–92.

**P**

Palazzo, A.F., Eng, C.H., Schlaepfer, D.D., Marcantonio, E.E., and Gundersen, G.G. (2004). Localized stabilization of microtubules by integrin- and FAK-facilitated Rho signaling. Science *303*, 836–839.

Palmer, K.J., Hughes, H., and Stephens, D.J. (2009). Specificity of cytoplasmic dynein subunits in discrete membrane-trafficking steps. Mol. Biol. Cell *20*, 2885–2899.

Panzeri, C., De Palma, C., Martinuzzi, A., Daga, A., De Polo, G., Bresolin, N., Miller, C.C., Tudor, E.L., Clementi, E., and Bassi, M.T. (2006). The first ALS2 missense mutation associated with JPLS reveals new aspects of alsin biological function. Brain *129*, 1710–1719.

Park, I.-H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M.W., Cowan, C., Hochedlinger, K., and Daley, G.Q. (2008a). Disease-specific induced pluripotent stem cells. Cell *134*, 877–886.

Park, I.-H., Lerou, P.H., Zhao, R., Huo, H., and Daley, G.Q. (2008b). Generation of human-induced pluripotent stem cells. Nat Protoc *3*, 1180–1186.

Park, I.-H., Zhao, R., West, J.A., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T.A., Lerou, P.H., Lensch, M.W., and Daley, G.Q. (2008c). Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. Nature *451*, 141–146.

Parkinson-Lawrence, E.J., Shandala, T., Prodoehl, M., Plew, R., Borlace, G.N., and Brooks, D.A. (2010). Lysosomal storage disease: revealing lysosomal function and physiology. Physiology (Bethesda) *25*, 102–115.

Pasinelli, P., and Brown, R.H. (2006). Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. Nat. Rev. Neurosci. *7*, 710–723.

Patterson, G.H., Hirschberg, K., Polishchuk, R.S., Gerlich, D., Phair, R.D., and Lippincott-Schwartz, J. (2008). Transport through the Golgi apparatus by rapid partitioning within a two-phase membrane system. Cell *133*, 1055–1067.

Perkins, K.J., Muller, V., Weber, B., and Hopwood, J.J. (2001). Prediction of Sanfilippo phenotype severity from immunoquantification of heparan-N-sulfamidase in cultured fibroblasts from mucopolysaccharidosis type IIIA patients. Mol. Genet. Metab. *73*, 306–312.

Perlson, E., Maday, S., Fu, M.-M., Moughamian, A.J., and Holzbaur, E.L.F. (2010). Retrograde axonal transport: pathways to cell death? Trends Neurosci. *33*, 335–344.

Perrier, A.L., Tabar, V., Barberi, T., Rubio, M.E., Bruses, J., Topf, N., Harrison, N.L., and Studer, L. (2004). Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *101*, 12543–12548.

Pessach, I.M., Ordovas-Montanes, J., Zhang, S.-Y., Casanova, J.-L., Giliani, S., Gennery, A.R., Al-Herz, W., Manos, P.D., Schlaeger, T.M., Park, I.-H., et al. (2011). Induced Pluripotent Stem Cells: A novel frontier in the study of human primary immunodeficiencies. J Allergy Clin Immunol *127*, 1400–1407.e4.

Pfeffer, S.R. (2010). How the Golgi works: A cisternal progenitor model. PNAS *107*, 19614–19618.

Pfisterer, U., Kirkeby, A., Torper, O., Wood, J., Nelander, J., Dufour, A., Björklund, A., Lindvall, O., Jakobsson, J., and Parmar, M. (2011). Direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *108*, 10343–10348.

Polo, J.M., Liu, S., Figueroa, M.E., Kulalert, W., Eminli, S., Tan, K.Y., Apostolou, E., Stadtfeld, M., Li, Y., Shioda, T., et al. (2010). Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. Nat. Biotechnol. *28*, 848–855.

Pramatarova, A., Laganière, J., Roussel, J., Brisebois, K., and Rouleau, G.A. (2001). Neuron-specific expression of mutant superoxide dismutase 1 in transgenic mice does not lead to motor impairment. J. Neurosci. *21*, 3369–3374.

Preisinger, C., Short, B., De Corte, V., Bruyneel, E., Haas, A., Kopajtich, R., Gettemans, J., and Barr, F.A. (2004). YSK1 is activated by the Golgi matrix protein GM130 and plays a role in cell migration through its substrate 14-3-3zeta. J. Cell Biol. *164*, 1009–1020.

Puthenveedu, M.A., Bachert, C., Puri, S., Lanni, F., and Linstedt, A.D. (2006). GM130 and GRASP65-dependent lateral cisternal fusion allows uniform Golgi-enzyme distribution. Nat. Cell Biol. *8*, 238–248.

Pye, D.A., Vivès, R.R., Hyde, P., and Gallagher, J.T. (2000). Regulation of FGF-1 mitogenic activity by heparan sulfate oligosaccharides is dependent on specific structural features: differential requirements for the modulation of FGF-1 and FGF-2. Glycobiology *10*, 1183–1192.

## Q

Quigley, H., Colloby, S.J., and O'Brien, J.T. (2011). PET imaging of brain amyloid in dementia: a review. Int J Geriatr Psychiatry *26*, 991–999.

Quinlan, A.R., Boland, M.J., Leibowitz, M.L., Shumilina, S., Pehrson, S.M., Baldwin, K.K., and Hall, I.M. (2011). Genome sequencing of mouse induced pluripotent stem cells reveals retroelement stability and infrequent DNA rearrangement during reprogramming. Cell Stem Cell *9*, 366–373.

Quinlan, K.A. (2011). Links between electrophysiological and molecular pathology of amyotrophic lateral sclerosis. Integr. Comp. Biol. *51*, 913–925.

## R

Rashid, S.T., Corbineau, S., Hannan, N., Marciniak, S.J., Miranda, E., Alexander, G., Huang-Doran, I., Griffin, J., Ahrlund-Richter, L., Skepper, J., et al. (2010). Modeling inherited metabolic disorders of the liver using human induced pluripotent stem cells. J. Clin. Invest. *120*, 3127–3136.

Reaume, A.G., Elliott, J.L., Hoffman, E.K., Kowall, N.W., Ferrante, R.J., Siwek, D.F., Wilcox, H.M., Flood, D.G., Beal, M.F., Brown, R.H., Jr, et al. (1996). Motor neurons in

Cu/Zn superoxide dismutase-deficient mice develop normally but exhibit enhanced cell death after axonal injury. Nat. Genet. *13*, 43–47.

Renton, A.E., Majounie, E., Waite, A., Simón-Sánchez, J., Rollinson, S., Gibbs, J.R., Schymick, J.C., Laaksovirta, H., van Swieten, J.C., Myllykangas, L., et al. (2011). A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. Neuron *72*, 257–268.

Reynolds, B.A., and Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. Science *255*, 1707–1710.

Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y., and Zerial, M. (2005). Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. Cell *122*, 735–749.

Riveline, D., Zamir, E., Balaban, N.Q., Schwarz, U.S., Ishizaki, T., Narumiya, S., Kam, Z., Geiger, B., and Bershadsky, A.D. (2001). Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. J. Cell Biol. *153*, 1175–1186.

Rivero, S., Cardenas, J., Bornens, M., and Rios, R.M. (2009). Microtubule nucleation at the cis-side of the Golgi apparatus requires AKAP450 and GM130. EMBO J. *28*, 1016–1028.

Robinton, D.A., and Daley, G.Q. (2012). The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. Nature *481*, 295–305.

Rodriguez-Boulan, E., and Müsch, A. (2005). Protein sorting in the Golgi complex: Shifting paradigms. Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research *1744*, 455–464.

Rosen, D.R., Siddique, T., Patterson, D., Figlewicz, D.A., Sapp, P., Hentati, A., Donaldson, D., Goto, J., O'Regan, J.P., and Deng, H.X. (1993). Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature *362*, 59–62.

Rossman, K.L., Der, C.J., and Sondek, J. (2005). GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *6*, 167–180.

Rothstein, J.D., Van Kammen, M., Levey, A.I., Martin, L.J., and Kuncl, R.W. (1995). Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. Ann. Neurol. *38*, 73–84.

Rowland, L.P., and Shneider, N.A. (2001). Amyotrophic lateral sclerosis. N. Engl. J. Med. *344*, 1688–1700.

Roy, E. (2012). Cell disorders in lysosomal storage diseases (Paris 5).

Roy, E., Bruyère, J., Flamant, P., Bigou, S., Ausseil, J., Vitry, S., and Heard, J.M. (2012). GM130 Gain-of-Function Induces Cell Pathology in a Model of Lysosomal Storage Disease. Hum. Mol. Genet. *21*, 1481–1495.

Ruivo, R., Anne, C., Sagné, C., and Gasnier, B. (2009). Molecular and cellular basis of lysosomal transmembrane protein dysfunction. Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research *1793*, 636–649.

Ryazantsev, S., Yu, W.-H., Zhao, H.-Z., Neufeld, E.F., and Ohmi, K. (2007). Lysosomal accumulation of SCMAS (subunit c of mitochondrial ATP synthase) in neurons of the mouse model of mucopolysaccharidosis III B. Mol. Genet. Metab. *90*, 393–401.

**S**

Salminen-Mankonen, H.J., Morko, J., and Vuorio, E. (2007). Role of cathepsin K in normal joints and in the development of arthritis. Curr Drug Targets *8*, 315–323.

Sasaki, S., and Iwata, M. (1996). Ultrastructural study of synapses in the anterior horn neurons of patients with amyotrophic lateral sclerosis. Neurosci. Lett. *204*, 53–56.

Sasaki, S., and Iwata, M. (1999). Ultrastructural change of synapses of Betz cells in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Neurosci. Lett. *268*, 29–32.

Sasisekharan, R., Raman, R., and Prabhakar, V. (2006). Glycomics approach to structure-function relationships of glycosaminoglycans. Annu Rev Biomed Eng *8*, 181–231.

Schwartz, S.D., Hubschman, J.-P., Heilwell, G., Franco-Cardenas, V., Pan, C.K., Ostrick, R.M., Mickunas, E., Gay, R., Klimanskaya, I., and Lanza, R. (2012). Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. Lancet *379*, 713–720.

Seibler, P., Graziotto, J., Jeong, H., Simunovic, F., Klein, C., and Krainc, D. (2011). Mitochondrial Parkin recruitment is impaired in neurons derived from mutant PINK1 induced pluripotent stem cells. J. Neurosci. *31*, 5970–5976.

Shaw, P.J., Ince, P.G., Falkous, G., and Mantle, D. (1995). Oxidative damage to protein in sporadic motor neuron disease spinal cord. Ann. Neurol. *38*, 691–695.

Shi, P., Gal, J., Kwinter, D.M., Liu, X., and Zhu, H. (2010). Mitochondrial dysfunction in amyotrophic lateral sclerosis. Biochim. Biophys. Acta *1802*, 45–51.

Shibata, N., Nagai, R., Uchida, K., Horiuchi, S., Yamada, S., Hirano, A., Kawaguchi, M., Yamamoto, T., Sasaki, S., and Kobayashi, M. (2001). Morphological evidence for lipid peroxidation and protein glycoxidation in spinal cords from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients. Brain Res. *917*, 97–104.

Shirakawa, K., Suzuki, H., Ito, M., Kono, S., Uchiyama, T., Ohashi, T., and Miyajima, H. (2009). Novel compound heterozygous ALS2 mutations cause juvenile amyotrophic lateral sclerosis in Japan. Neurology *73*, 2124–2126.

SHOLL, D.A. (1953). Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. J. Anat. *87*, 387–406.

Shorter, J., Beard, M.B., Seemann, J., Dirac-Svejstrup, A.B., and Warren, G. (2002). Sequential tethering of Golgins and catalysis of SNAREpin assembly by the vesicle-tethering protein p115. J. Cell Biol. *157*, 45–62.

Silva, J., Barrandon, O., Nichols, J., Kawaguchi, J., Theunissen, T.W., and Smith, A. (2008a). Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. PLoS Biol. *6*, e253.

Silva, S.S., Rowntree, R.K., Mekhoubad, S., and Lee, J.T. (2008b). X-chromosome inactivation and epigenetic fluidity in human embryonic stem cells. PNAS *105*, 4820–4825.

Sivakumur, P., and Wraith, J.E. (1999). Bone marrow transplantation in mucopolysaccharidosis type IIIA: a comparison of an early treated patient with his untreated sibling. J. Inherit. Metab. Dis. *22*, 849–850.

Smith, R.G., Henry, Y.K., Mattson, M.P., and Appel, S.H. (1998). Presence of 4-hydroxynonenal in cerebrospinal fluid of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. Ann. Neurol. *44*, 696–699.

Smith, Z.D., Nachman, I., Regev, A., and Meissner, A. (2010). Dynamic single-cell imaging of direct reprogramming reveals an early specifying event. Nat. Biotechnol. *28*, 521–526.

Soldner, F., Hockemeyer, D., Beard, C., Gao, Q., Bell, G.W., Cook, E.G., Hargus, G., Blak, A., Cooper, O., Mitalipova, M., et al. (2009). Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. Cell *136*, 964–977.

Somers, A., Jean, J.-C., Sommer, C.A., Omari, A., Ford, C.C., Mills, J.A., Ying, L., Sommer, A.G., Jean, J.M., Smith, B.W., et al. (2010). Generation of transgene-free lung disease-specific human induced pluripotent stem cells using a single excisable lentiviral stem cell cassette. Stem Cells *28*, 1728–1740.

Sridharan, R., Tchieu, J., Mason, M.J., Yachechko, R., Kuoy, E., Horvath, S., Zhou, Q., and Plath, K. (2009). Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency. Cell *136*, 364–377.

Stadtfeld, M., Brennand, K., and Hochedlinger, K. (2008a). Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells. Curr. Biol. *18*, 890–894.

Stadtfeld, M., Maherali, N., Breault, D.T., and Hochedlinger, K. (2008b). Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. Cell Stem Cell *2*, 230–240.

Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., and Hochedlinger, K. (2008c). Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. Science *322*, 945–949.

Stankoff, B., Wang, Y., Bottlaender, M., Aigrot, M.-S., Dolle, F., Wu, C., Feinstein, D., Huang, G.-F., Semah, F., Mathis, C.A., et al. (2006). Imaging of CNS myelin by positron-emission tomography. PNAS *103*, 9304–9309.

Stenmark, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *10*, 513–525.

Stoessl, A.J., Martin, W.W., McKeown, M.J., and Sossi, V. (2011). Advances in imaging in Parkinson's disease. The Lancet Neurology *10*, 987–1001.

Sun, N., Panetta, N.J., Gupta, D.M., Wilson, K.D., Lee, A., Jia, F., Hu, S., Cherry, A.M., Robbins, R.C., Longaker, M.T., et al. (2009). Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *106*, 15720–15725.

Sütterlin, C., Polishchuk, R., Pecot, M., and Malhotra, V. (2005). The Golgi-associated protein GRASP65 regulates spindle dynamics and is essential for cell division. Mol. Biol. Cell *16*, 3211–3222.

Swarup, V., and Julien, J.-P. (2011). ALS pathogenesis: recent insights from genetics and mouse models. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry *35*, 363–369.

Swistowski, A., Peng, J., Liu, Q., Mali, P., Rao, M.S., Cheng, L., and Zeng, X. (2010). Efficient generation of functional dopaminergic neurons from human induced pluripotent stem cells under defined conditions. Stem Cells *28*, 1893–1904.

**T**

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. Cell *131*, 861–872.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell *126*, 663–676.

Takeshima, H., Komazaki, S., Nishi, M., Iino, M., and Kangawa, K. (2000). Junctophilins: a novel family of junctional membrane complex proteins. Mol. Cell *6*, 11–22.

Tamagawa, K., Morimatsu, Y., Fujisawa, K., Hara, A., and Taketomi, T. (1985). Neuropathological study and chemico-pathological correlation in sibling cases of Sanfilippo syndrome type B. Brain Dev. *7*, 599–609.

Tesar, P.J., Chenoweth, J.G., Brook, F.A., Davies, T.J., Evans, E.P., Mack, D.L., Gardner, R.L., and McKay, R.D.G. (2007). New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. Nature *448*, 196–199.

Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science *282*, 1145–1147.

Tolar, J., Park, I.-H., Xia, L., Lees, C.J., Peacock, B., Webber, B., McElmurry, R.T., Eide, C.R., Orchard, P.J., Kyba, M., et al. (2011a). Hematopoietic differentiation of induced pluripotent stem cells from patients with mucopolysaccharidosis type I (Hurler syndrome). Blood *117*, 839–847.

Tolar, J., Xia, L., Riddle, M.J., Lees, C.J., Eide, C.R., McElmurry, R.T., Titeux, M., Osborn, M.J., Lund, T.C., Hovnanian, A., et al. (2011b). Induced pluripotent stem cells from individuals with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. J. Invest. Dermatol. *131*, 848–856.

Topp, J.D., Gray, N.W., Gerard, R.D., and Horazdovsky, B.F. (2004). Alsin is a Rab5 and Rac1 guanine nucleotide exchange factor. J. Biol. Chem. *279*, 24612–24623.

Tucker, B.A., Park, I.-H., Qi, S.D., Klassen, H.J., Jiang, C., Yao, J., Redenti, S., Daley, G.Q., and Young, M.J. (2011). Transplantation of Adult Mouse iPS Cell-Derived Photoreceptor Precursors Restores Retinal Structure and Function in Degenerative Mice. PLoS ONE *6*, e18992.

Tudor, E.L., Galtrey, C.M., Perkinton, M.S., Lau, K.-F., De Vos, K.J., Mitchell, J.C., Ackerley, S., Hortobágyi, T., Vámos, E., Leigh, P.N., et al. (2010). Amyotrophic lateral sclerosis mutant vesicle-associated membrane protein-associated protein-B transgenic mice develop TAR-DNA-binding protein-43 pathology. Neuroscience *167*, 774–785.

Tudor, E.L., Perkinton, M.S., Schmidt, A., Ackerley, S., Brownlees, J., Jacobsen, N.J.O., Byers, H.L., Ward, M., Hall, A., Leigh, P.N., et al. (2005). ALS2/Alsin regulates Rac-PAK signaling and neurite outgrowth. J. Biol. Chem. *280*, 34735–34740.

**U**

Urbach, A., Bar-Nur, O., Daley, G.Q., and Benvenisty, N. (2010). Differential modeling of fragile X syndrome by human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. Cell Stem Cell *6*, 407–411.

Urbach, A., Schuldiner, M., and Benvenisty, N. (2004). Modeling for Lesch-Nyhan disease by gene targeting in human embryonic stem cells. Stem Cells *22*, 635–641.

Utikal, J., Polo, J.M., Stadtfeld, M., Maherali, N., Kulalert, W., Walsh, R.M., Khalil, A., Rheinwald, J.G., and Hochedlinger, K. (2009). Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells. Nature *460*, 1145–1148.

**V**

Varki, A. (2009). Essentials of glycobiology (Cold Spring Harbor N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Vellodi, A., Young, E., New, M., Pot-Mees, C., and Hugh-Jones, K. (1992). Bone marrow transplantation for Sanfilippo disease type B. J. Inherit. Metab. Dis. *15*, 911–918.

Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z.P., Kokubu, Y., Südhof, T.C., and Wernig, M. (2010). Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. Nature *463*, 1035–1041.

Vitry, S., Ausseil, J., Hocquemiller, M., Bigou, S., Dos Santos Coura, R., and Heard, J.M. (2009). Enhanced degradation of synaptophysin by the proteasome in mucopolysaccharidosis type IIIB. Mol. Cell. Neurosci. *41*, 8–18.

Vitry, S., Bruyère, J., Hocquemiller, M., Bigou, S., Ausseil, J., Colle, M.-A., Prévost, M.-C., and Heard, J.M. (2010). Storage vesicles in neurons are related to Golgi complex alterations in mucopolysaccharidosis IIIB. Am. J. Pathol. *177*, 2984–2999.

De Vos, K.J., Chapman, A.L., Tennant, M.E., Manser, C., Tudor, E.L., Lau, K.-F., Brownlees, J., Ackerley, S., Shaw, P.J., McLoughlin, D.M., et al. (2007). Familial amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants perturb fast axonal transport to reduce axonal mitochondria content. Human Molecular Genetics *16*, 2720 –2728.

De Vos, K.J., Grierson, A.J., Ackerley, S., and Miller, C.C.J. (2008). Role of axonal transport in neurodegenerative diseases. Annu. Rev. Neurosci. *31*, 151–173.

**W**

Wang, J.-L., Chang, W.-T., Tong, C.-W., Kohno, K., and Huang, A.-M. (2009). Human synapsin I mediates the function of nuclear respiratory factor 1 in neurite outgrowth in neuroblastoma IMR-32 cells. J. Neurosci. Res. *87*, 2255–2263.

Wang, Y., Seemann, J., Pypaert, M., Shorter, J., and Warren, G. (2003). A direct role for GRASP65 as a mitotically regulated Golgi stacking factor. EMBO J. *22*, 3279–3290.

Ward, C.M., Barrow, K.M., and Stern, P.L. (2004). Significant variations in differentiation properties between independent mouse ES cell lines cultured under defined conditions. Experimental Cell Research *293*, 229–238.

Warren, L., Manos, P.D., Ahfeldt, T., Loh, Y.-H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P.K., Smith, Z.D., Meissner, A., et al. (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. Cell Stem Cell *7*, 618–630.

Watanabe, T., Wang, S., Noritake, J., Sato, K., Fukata, M., Takefuji, M., Nakagawa, M., Izumi, N., Akiyama, T., and Kaibuchi, K. (2004). Interaction with IQGAP1 Links APC to Rac1, Cdc42, and Actin Filaments during Cell Polarization and Migration. Developmental Cell *7*, 871–883.

Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, B.E., and Jaenisch, R. (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. Nature *448*, 318–324.

Wirawan, E., Vanden Berghe, T., Lippens, S., Agostinis, P., and Vandenabeele, P. (2012). Autophagy: for better or for worse. Cell Res. *22*, 43–61.

Witan, H., Gorlovoy, P., Kaya, A.M., Koziollek-Drechsler, I., Neumann, H., Behl, C., and Clement, A.M. (2009). Wild-type Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1) does not facilitate, but impedes the formation of protein aggregates of amyotrophic lateral sclerosis causing mutant SOD1. Neurobiology of Disease *36*, 331–342.

Woltjen, K., Michael, I.P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hämäläinen, R., Cowling, R., Wang, W., Liu, P., Gertsenstein, M., et al. (2009). piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. Nature *458*, 766–770.

Wong, P.C., Pardo, C.A., Borchelt, D.R., Lee, M.K., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Sisodia, S.S., Cleveland, D.W., and Price, D.L. (1995). An adverse property of a familial ALS-linked SOD1 mutation causes motor neuron disease characterized by vacuolar degeneration of mitochondria. Neuron *14*, 1105–1116.

Wraith, J.E. (2002). Lysosomal disorders. Seminars in Neonatology *7*, 75–83.

**X**

Xiao, S., McLean, J., and Robertson, J. (2006). Neuronal intermediate filaments and ALS: a new look at an old question. Biochim. Biophys. Acta *1762*, 1001–1012.

Xie, H., Hu, L., and Li, G. (2010). SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. Chin. Med. J. *123*, 1086–1092.

Xu, Y.-F., Zhang, Y.-J., Lin, W.-L., Cao, X., Stetler, C., Dickson, D.W., Lewis, J., and Petrucelli, L. (2011). Expression of mutant TDP-43 induces neuronal dysfunction in transgenic mice. Mol Neurodegener *6*, 73.

**Y**

Yamanaka, K., Miller, T.M., McAlonis-Downes, M., Chun, S.J., and Cleveland, D.W. (2006). Progressive spinal axonal degeneration and slowness in ALS2-deficient mice. Ann. Neurol. *60*, 95–104.

Yamanaka, K., Vande Velde, C., Eymard-Pierre, E., Bertini, E., Boespflug-Tanguy, O., and Cleveland, D.W. (2003). Unstable mutants in the peripheral endosomal membrane component ALS2 cause early-onset motor neuron disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *100*, 16041–16046.

Yan, B., Abdelli, L.S., and Singla, D.K. (2011). Transplanted Induced Pluripotent Stem Cells Improve Cardiac Function and Induce Neovascularization in the Infarcted Hearts of db/db Mice. Mol. Pharmaceutics *8*, 1602–1610.

Yang, Y., Hentati, A., Deng, H.X., Dabbagh, O., Sasaki, T., Hirano, M., Hung, W.Y., Ouahchi, K., Yan, J., Azim, A.C., et al. (2001). The gene encoding alsin, a protein

with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis. Nat. Genet. *29*, 160–165.

Ye, Z., Zhan, H., Mali, P., Dowey, S., Williams, D.M., Jang, Y.-Y., Dang, C.V., Spivak, J.L., Moliterno, A.R., and Cheng, L. (2009). Human-induced pluripotent stem cells from blood cells of healthy donors and patients with acquired blood disorders. Blood *114*, 5473–5480.

Yoshimura, S.I., Nakamura, N., Barr, F.A., Misumi, Y., Ikehara, Y., Ohno, H., Sakaguchi, M., and Mihara, K. (2001). Direct targeting of cis-Golgi matrix proteins to the Golgi apparatus. J. Cell. Sci. *114*, 4105–4115.

Young, A.B. (2009). Four decades of neurodegenerative disease research: how far we have come! J. Neurosci. *29*, 12722–12728.

Young, M.A., Larson, D.E., Sun, C.-W., George, D.R., Ding, L., Miller, C.A., Lin, L., Pawlik, K.M., Chen, K., Fan, X., et al. (2012). Background mutations in parental cells account for most of the genetic heterogeneity of induced pluripotent stem cells. Cell Stem Cell *10*, 570–582.

Yu, J., Chau, K.F., Vodyanik, M.A., Jiang, J., and Jiang, Y. (2011). Efficient feeder-free episomal reprogramming with small molecules. PLoS ONE *6*, e17557.

Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I.I., and Thomson, J.A. (2009). Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. Science *324*, 797–801.

Yu, J., Vodyanik, M.A., He, P., Slukvin, I.I., and Thomson, J.A. (2006). Human embryonic stem cells reprogram myeloid precursors following cell-cell fusion. Stem Cells *24*, 168–176.

Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., et al. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science *318*, 1917–1920.

Yuan, S.H., Martin, J., Elia, J., Flippin, J., Paramban, R.I., Hefferan, M.P., Vidal, J.G., Mu, Y., Killian, R.L., Israel, M.A., et al. (2011a). Cell-surface marker signatures for the isolation of neural stem cells, glia and neurons derived from human pluripotent stem cells. PLoS ONE *6*, e17540.

Yuan, X., Li, W., and Ding, S. (2011b). Small Molecules in Cellular Reprogramming and Differentiation. In Epigenetics and Disease, S.M. Gasser, E. Li, and E. Jucker, eds. (Springer Basel), pp. 253–266.

Yusa, K., Rad, R., Takeda, J., and Bradley, A. (2009). Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. Nat. Methods *6*, 363–369.

## Z

Zerial, M., and McBride, H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *2*, 107–117.

Zhang, J., Lian, Q., Zhu, G., Zhou, F., Sui, L., Tan, C., Mutalif, R.A., Navasankari, R., Zhang, Y., Tse, H.-F., et al. (2011a). A human iPSC model of Hutchinson Gilford Progeria reveals vascular smooth muscle and mesenchymal stem cell defects. Cell Stem Cell *8*, 31–45.

Zhang, S., Chen, S., Li, W., Guo, X., Zhao, P., Xu, J., Chen, Y., Pan, Q., Liu, X., Zychlinski, D., et al. (2011b). Rescue of ATP7B function in hepatocyte-like cells from Wilson's disease induced pluripotent stem cells using gene therapy or the chaperone drug curcumin. Hum. Mol. Genet. *20*, 3176–3187.

Zhao, H., Li, H., Schmidtchen, A., Bach, G., and Neufeld, E. (1995). The gene encoding α-N-acetylglucosaminidase and mutations underlying Sanfilippo B syndrome. The American Journal of Human Genetics *(Suppl 57)*, p. A185.

Zhao, K.W., and Neufeld, E.F. (2000). Purification and characterization of recombinant human alpha-N-acetylglucosaminidase secreted by Chinese hamster ovary cells. Protein Expr. Purif. *19*, 202–211.

Zhao, X., Li, W., Lv, Z., Liu, L., Tong, M., Hai, T., Hao, J., Guo, C., Ma, Q., Wang, L., et al. (2009). iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. Nature *461*, 86–90.

Zhou, H., Wu, S., Joo, J.Y., Zhu, S., Han, D.W., Lin, T., Trauger, S., Bien, G., Yao, S., Zhu, Y., et al. (2009). Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. Cell Stem Cell *4*, 381–384.

Zhou, Q., Brown, J., Kanarek, A., Rajagopal, J., and Melton, D.A. (2008). In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. Nature *455*, 627–632.

Zhou, W., and Freed, C.R. (2009). Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. Stem Cells *27*, 2667–2674.

Zou, J., Sweeney, C.L., Chou, B.-K., Choi, U., Pan, J., Wang, H., Dowey, S.N., Cheng, L., and Malech, H.L. (2011). Oxidase-deficient neutrophils from X-linked chronic granulomatous disease iPS cells: functional correction by zinc finger nuclease-mediated safe harbor targeting. Blood *117*, 5561–5572.

# Annexe

## Soluble heparan sulfate saccharide fragments activate focal adhesions and alter cell migration

Julie Bruyère[1], Elise Roy[1], Jérôme Ausseil[2], Thomas Lemonnier[1], Guillaume Teyre[1], Delphine Bohl[1], Sandrine Etienne-Manneville[3], Hugues Lortat-Jacob[4], Jean Michel Heard[1] and Sandrine Vitry[1]

[1] Unité Rétrovirus et Transfert Génétique, INSERM U622, Department of Neuroscience, Institut Pasteur, 28 rue du Dr Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.

[2] Laboratoire de Biochimie, CHU Amiens, UFR de Médecine, INSERM U1088, Avenue Laënnec, 80054 Amiens, France.

[3] Cell Polarity and Migration Group and CNRS URA 2582, Institut Pasteur, 25 Rue du Dr Roux, 75724, Paris Cedex 15, France.

[4] CNRS- Commissariat à l'Energie Atomique-Université Joseph Fourier, Grenoble 1, Institut de Biologie Structurale Jean-Pierre Ebel, 38027, Grenoble Cedex 01, France.

Corresponding author: Jean Michel Heard
Unité Rétrovirus et Transfert Génétique, INSERM U622
Département de Neuroscience
Institut Pasteur 28 rue du Dr Roux, 75015 Paris, France
Phone : 33-1-45688246 ; Fax : 33-1-45688940
e-mail: jmheard@pasteur.fr

Running title: Heparan sulfate activate focal adhesion

Total number of characters: 25479 characters

**Abstract**

Accumulation of soluble heparan sulfate saccharides is a characteristic feature of mucopolysaccharidosis type III (Sanfilippo syndrome), a genetic disease due to deficient heparan sulfate exoglycanase. Cell disorders associated with the disease suggest deficient sensing of cell environment. We addressed this issue in neural stem cells, mouse astrocytes and human fibroblasts. Deficient astrocytes showed β1-integrin over-expression and increased focal adhesion. In migration assays, astrocyte and neural stem cell polarization were defective. Normal phenotype was restored after clearance of saccharides. Conversely, exposition of normal astrocytes or normal human neural stem cells to high extracellular concentrations of heparan sulfate octasaccharides, or longer chains, activated integrin signaling and focal adhesions. Our observations indicate that soluble heparan sulfate saccharide fragments activate focal adhesion and participate in cell sensing of the environment with consequences on polarization and migration. Continuous release of soluble heparan sulfate saccharide fragments in the environment by deficient cells presumably contributes to cell disorders and neuropathology in mucopolysaccharidosis type III.

**Key words**

cell polarity; extracellular matrix; glycosaminoglycans, integrins, lysosomal storage diseases

## Introduction

Sensing cell environment is crucial for development, function and plasticity of the central nervous system (CNS), and defects possibly result into neurodegeneration (Bonneh-Barkay & Wiley, 2009). Extracellular spaces in the CNS are filled with extracellular matrix (ECM) components that influence neuronal communication and regulate plastic changes important to protect neurons and synapses against damage. Brain ECM is unique in composition and organization. It contains relatively small amounts of fibrous proteins but high amounts of proteoglycans, essentially chondroitin sulfate and heparan sulfate (HS) (Maeda et al, 2011).

HS proteoglycans (HSPGs) are glycoproteins bearing long chains (40–300 sugar residues) of alternating hexuronic acid and glucosamine that are made complex by various *O*- and *N*-sulfate and *N*-acetyl substitutions, as well as by C5-epimerization of the hexuronic acid (Sarrazin et al, 2011). HSPGs exist as membrane-bound glycoproteins, like syndecans, Gpi-anchored glycoproteins, like glypicans, or extracellular soluble glycoprotein, like agrin. Shedding releases soluble HS saccharide fragments in the ECM. HSPGs play critical roles in the proliferation and differentiation of neural progenitor cells, in neuronal migration, in axon pathfinding, in synaptogenesis, in neural plasticity and in neural regeneration (Maeda et al, 2011). HSPG half-life ranges from 3 to 8 hours (Stringer & Gallagher, 1997). Soluble or membrane-bound HSPGs are internalized in endosomes, where they are cleaved by endoglycanases to generate polysaccharides of various lengths (from 2 to more than 20 residues), then transported to lysosomes where exoglycanases release monosaccharides for recycling.

HS saccharide chains present at the cell surface or in extracellular spaces are highly charged and bind multiples molecules, accounting for the implication of HSPGs in a multitude of biological pathways (Sarrazin et al, 2011). Interactions with fibronectin, laminin, thrombospondin, tenascin, or Slit are especially important in cell adhesion, cell polarization, cell migration and in the growth of cell processes (de Wit & Verhaagen, 2007; Sarrazin et al, 2011; Xian et al, 2010). For example, engagement of syndecan-4 together with integrins is required for focal adhesion (FA) formation, and nearly all ECM molecules contain binding sites for both types of receptors (Barczyk et al, 2010; Morgan et al, 2007; Xian et al, 2010).

Integrins are heterodimeric transmembrane receptors. They are the main cell adhesion receptors involved in FA formation (Barczyk et al, 2010). Following engagement with the ECM, integrins locally recruit FA proteins including FA kinase (FAK), paxillin and vinculin, and activate signaling required for cell polarization and migration (Legate et al, 2009; Moissoglu & Schwartz, 2006). When engaged, syndecan-4 modulates this process through the cytoplasmic domain of its core protein (Couchman, 2010). Soluble HS saccharide fragments present in the ECM affect syndecan-4 engagement and FA formation in response to fibronectin (Mahalingam et al, 2007).

Mucopolysaccharidosis type III (MPSIII, Sanfilippo syndrome) is a genetic disease caused by the deficiency in one of the four lysosomal exoglycanases required for the removal of *N*-acetyl-glucosamine in HS chains (Neufeld & Muenzer, 2001). In contrast to monosaccharides, soluble HS saccharide fragments produced by partial digestion of HS chains cannot be transported to the cytosol for recycling. They accumulate in the endo-lysosomal compartment, from which they can be eliminated outside the cell through exocytosis. Cognitive development delay and progressive intellectual degradation of affected children are consistent with major loss of brain plasticity. Associated cell disorders, including Golgi disorganization (Vitry et al, 2010), expansion of acetylated microtubule network (Roy et al, 2012), altered response to fibroblast growth factor 2 (Lemonnier et al, 2011), and enhanced neurite outgrowth (Hocquemiller et al, 2010), suggested that the capacity of deficient cells to correctly respond/adapt to their microenvironment is altered. We therefore asked whether deficient cells from mouse or human models of MPSIII, which produced high quantity of soluble HS saccharide fragments, sensed their environment appropriately. Our observations revealed altered integrin signaling in MPSIII mouse astrocytes and human neural stem cells. They prompted us to investigate how non-deficient cells behave when their environment is enriched with exogenous soluble HS saccharides. Our results indicate that soluble HS saccharide fragments activated FA formation, with consequences on cell polarity and oriented migration.

## Results

### Increased β1 integrin levels and focal adhesion formation in MPSIIIB astrocytes

We previously examined gene expression profiles of neural cells generated from induced pluripotent stem cells (iPSc) derived from the skin fibroblasts of patients with MPSIII type B (MPSIIIB), a subtype of Sanfilippo syndrome in which the deficient enzyme is α-*N*-acetylglucosaminidase (NAGLU). The study revealed modified amounts of mRNAs coding for various integrin chains in patient's cells (αV, α1, α2, α8, α9, α10, α1 and β3) (Lemonnier et al, 2011). Examination of MPSIIIB mouse astrocytes plated for 24 hours on poly-ornithin substrate revealed the presence of higher amounts of β1-integrin (also called CD29) mRNAs than in control mouse astrocytes (Fig. 1A), and western blot detected high amount of β1-integrin in total cell protein extracts using anti-CD29 antibodies (Fig. 1B). Using the antibody 9EG7, which recognizes activated β1-integrin in association with α4 chain or α6 chain, we also detected increased β1-integrin signal in MPSIIIB versus control astrocytes by immunostaining (Fig. 1C). Co-labeling of β1-integrin and vinculin, a FA marker, revealed an increase in β1-integrin containing FAs in MPSIIIB, as compared to control astrocytes (inset in Fig. 1C). Correction of the enzyme deficiency of MPSIIIB cells using a lentivirus vector inducing the expression of the missing enzyme NAGLU led to β1-integrin expression levels equivalent to control astrocytes (Fig. 1), suggesting that increased levels of β1-integrin in MPSIIIB cells were related to the accumulation of partially digested HS saccharides.

Once activated and clustered, integrins locally recruit proteins involved in the formation of FA including vinculin, phosphorylated FAK (pFAK) and phosphorylated paxillin (pPaxillin) (Legate et al, 2009). Vinculin, FAK and paxillin mRNAs levels were comparable in MPSIIIB and control astrocytes (supplemental Fig. S1A). Vinculin signal was weak in control mouse astrocytes plated for 24 hours on poly-ornithin, whereas it was intense and abundant in MPSIIIB astrocytes (Fig. 2A, supplemental Fig. S1B). Co-labeling for FAK phosphorylated on tyrosine 397 (pFAK) and vinculin detected more intense pFAK signal co-localized with vinculin in MPSIIIB than in control astrocytes (1.7 to 2 folds; Fig. 2B, supplemental Fig. S1B). FAK was immunoprecipitated and phosphorylation of FAK on tyrosine was revealed by western blot using anti-phosphotyrosine antibodies. Fig. 2C shows a 1.3 fold

more intense pFAK signal in MPSIIIB than in control astrocytes. FAK phosphorylation induces the formation of FAK-Src complexes, which phosphorylate paxillin on tyrosine 118 (pPaxillin). Immunostaining of mouse astrocytes with anti-pPaxillin antibodies reveals more intense signal in MPSIIIB than in control astrocytes (Fig. 2D, supplemental Fig. S1C). Taken together, these results indicated that FA formation was intense in MPSIIIB astrocytes in culture conditions that did not stimulate FA formation in control astrocytes. Cell staining for F-actin with fluorescent phalloidin did not reveal major differences between MPSIIIB and control astrocytes at 24 hours. Noticeably, whereas FA were large and apparently mature, they were not associated with stress fibers at this stage (supplemental Fig. S2). Correction of the enzyme deficiency and subsequent clearance of HS saccharides using a lentivirus vector inducing the expression of the missing enzyme NAGLU led to equivalent levels of vinculin, pFAK and pPaxillin in MPSIIIB and control astrocytes (Fig 2), suggesting that increased FA formation in deficient MPSIIIB cells was related to the accumulation of partially digested HS saccharides.

**Impaired FA recruitment and Cdc42 activation in MPSIIIB astrocytes**

Integrin signaling and FA formation control the establishment of polarity in astrocytes (Etienne-Manneville & Hall, 2001; Peng et al, 2008). The establishment of astrocyte polarity can be investigated in wound healing assays. Scratching confluent astrocyte monolayer cultures stimulates colonization of the depopulated area by wound edge cells. This process involves the formation of new FAs at the leading edge of cells bordering the wound, Cdc42 RhoGTPase activation, and subsequent cell polarization and migration toward the depopulated area (Etienne-Manneville & Hall, 2001). We examined whether these events were affected in MPSIIIB astrocytes, as compared to wild type controls and to MPSIIIB astrocytes in which the enzyme defect had been corrected.

Immediately after the scratch, the FA markers pPaxillin or pFAK appeared as small dots distributed throughout the basal surface of the cells (Fig 3A). Thirty minutes later, pPaxillin staining, or pFAK staining were concentrated in larger patches at the cell wound edge. In contrast, in MPSIIIB cells, pPaxillin staining, or pFAK staining were unaffected by the wound and remained spread throughout the cell, indicating that FA formation at the cell leading edge was impaired in MPSIIIB astrocytes.

Concentration of pPaxillin and pFAK staining 30 minutes after scratch at the leading edge of MPSIIIB astrocytes that produced NAGLU after lentivirus gene transfer suggested that impaired FA recruitment was related to undigested HS saccharides accumulation.

Cdc42 bound to GTP is the activated form of Cdc42, which binds PAK. The formation of FA is associated with increased amounts of Cdc42-GTP at the leading edge (Osmani et al, 2006). We measured Cdc42-GTP amounts in astrocytes immediately, or 30 minutes after wound by pulling down Cdc42 bound to PAK using GST-PAK. Cdc42-GTP and total Cdc42 in cell extracts were revealed by western blot (Fig 3B). Whereas scratch was associated with an increased proportion of Cdc42-GTP in wild type cells after 30 minutes, this proportion did not increase in MPSIIIB astrocytes. After correction of the enzyme defect, MPSIIIB astrocytes behaved like wild type cells. These results indicated impaired Cdc42 activation in response to scratch in MPSIIIB, and suggested that this defect was related to the accumulation of partially digested HS saccharides.

**Impaired polarization and migration of MPSIIIB astrocytes**

In the wound healing assay, Cdc42 activation following scratch leads to re-positioning of the centrosome and the Golgi apparatus between the cell nucleus and the leading edge (Jaffe & Hall, 2005). We investigated astrocyte polarization in the insert removal assay, an equivalent of the wound healing assay in which, in order to avoid cell injury, stimulation to invade new spaces is induced by the removal of an obstacle instead of a scratch. Eight hours following insert removal, cells were stained with Hoechst, to reveal nuclei, anti-pericentrin antibodies to highlight centrosomes, and anti-GM130 antibodies to localize the Golgi apparatus (Fig. 4A). The proportion of cells in which the centrosome was localized within the quadrant facing the expected direction of migration was 72% in normal cells, and only 51% in MPSIIIB astrocytes (compared to 25% for random orientation). This result indicates a defect in the capacity of MPSIIIB cells to become oriented in response to the insert removal stimulus. This defect was corrected in MPSIIIB cells producing NAGLU after lentivirus-mediated gene transfer, suggesting that it was related to the accumulation of partially digested HS saccharides.

Defective FA recruitment, defective Cdc42 activation and defective orientation provided series of evidence for an altered control of polarization in MPSIIIB astrocytes. We therefore examined astrocyte migration in the insert removal assay using time-lapse video-microscopy. Cell nuclei were stained with Hoechst and their trajectory tracked for 8 hours (Fig. 4B). Whereas control cell displacement was most often directed toward the open space, the trajectories of MPSIIIB astrocytes were more tortuous and shorter, with more frequent displacement in the opposite direction with respect to the open space. We concluded that oriented cell migration was altered in MPSIIIB astrocytes.

**Impaired polarization of MPSIIIB human fibroblasts and MPSIIIB mouse neural stem cells**

We next examined whether cell orientation defects affected other MPSIIIB cell types than mouse astrocytes. Skin fibroblast cultures derived from three patients with MPSIIIB or from three unaffected controls were investigated in the insert removal assay. As for mouse astrocytes, the proportion of cells in which the centrosome was localized inside a 90-degree quadrant facing the expected direction of migration was scored using immunolabeling of the centrosome and the Golgi apparatus. This proportion was of 49.3% in patient cells, as compared to 69.5% in controls (Fig. 5A). After correction of the enzyme defect through lentivirus-mediated gene transfer the proportion of properly oriented cells was equivalent in patient (64.5%) and control cultures.

Neural stem cell cultures were established from the brain ganglionic eminences of MPSIIIB, or control mouse embryos. Cells forming neurospheres in suspension cultures were seeded on a laminin matrix, on which they attached and spread. Cells migrated out of the sphere in a centrifuge manner. In control cells, oriented migration was associated with centrosome positioning in front of the nucleus in the direction of movement. We scored the proportion of cells distant from the sphere center in which the centrosome was located within a 90-degree quadrant in front of the nucleus in the direction of migration (Fig. 5B). Whereas 73% of wild type neural stem cells were correctly oriented, this proportion was 58% for MPSIIIB cells, indicating alteration of cell orientation. This defect was corrected in MPSIIIB neural stem cells producing NAGLU after lentivirus-mediated gene transfer.

These results indicated that, as previously observed in mouse astrocytes, the accumulation of undigested HS saccharides was also associated with cell orientation defects in human fibroblasts and mouse neural stem cells.

**Exogenous HS activate integrin signaling and focal adhesion in normal astrocytes**

Further experiments were designed to explore direct links between HS saccharides and FA formation. For that purpose normal mouse astrocytes were exposed to various types and various concentrations of exogenous soluble HS saccharides added to the culture medium. Exogenous soluble saccharides are rapidly degraded in normal cells by endo- and exoglycanases following internalization by endocytosis or micropinocytosis. Consistently, addition of exogenous soluble HS saccharides to control astrocytes did not result in an increase of intracellular glycosaminoglycan levels (supplemental Fig. S3A). Therefore, addition of exogenous soluble HS saccharides mimicked the disease situation in which partially digested saccharide fragments are released in the extracellular environment trough exocytosis (supplemental Fig. S3B).

We first examined whether exogenous soluble HS saccharides purified from MPSIIIB patient's urine stimulated FA formation in mouse astrocytes grown on poly-ornithin substrate. Whereas urines from non-affected individuals contain almost uniquely chondroitin sulfate, urines of MPSIIIB patients contain high amounts of HS (Ausseil et al, 2008; Coppa et al, 2011). PAGE analysis of HS saccharide fragment size in samples purified from patient's urines detected molecules ranging from dp8 to long chains, with only trace amounts of shorter species (Supplemental Fig. S4A). Normal mouse astrocyte cultures were incubated for 1 hour in the presence of increasing concentrations of HS purified from MPSIIIB patient's urine, or of dextran sulfate as negative control (Fig. 6 and Supplemental Fig. S4B). Vinculin signal increased with patient's HS concentration. Material previously digested with heparinases, in which HS saccharide long chains, dp14 and dp8 were undetectable, was inactive. Dextran sulfate did not modify vinculin signal. These results demonstrated that HS purified from patient's urine, which essentially contained HS saccharides larger than dp8, had the capacity to stimulate FA when added to control mouse astrocyte cultures.

We next examined whether HS saccharides isolated from normal porcine tissues exhibited similar activity and whether this activity was associated with specific molecular species. Commercial porcine HS was submitted to heparinase III digestion to generate saccharides of random sizes. Digested HS were fractionated by high performance liquid chromatography to isolate pure preparations of disaccharides (dp2), octasaccharides (dp8), or tetradecasaccharides (dp14). Wild type mouse astrocytes were exposed to increasing concentrations of these various HS preparations for 1 hour and vinculin signal was measured. Data shows dose-response effects to long chain HS, dp14 and dp8, but not to dp2 (Fig. 7). The proportion of tyrosine-phosphorylated FAK was measured by immunoprecipitation and quantitative western blot in lysates from cells exposed to the highest HS concentrations. Results showed that HS long chains, dp14, and dp8 stimulated FAK phosphorylation, whereas dp2 and dextran sulfate did not (Fig. 8A). One-hour exposure to soluble HS did not modify β1-integrin expression (Supplemental Fig. S4C). These observations demonstrated that soluble HS saccharide fragments isolated from normal porcine tissue and consisting of 8 saccharides or more activated integrin signaling and FA formation when added to control mouse astrocyte cultures.

**HS saccharides activate FAK in human neuronal precursors**

The stimulation of FAK phosphorylation by HS was further investigated in human neural stem cells derived from iPSc. Control or MPSIIIB iPSc were generated from skin fibroblasts of a non-affected individual, or a MPSIIIB patient, respectively (Lemonnier et al, 2011). Human neuronal precursors (hNPs) were thereafter differentiated from these cultures (see material and methods).

hNPs cultures from the non-affected individual were exposed for 1 hour to commercial porcine HS (10µg/ml) or dextran sulfate (10µg/ml). The proportion of FAK phosphorylated on tyrosine in cell lysates was then examined by immunoprecipitation and western blot. Results indicated that HS addition to culture medium stimulated FAK phosphorylation in hNPs, as previously seen for mouse astrocytes (Fig. 8B).

The proportion of tyrosine-phosphorylated FAK was also examined in cell lysates of MPSIIIB patient's hNPs not exposed to exogenous HS. The levels of phosphorylated FAK were higher than in

non-affected hNPs not exposed to exogenous HS, and comparable to non-affected hNPs exposed to exogenous HS.

These results demonstrate that FAK was constitutively activated in patient's hNPs accumulating HS saccharides, and activated in response to exogenous soluble HS saccharide fragments in non-affected hNPs.

**Discussion**

Here, we show that soluble HS saccharide fragments activated FA formation. In MPSIIIB mouse astrocytes, partially digested soluble HS saccharides constitutively induced β1-integrin over-expression, recruited FAK, paxillin, and vinculin at FAs, and activated FAK. Constitutive integrin activation impaired appropriate response to acute extracellular cues and affected proper polarization and oriented migration of affected cells. These functional defects may be related to cellular disorders, developmental damages, cognitive impairment and other neurological manifestations associated with MPSIIIB.

*HS affect the perception of environmental cues in various cell types*

Previous findings suggested possible involvement of integrins in cell disorders associated with MPSIIIB. Indeed, HS proteoglycans are co-receptors of growth factors and integrins (Kim et al, 2011), and intimate interactions exist between HS and many ECM components including laminin, vitronectin and fibronectin (Mahalingam et al, 2007; Xian et al, 2010). We also previously observed altered FGF-2 response in MPSIIIB patient's iPSc (Lemonnier et al, 2011), and the neural stem cell progeny of these cells showed altered expression of many genes encoding integrins, FGFs, FGF receptors, downstream effectors in these pathways and ECM components. Moreover, the Golgi matrix protein GM130, a multifunctional protein important for cell polarization and migration control (Nakamura, 2010), was detected at abnormally high levels in various affected cell types including mouse and human MPSIIIB neurons (Lemonnier et al, 2011; Vitry et al, 2010), and evidence was produced that this over-expression was related to the abnormal expansion and organization of the Golgi apparatus (Roy et al, 2012).

Cell polarization and oriented migration in response to environmental cues are commonly investigated in astrocyte monolayer (Etienne-Manneville, 2006). Molecular mechanisms have been almost entirely dissected (Etienne-Manneville et al, 2005; Gomes et al, 2005; Manneville et al, 2010; Palazzo et al, 2004). Our results revealed constitutive activation of FA formation in MPSIIIB astrocytes, which affected the polarization of these cells and their oriented migration in response to external stimuli. Correction of these defects following genetic correction of the enzyme deficiency

suggested that they were caused by partially digested HS saccharides. This conclusion was confirmed by the activation of FA in normal mouse astrocytes exposed to exogenous soluble HS saccharides. Results obtained in mouse astrocytes were completed with evidence for related alterations in other cell types. Polarization defects were observed in human MPSIIIB fibroblasts and mouse MPSIIIB neural stem cells. Constitutive FAK activation was detected in MPSIIIB iPSc-derived human neural stem cells. It is therefore likely that HS saccharides affected the perception of environmental cues in various affected cell types, including cells participating in CNS development and functions.

*Extracellular HS saccharide fragments activate focal adhesion*

Heparanase present in endocytic vesicles cleaves HS proteoglycans internalized from the cell surface, producing saccharide fragments of various sizes (Stringer & Gallagher, 1997). Further digestion by exoglycanases in lysosomes is impaired in MPSIIIB. In contrast to monosaccharides that are transferred to the cytosol for recycling (Sagne & Gasnier, 2008), partially digested saccharides cannot escape the endo-lysosomal compartment except through exocytosis, including lysosomal exocytosis which remains efficient in MPSIIIB cells (supplemental Fig S3). Minimal HS storage in intra-cellular vesicles, including vesicles bearing lysosomal markers (McGlynn et al, 2004; Roy et al, 2012), suggests intense elimination of partially digested HS saccharide fragments towards the extracellular environment. By exposing control astrocytes to exogenous soluble HS saccharides, we provided evidence that high concentrations of soluble HS saccharides in the cell environment induced constitutive activation of FA. Activation of FA was not due to internalized HS molecules since the intracellular HS pool was not increased (supplemental Fig S3), presumably because internalized HS were rapidly degraded by intracellular glycanases. We therefore assume that continuous release of soluble HS saccharides in the environment of MPSIIIB cells accounts for constitutive FA activation and impairs response to extracellular polarization cues.

*Mechanisms involved*

It is conceivable that soluble HS saccharide fragments induced integrin engagement through direct interaction with heterodimers, as shown for heparin binding to α5β1, αvβ3, and αvβ5 (Faye et al, 2009). Stimulation of integrin clustering by bound saccharide fragments may be sufficient for FA

activation. However, since HS interact with multiple partners, other mechanisms may be involved. FA formation in response to cell spreading on fibrillar fibronectin requires co-engagement of integrins and syndecan-4 through binding at different sites on fibronectin (Arrington & Yost, 2009; Pompe et al, 2006; Stepp et al, 2010). However, at high local density of fibronectin, FA formation relies solely on integrins (Dubash et al, 2009) and soluble HS fragments compete with integrins for fibronectin binding (Mahalingam et al, 2007). Basal induction of FA formation by fibronectin was probably minimal in our experiments, since astrocyte adhesion was mediated by poly-ornithin, and observations were made only 24 hours after plating, thus presumably in the presence of limited amounts of fibronectin produced by plated cells. According to previous reports (Gopal et al, 2010), we assume that interaction of soluble HS with fibronectin may have resulted in sufficient local increase of fibrillar fibronectin density to induce FA formation. HS saccharides may therefore have opposite effects on the adhesion process depending on fibronectin density, acting as inhibitors at high density (Mahalingam et al, 2007) and facilitators at low density. Comparable mechanisms involving growth factors and/or growth factor receptors are conceivable. Mechanisms may be associated and possibly synergic.

Our results indicate that whatever the HS saccharide partner involved in FAK activation, integrin, fibronectin, or other molecules, effective interaction requires longer chains than disaccharides. This finding is in agreement with structural requirement previously reported for effective interaction between HS saccharides and proteins (Sasisekharan et al, 2006). Interactions are modified by saccharide sulfation, which strongly modulates saccharide biological activity (Sarrazin et al, 2011). Our result suggest that measuring FAK activation is a rapid assay to investigating the biological activity of structurally homogeneous HS saccharide preparations and could provide a methodological approach to the "sulfation code" (Murrey & Hsieh-Wilson, 2008).

*Are cell defects in MPSIIIB related to FAK activation?*

Integrin and FAK activation promote localized microtubule stabilization and reorientation by Rho-mDia signaling (Palazzo et al, 2004) and Cdc42 signaling via APC/Dlg1 (Manneville et al, 2010) and CLASP recruitment (Kumar et al, 2009). Stabilization involves post-translational modifications including detyrosination and/or acetylation (Destaing et al, 2005; Goulimari et al, 2005). Acetylated

microtubules are anchored at Golgi by CLASP and at cis-Golgi nucleation sites by AKAP450, a partner of GM130 (Miller et al, 2009; Rivero et al, 2009). Golgi-derived microtubules grow towards the cell leading edge in a polarized manner, leading to the constitution of a microtubule array oriented in the direction of the cell movement (Vinogradova et al, 2009). This process is essential for cell polarization, post-Golgi trafficking and oriented cell migration (Efimov et al, 2007).

Cell defects observed in MPSIIIB cells might be related to these processes. Studies in HeLa cells accumulating HS saccharides after depletion of NAGLU by specific shRNAs showed an expansion of acetylated microtubules anchored at Golgi membranes and increased amounts of GM130 and AKAP450 localized at the Golgi (Roy et al, 2012). The Golgi apparatus was enlarged and deeply disorganized in NAGLU-depleted HeLa cells and in mouse and human affected neurons (Lemonnier et al, 2011; Roy et al, 2012; Vitry et al, 2010). We assume that the constitutive enhancement of microtubule stability subsequent to permanent over-activation of the integrin pathway accounts for the increase recruitment of AKAP450 and GM130 at the Golgi surface, and for subsequent intracellular vacuolation, Golgi alterations, cell polarization and oriented migration defects.

*Constitutive FAK activation and neuropathology in MPSIIIB*

Observations in adult MPSIIIB mice do not reveal CNS malformation (Li et al, 1999; Vitry et al, 2010). Although affected children show severe brain atrophy at advanced stages of the disease, brain imaging does not reveal serious anomalies at presymptomatic stages. Early neuroblasts migration establishing cortical lamination and late interneurons tangential migration in cortical laminae are therefore not affected by the disease. The identification of more subtle deleterious effects possibly caused by HS saccharides accumulating in brain tissue requires further studies. Alterations may concern neuronal polarity. Genetic ablation of β1-integrin in mouse dorsal telencephalic progenitors, which also preserves cortical development and lamination, affects neuron polarization (Lei et al, 2012). They may also concern connectivity development since HS participate in the determination of axonal identity (Lafont et al, 1992; Nishimura et al, 2010), modulate Slit2-Robo-1 interactions (Ronca et al, 2001) and affect neuritogenesis in vitro (Hocquemiller et al, 2010). It will be crucial to identify brain damages in MPSIII and to determine at which stage of the disease they cause irreversible lesions

in the perspective of a possible prevention of HS saccharide accumulation in the brain through local enzyme supply (Crawley et al, 2011; Ellinwood et al, 2010).

## Materials and Methods

### Antibodies and reagents

Cell culture reagents, media, normal goat serum (NGS) and buffer saline (DPBS) were from InVitrogen, fetal calf serum (FCS) was from PAA Laboratories. The following primary antibodies were used in immunofluorescence analysis: β1 integrin (CD29), rat IgG2a, clone 9EG7 (BD biosciences) 1/50; Vinculin, mouse IgG1, clone hVIN-1 (Sigma-Aldrich) 1/150; pFAK tyr 397, rabbit (Cell signaling) 1/100; pPaxillin tyr118, rabbit (Cell signaling) 1/50; mouse pericentrin, rabbit (Covance) 1/500; human pericentrin, rabbit (AbCam) 1/1000; GM130, mouse IgG1, clone 35 (BD biosciences) 1/500; LAMP1, rat IgG2b, clone 1DB4 (BD biosciences) 1/500 and for western blot analysis: FAK, mouse IgG1, clone 4.47 (Millipore) 1/500; pTyr, mouse IgG2a, clone PY69 (BD biosciences) 1/500; β1 integrin CD29, mouse IgG1, clone 18/CD29 (BD biosciences) 1/1000; Cdc42, mouse No 240201 (Cell biolabs) 1/500; GAPDH, rabbit (Sigma) 1/20000. TRITC-phalloidin was from Sigma.

### Animals

Mouse experiments were approved by the Institut Pasteur ethical committee for animal research and performed by authorized investigators (authorization no. 75-268, Ministère de l'Agriculture et de la Pêche). C57Bl/6NaGlu+/- mice were obtained from Pr. E. Neufeld (Li et al, 1999) C57Bl/6NaGlu-/- mutant pups were identified by PCR on DNA from tail-clipped.

### Viral vectors

Lentivirus vectors coding for human NAGLU were produced as previously described (Hocquemiller et al, 2010) and stocks were used at 1:5000 dilution in astrocyte, neural stem cell and fibroblast cultures.

### Mouse astrocyte cultures

Mouse astroytes were prepared as previously described with small modifications (Etienne-Manneville, 2006). Briefly ganglionic eminences, cortex and hippocampus were dissected from wild type or MPSIIIB mouse P0 pups and mechanically dissociated. Cells were seeded on polyornithine-coated (1.5µg/ml) plates and some MPSIIIB cells were treated with lentivirus coding for human NAGLU. Cells are kept at 37°C and 9%$CO_2$ during 3 days and then washed thoroughly by flushing 15 times in PBS. After 8 days confluent cells are passaged. At this step, routinely more than 90% of cells are positive for glial fibrillary acidic protein (GFAP).

### Mouse neural stem cell cultures and polarization

Neurospheres from wild type or MPSIIIB mouse E17 ganglionic eminences were prepared and grown as previously described (Vitry et al, 2010); Cell migration was induced by adhesion in the presence of

2% FCS onto coverslips previously coated with 50 µg/mL of poly-ornithine (Sigma) followed by 5µg/mL of laminin (Sigma). Neurospheres wee incubated 3 hours then fixed and immunolabeled for pericentrin and GM130 with Hoechst in order to determine the centrosome orientation during migration.

**Human fibroblasts, human induced pluripotent stem cells and human neural precursors**

Human fibroblasts and human induced pluripotent stem cells (hiPS) are cultivated as described in (Lemonnier et al, 2011). hiPS were differentiated into neural precursors as described in (Brennand et al, 2011; Kim et al, 2010). Briefly, embryoid bodies generated from hiPS are transferred to non-adherent plates. Colonies were maintained in suspension in DMEM-F12 with 20% Knockout serum replacement (KOSR), 1% non essential amino acid, 15mM HEPES and 100µM 2-mercaptoethanol during 3 days and then transferred in medium containing DMEM-F12, 2% B27 without vitamin A, 5µg/mL heparin (Sigma), 100µM 2-mercaptoethanol, 100ng/mL bFGF (Miltenyi) and 5µM Dorsomorphin (Sigma) during 10 days. Then, obtained spheres were plated onto poly-ornithine (20µg/mL) and laminin (10µg/mL) coated plates in hNP medium (50% DMEM-F12, 50% Neurobasal, 2% B27 without vitamin A, 1% N2, 100µM 2-mercaptoethanol). Visible rosettes formed within 10 days were manually dissected and cultured in hNP medium at high density. hNP were dissociated in Accutase and seeded at low density 3 days in hNP medium to allow neural differentiation (nestin positive) before treatment with heparan sulfate.

**Immunofluorescent labeling and quantification**

β1-integrin immunolabeling was performed in PBS on living astrocytes for 30 minutes at room temperature. After washes in DPBS, cells were fixed with DPBS 4% paraformaldehyde for 15min at room temperature and then incubated 1h at room temperature with primary antibodies diluted in DPBS, 1% BSA, 2% NGS, 0,1% saponin. Primary antibodies were revealed by 40 min incubation at room temperature with appropriate secondary antibodies conjugated to AlexaFluor® 488, 555 or 647 (Molecular Probes) and diluted in DPBS 1% BSA, 2% NGS. Coverslips were mounted in FluoromountG® (Southern Biotech).

Images were acquired with an Axioplan 2 imaging optic microscope equipped with Apotome and AxioCam TR camera controlled by the AxioVision software (Zeiss). Whatever the phenotype and/or treatment, time exposure was determined and thereafter kept constant for all markers analyzed in the experiment. Quantification was performed by measuring specific signal pixels relatively to total cell surface, using the Axiovision co-localization module. Fluorescent signal was binarised, keeping threshold constant for all acquisitions in the same experiment. High threshold allowed recording specific signals produced by vinculin, β1 integrin, pPaxillin and pFAK antibody immuno-staining. Low threshold produced background signal corresponding to the entire cell surface. Expression level was determined as the ratio of specific marker to whole cell surface signals.

**Centrosome reorientation of mouse astrocytes and human fibroblasts**

Cells were induced to migrate by silicone insert (Ibidi) removal. Cells were fixed after 8 hours. Then, centrosome and Golgi were immunolabeled with antibodies against pericentrin and GM130 respectively. Centrosome orientation was determined as previously described in (Etienne-Manneville, 2006). Centrosomes located in front of the nucleus, within the quadrant facing the wound, were scored as correctly oriented. A score of 25% represents the absolute minimum corresponding to random centrosome positioning.

**Time-lapse microscopy**

Confluent astrocytes seeded in plates containing insert were stained 5min with 0.5µg/ml of Hoechst 33342 (Sigma), then washes twice 5min in PBS and replaced with growth medium. After insert removal, images of migrating cells were acquired every 30 min during 8 with a Zeiss Observer Z1 microscope equipped with a 20x objective, a motorized turntable (Ludl), a thermostated chamber, a Colibri system and an Axiocam Mrm camera controlled by Axiovision AutoFocus (Definite Focus) software (Zeiss). Nuclei bordering the open space were tracked with the ImajeJ Manual Tracking module.

**Immunoprecipitation of FAK proteins**

One day before treatment, serum of culture medium was reduced to 0.3%. Low density cell cultures were treated 1 hour with 10µg/ml of HS fragments or dextran sulfate (~5kD, Sigma) and then washed with DPBS. Cells were lysed on ice for 2min in RIPA buffer (Sigma) containing a protease inhibitor cocktail and a phosphatase inhibitor cocktail (Roche) and 1U/µl of a Benzonase nuclease (Merck), followed by a 5min incubation at 37°C. FAK proteins were immunoprecipitated from 250µg of cell lysate proteins with 5µg of antibody against FAK clone 4.47 (Millipore) and protein G sepharose (4 Fast Flow, GE Healthcare) at 4°C. FAK proteins were eluted by 5min at 100°C in NuPAGE LSD sample buffer (InVitrogen) and NuPAGE sample reducing agent (InVitrogen). Phosphorylation of FAK on tyrosines was analyzed on western blot.

**Cdc42 pulldown**

Confluent astrocytes were starved 24h with 0.3% serum and subjected to multiple parallel and perpendicular scratches. Thirty minutes later, Cdc42 extraction and pull-down were performed with a Cdc42 activation assay kit according to the manufacturer recommendations (ref STA-402).

**Western blot analysis**

To obtain total protein extracts, cells were washed with DPBS, and lysed on ice for 2 min in RIPA buffer (Sigma) containing a protease inhibitor cocktail and a phosphatase inhibitor cocktail (Roche). 1

U/µl of a Benzonase nuclease (Merck) was added to the cell lysate, followed by 5min incubation at 37°C. Protein samples (10 µg) were resolved by SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using 7% Tris-acetate gels (InVitrogen). Gels were blotted onto Immoblion-FL PVDF membranes (Millipore), which were blocked with Odyssey blocking buffer (Li-Cor Biosciences). Membranes were incubated overnight at 4ºC with antibodies diluted in blocking buffer containing 0.1% Tween 20, washed with PBS 0.1% Tween 20, and revealed with secondary antibodies conjugated to AlexaFluor® 680 (Molecular Probes) or to Dylight® 800 (Thermo Scientific). Membranes were washed three times with PBS and visualized with the Odyssey imaging system (Li-Cor Biosciences).

**Quantitative RT-PCR**

Total RNA from astrocyte monolayer were extracted using RNeasy mini kit (Qiagen). One microgram of total RNA was used to synthesize cDNA with oligo (dT)12-18 (200 ng, Roche) and M-MLV reverse transcriptase (Superscript III, InVitrogen). Quantitative PCR was performed with a 7300 Real Time PCR system (Applied Biosystems) with 50 ng of cDNA. The primers and TaqMan probes were designed by Applied Biosystems. Reaction mixtures containing the primers, the TaqMan probe, and the TaqMan Universal PCR Master Mix were prepared according to Applied Biosystems procedures. Universal cycling conditions (2min at 50°C, 10min at 95°C, 40 cycles of 15sec at 95°C, and 1min at 60°C) were used. Each sample was analyzed in triplicate. Negative controls included omission of reverse transcriptase at the cDNA synthesis step and omission of the template at the PCR step. cDNA amounts were expressed as 2exp(Ct1-Ct2), in which Ct1 is a reference Ct measured for the amplification of GAPDH, the endogenous control cDNAs, and Ct2 is the Ct measured for the amplification of the examined cDNA.

**HS preparations**

HS were purified from patient's urines as previously described (Ausseil et al, 2008). Porcine intestinal mucosal HS (1 g) was digested with heparinase III (25 mU/ml) in 5 ml of 0.1 mg/ml BSA, 2 mM $CaCl_2$, 50 mM NaCl and 5 mM Tris buffer pH 7.5 for 72 h at 30 °C. The enzymatic reaction was stopped by heating the digest at 100°C for 5 min. The digestion products were then size-separated using a Bio-Gel P-10 column (4.4 x 150 cm), equilibrated with 0.2 M NaCl and run at 1 ml/min. Eluted material, detected by absorbance at 232 nm, consisted of a graded series of size-uniform oligosaccharides resolved from disaccharides (dp2) to octadecasaccharides (dp18). To ensure homogeneity, only the top fractions of each peak were pooled, and each isolated fraction was re-chromatographed on a gel filtration column to further eliminate possible contamination. Samples were extensively dialyzed against distilled water, freeze dried, weighted and diluted in distilled water.

**Statistical analysis**

Statistics were performed using the SPSS software (SPSS). The assumption that the values follow normal distribution was verified by the Shapiro-Wilk's test. Non-parametric tests were used when normal distribution was not assumed.

**Acknowledgements**

We are grateful to Dr. Bénédicte Héron, the physician in charge of Sanfilippo patient's follow-up and care, who provided us with patient's urine samples, and to Prof. Marc Tardieu for long-standing collaboration. We thank Monique Piraud, Dania Zhivaki, Stéphanie Bigou, Patricia Flamant for excellent technical help and Emmanuelle Perret at the Imagopole/Plateforme d'imagerie dynamique de l'Institut Pasteur for her help with videomicroscopy and image processing. This work was supported by ANR grant MNP-08-023.

**Conflict of interest**

The authors declared no conflict of interest.

**Author contribution**

Julie Bruyère conceived the study, performed the experiments, and prepared the manuscript.

Elise Roy contributed to cell imaging and other investigations.

Jérôme Ausseil conceived experiments involving purified heparan sulfate, and performed heparan sulfate preparations from patient's urine and PAGE analyses

Thomas Lemonnier, Guillaume Teyre and Delphine Bohl conceived experiments with human iPSc, isolated control and patient's iPSc, and generated human neural progenitors.

Sandrine Etienne-Manneville and Huges Lortat-Jacob contributed to the conception of the study.

Jean Michel Heard conceived the study, provided funding and prepared the manuscript.

Sandrine Vitry supervised the entire work and performed experiments.

**Figure legends**

**Figure 1. β1-integrin is over-expressed in MPSIIIB astrocytes.**

Astrocyte cultures were established from wild type or MPSIIIB mice. MPSIIIB mouse astrocytes were either untreated (MPSIIIB), or exposed to lentivirus vectors to induce the expression of NAGLU (MPSIIIB+NAGLU), the missing lysosomal enzyme in MPSIIIB. Panel A: β1-integrin (CD29) mRNA levels detected by quantitative RT-PCR and normalized according to GAPDH mRNA levels. Panel B: western blot of total protein extracts revealed with anti-β1-integrin (anti-CD29 clone 18, 130kD) and anti-GAPDH (36kD) antibodies. The histogram shows the relative intensity of CD29 versus GAPDH signals. Panel C: astrocytes were doubly immunolabeled with antibodies against the activated form of β1-integrin (anti-CD29 clone 9EG7, in purple) and antibodies against vinculin (in green). Nuclei were counterstained with Hoechst (in blue). Inset in the middle panel shows partial colocalization of β1-integrin and vinculin signals in FA. The histogram indicates fluorescent signal intensities relative to cell surface. Apotome sections, scale bars: 10µm. Data are from 3 independent astrocyte cultures, values are means ± SEM, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$, Mann-Whitney test (A, B, n=3) or Student's t-test (C, $n\geq60$ scored cells per condition).

**Figure 2. Focal adhesion contacts are more abundant in MPSIIIB astrocytes.**

Mouse astrocytes were prepared as for figure 1 and immunolabeled. Panel A: antibodies against vinculin (in green). Panel B: antibodies against vinculin combined with antibodies against FAK phosphorylated on tyrosine 397 (in purple). Panel C: total protein extracts were processed for immunoprecipitation of FAK and subsequent immunodetection of phosphorylated tyrosines (pTyr) by western blot. Histograms show intensity of 125kD tyrosine-phosphorylated protein signal relative to total FAK signals. Panel D: antibodies against vinculin combined with antibodies against paxillin phosphorylated on tyrosine 118 (in purple). Nuclei were counterstained in blue. Single labeling is shown in supplemental Figure S1. Apotome sections, scale bars: 10µm. Histograms indicate fluorescence signal intensities relative to cell surface. Data are from 3 independent astrocyte cultures, values are means ± SEM, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$, Student's t-test (A, B and D, $n\geq60$ cells per condition), Mann-Whitney test (C, n=3).

**Figure 3. Integrin signaling is defective in migrating MPSIIIB astrocytes**

Astrocyte monolayers were scratched and fixed immediately (0 min), or after 30 min. Panel A: cells were immunostained (in purple) for paxillin phosphorylated on tyrosine 118 (upper panel), or FAK phosphorylated on tyrosine 397 (lower panel). Nuclei were counterstained in blue. Apotome sections, scale bars: 10µm. Large grey dotted lines indicate the wound edge and thin dotted lines delineate the cell leading edge area in which immunofluorescence signal intensities were measured. Signal intensities relative to scored surface 30 min after scratch are shown in histograms. Panel B: total protein extracts were prepared immediately (0 min), or 30 min after scratch. Cdc42 was detected by western blot in total protein extracts, or after pull-down of the GTP-bound active form of Cdc42. Data are from 3 independent astrocyte cultures, values are means ± SEM, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$, Student's t-test (A, $n\geq70$ cells per condition), Mann-Whitney test (B, $n=3$).

**Figure 4. Centrosome polarization and migration defects in MPSIIIB astrocytes**

Astrocytes were seeded at high density in a plate containing a silicone insert. Insert removal creates an open space for colonization by migrating cells. Panel A: the expected direction of migration (toward the open space) is indicated by white arrows. The observed direction of migration was determined after eight hours of migration according to the relative position of the centrosome (pericentrin, in green), the Golgi (GM130 in purple), and the nucleus (in blue), and indicated as yellow arrows. Histogram indicates the proportion of polarized cells in which the observed direction of migration was inside a 90° quadrant centered on the nucleus and facing the open space. Panel B: migration was observed for 8 hours by time-lapse microscopy. Nuclei (stained with Hoechst) bordering the open space were pointed immediately after insert removal (0h) and tracked with the ImajeJ software. Colored lines represent individual nucleus trajectories. Histogram shows mean anterograde and retrograde distances traveled within 8 hours. Scale bars: 10µm. Values are means ± SEM of three independent astrocyte cultures. ***: $P<0.001$, Chi-square test (A, $n\geq500$ cells per condition), Student's t-test (B, $n\geq180$ cells per condition).

**Figure 5. Centrosome polarization defects in human MPSIIIB fibroblasts and in MPSIIIB neural stem cells**

Panel A: expected (white arrow) and observed (yellow arrow) migration directions of human fibroblasts were determined as described for astrocytes in figure 4. Panel B: mouse neural stem cells grown as free floating neurosphere aggregates were seeded onto laminin substrate. Adherent cells migrated in a centrifugal manner, the expected direction of migration. Cells were fixed after 3 hours and immunostained for the centrosomal protein pericentrin (in green) and the cis-Golgi marker GM130 (in purple). Nuclei were stained in blue. The observed direction of migration was determined according to the respective position of the centrosome, the Golgi and the nucleus. The proportion of cells in which the observed direction of migration was in a 90° quadrant centered on nucleus and facing the expected direction of migration was scored. Scale bars: 10µm. Values are means of total cell number of three independent cultures of patient fibroblasts, and three independent cultures of neurospheres. ***P<0.001, Chi-square test (n≥500 cells per condition).

**Figure 6. Induction of focal adhesion contacts by extracellular HS derived from MPSIIIB patients**

Wild type mouse astrocytes were seeded at low density for 23 hours. Panel A: cells were either untreated (control), or incubated for one hour with dextran sulfate (5µg/ml), or heparan sulfate saccharides purified from MPSIIIB patient urines (patient 1 HS and patient 2 HS, 5µg/ml) before fixation and immunodetection of vinculin (in green). Panel B: histograms show the quantification of vinculin signal relative to cell surface. Panel C: cells were incubated with increasing concentrations of HS saccharides purified from MPSIIIB patient urine (patient 1 HS and patient 2 HS, 0.5 ng/ml to 5µg/ml). Histograms show vinculin signal relative to cell surface. Apotome sections, scale bars: 10µm. Values are means ± SEM of three independent astrocyte cultures. *: $P<0.05$, **: $P<0.01$ and ***: $P<0.001$ as compared to control, Student's t-test ($n\geq60$ cells per condition).

**Figure7. Induction of focal adhesion contacts by extracellular commercial HS**

Wild type mouse astrocytes were seeded at low density for 23 hours. Panel A: cells were either untreated (control), or incubated for one hour with undigested and non-fractionated commercial porcine HS (undigested HS, 5µg/ml), or size-purified disaccharides (dp2, 5µg/ml), octasaccharides (dp8, 5µg/ml), or tetradecasaccharides (dp14, 5µg/ml) generated by heparinase III digestion of commercial porcine HS followed by chromatography purification. Cells were then fixed for immunodetection of vinculin (in green). Panel B: cells were incubated with increasing concentrations (0.5ng/ml to 5µg/ml) of dp2, dp8, dp14, or undigested and non-fractionated commercial porcine HS. Histograms show vinculin signal relative to cell surface. Apotome sections, scale bar: 10µm. Values are means ± SEM of three independent astrocyte cultures. *: $P<0.05$, **: $P<0.01$ and ***: $P<0.001$ as compared to control, Student's t-test ($n\geq60$ cells per condition).

**Figure 8. Activation of FAK phosphorylation by exogenous HS in mouse astrocytes and in human neuronal precursors**

Pane A: mouse astrocytes were either untreated (control), or incubated for one hour with dextran sulfate (10µg/ml), or undigested and non-fractionated commercial porcine HS (undigested HS, 10µg/ml), or size-purified disaccharides (dp2 HS, 10µg/ml), octasaccharides (dp8 HS, 10µg/ml), or tetradecasaccharides (dp14 HS, 10µg/ml). Total protein extracts were processed for immunoprecipitation of FAK and subsequent immunodetection of phosphorylated tyrosines (pTyr) by western blot. Histograms show intensity of 125kD tyrosine-phosphorylated protein signal relative to total FAK signal. Panel B: human neural progenitor cultures were generated from iPS cells derived from a normal individual (wild type), or from patients with MPSIIIB (MPSIIIB). Normal cells were either untreated (control), or incubated for one hour with dextran sulfate (10µg/ml), or undigested and non-fractionated commercial porcine HS (undigested HS, 10µg/ml). Total protein extracts were processed for immunoprecipitation of FAK and subsequent immunodetection of phosphorylated tyrosines (pTyr) by western blot. Histograms show intensity of 125kD tyrosine-phosphorylated protein signal relative to total FAK signals. Values are means ± SEM of three independent cultures. *: $P<0.05$, **: $P<0.01$ and ***: $P<0.001$, Mann-Whitney test (A, n=3; B n=4).

**References**


Arrington CB, Yost HJ (2009) Extra-embryonic syndecan 2 regulates organ primordia migration and fibrillogenesis throughout the zebrafish embryo. *Development* **136**(18)**:** 3143-3152

Ausseil J, Desmaris N, Bigou S, Attali R, Corbineau S, Vitry S, Parent M, Cheillan D, Fuller M, Maire I, Vanier MT, Heard JM (2008) Early neurodegeneration progresses independently of microglial activation by heparan sulfate in the brain of mucopolysaccharidosis IIIB mice. *PLoS One* **3**(5)**:** e2296

Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D (2010) Integrins. *Cell Tissue Res* **339**(1)**:** 269-280

Bonneh-Barkay D, Wiley CA (2009) Brain extracellular matrix in neurodegeneration. *Brain Pathol* **19**(4)**:** 573-585

Brennand KJ, Simone A, Jou J, Gelboin-Burkhart C, Tran N, Sangar S, Li Y, Mu Y, Chen G, Yu D, McCarthy S, Sebat J, Gage FH (2011) Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature* **473**(7346)**:** 221-225

Coppa GV, Buzzega D, Zampini L, Maccari F, Galeazzi T, Padella L, Santoro L, Gabrielli O, Volpi N (2011) Agarose-gel electrophoresis for the diagnosis of mucopolysaccharidoses. *Clin Chem Lab Med* **50**(3)**:** 589-592

Couchman JR (2010) Transmembrane signaling proteoglycans. *Annu Rev Cell Dev Biol* **26:** 89-114

Crawley AC, Marshall N, Beard H, Hassiotis S, Walsh V, King B, Hucker N, Fuller M, Jolly RD, Hopwood JJ, Hemsley KM (2011) Enzyme replacement reduces neuropathology in MPS IIIA dogs. *Neurobiol Dis* **43**(2)**:** 422-434

de Wit J, Verhaagen J (2007) Proteoglycans as modulators of axon guidance cue function. *Adv Exp Med Biol* **600:** 73-89

Destaing O, Saltel F, Gilquin B, Chabadel A, Khochbin S, Ory S, Jurdic P (2005) A novel Rho-mDia2-HDAC6 pathway controls podosome patterning through microtubule acetylation in osteoclasts. *J Cell Sci* **118**(Pt 13)**:** 2901-2911

Dubash AD, Menold MM, Samson T, Boulter E, Garcia-Mata R, Doughman R, Burridge K (2009) Chapter 1. Focal adhesions: new angles on an old structure. *Int Rev Cell Mol Biol* **277:** 1-65

Efimov A, Kharitonov A, Efimova N, Loncarek J, Miller PM, Andreyeva N, Gleeson P, Galjart N, Maia AR, McLeod IX, Yates JR, 3rd, Maiato H, Khodjakov A, Akhmanova A, Kaverina I (2007) Asymmetric CLASP-dependent nucleation of noncentrosomal microtubules at the trans-Golgi network. *Dev Cell* **12**(6)**:** 917-930

Ellinwood NM, Ausseil J, Desmaris N, Bigou S, Liu S, Jens JK, Snella EM, Mohammed EE, Thomson CB, Raoul S, Joussemet B, Roux F, Cherel Y, Lajat Y, Piraud M, Benchaouir R, Hermening S, Petry H, Froissart R, Tardieu M, Ciron C, Moullier P, Parkes J, Kline KL, Maire I, Vanier MT, Heard JM, Colle MA (2010) Safe, efficient, and reproducible gene therapy of the brain in the dog models of Sanfilippo and Hurler syndromes. *Mol Ther* **19**(2)**:** 251-259

Etienne-Manneville S (2006) In vitro assay of primary astrocyte migration as a tool to study Rho GTPase function in cell polarization. *Methods Enzymol* **406:** 565-578

Etienne-Manneville S, Hall A (2001) Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta. *Cell* **106**(4)**:** 489-498

Etienne-Manneville S, Manneville JB, Nicholls S, Ferenczi MA, Hall A (2005) Cdc42 and Par6-PKCzeta regulate the spatially localized association of Dlg1 and APC to control cell polarization. *J Cell Biol* **170**(6)**:** 895-901

Faye C, Moreau C, Chautard E, Jetne R, Fukai N, Ruggiero F, Humphries MJ, Olsen BR, Ricard-Blum S (2009) Molecular interplay between endostatin, integrins, and heparan sulfate. *J Biol Chem* **284**(33)**:** 22029-22040

Gomes ER, Jani S, Gundersen GG (2005) Nuclear movement regulated by Cdc42, MRCK, myosin, and actin flow establishes MTOC polarization in migrating cells. *Cell* **121**(3)**:** 451-463

Gopal S, Bober A, Whiteford JR, Multhaupt HA, Yoneda A, Couchman JR (2010) Heparan sulfate chain valency controls syndecan-4 function in cell adhesion. *J Biol Chem* **285**(19)**:** 14247-14258

Goulimari P, Kitzing TM, Knieling H, Brandt DT, Offermanns S, Grosse R (2005) Ga12/13 is essential for directed cell migration and localized Rho-Dia1 function. *J Biol Chem* **280**(51)**:** 42242-42251

Hocquemiller M, Vitry S, Bigou S, Bruyere J, Ausseil J, Heard JM (2010) GAP43 overexpression and enhanced neurite outgrowth in mucopolysaccharidosis type IIIB cortical neuron cultures. *J Neurosci Res* **88**(1)**:** 202-213

Jaffe AB, Hall A (2005) Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21:** 247-269

Kim DS, Lee JS, Leem JW, Huh YJ, Kim JY, Kim HS, Park IH, Daley GQ, Hwang DY, Kim DW (2010) Robust enhancement of neural differentiation from human ES and iPS cells regardless of their innate difference in differentiation propensity. *Stem Cell Rev* **6**(2)**:** 270-281

Kim SH, Turnbull J, Guimond S (2011) Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J Endocrinol* **209**(2)**:** 139-151

Kumar P, Lyle KS, Gierke S, Matov A, Danuser G, Wittmann T (2009) GSK3beta phosphorylation modulates CLASP-microtubule association and lamella microtubule attachment. *J Cell Biol* **184**(6)**:** 895-908

Lafont F, Rouget M, Triller A, Prochiantz A, Rousselet A (1992) In vitro control of neuronal polarity by glycosaminoglycans. *Development* **114**(1)**:** 17-29

Legate KR, Wickstrom SA, Fassler R (2009) Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes Dev* **23**(4)**:** 397-418

Lei WL, Xing SG, Deng CY, Ju XC, Jiang XY, Luo ZG (2012) Laminin/beta1 integrin signal triggers axon formation by promoting microtubule assembly and stabilization. *Cell Res* **22**(6)**:** 954-972

Lemonnier T, Blanchard S, Toli D, Roy E, Bigou S, Froissart R, Rouvet I, Vitry S, Heard JM, Bohl D (2011) Modeling neuronal defects associated with a lysosomal disorder using patient-derived induced pluripotent stem cells. *Hum Mol Genet* **20**(18)**:** 3653-3666

Li HH, Yu WH, Rozengurt N, Zhao HZ, Lyons KM, Anagnostaras S, Fanselow MS, Suzuki K, Vanier MT, Neufeld EF (1999) Mouse model of Sanfilippo syndrome type B produced by targeted disruption of the gene encoding a-N-acetylglucosaminidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(25)**:** 14505-14510

Maeda N, Ishii M, Nishimura K, Kamimura K (2011) Functions of chondroitin sulfate and heparan sulfate in the developing brain. *Neurochem Res* **36**(7)**:** 1228-1240

Mahalingam Y, Gallagher JT, Couchman JR (2007) Cellular adhesion responses to the heparin-binding (HepII) domain of fibronectin require heparan sulfate with specific properties. *J Biol Chem* **282**(5)**:** 3221-3230

Manneville JB, Jehanno M, Etienne-Manneville S (2010) Dlg1 binds GKAP to control dynein association with microtubules, centrosome positioning, and cell polarity. *J Cell Biol* **191**(3)**:** 585-598

McGlynn R, Dobrenis K, Walkley SU (2004) Differential subcellular localization of cholesterol, gangliosides, and glycosaminoglycans in murine models of mucopolysaccharide storage disorders. *J Comp Neurol* **480**(4)**:** 415-426

Miller PM, Folkmann AW, Maia AR, Efimova N, Efimov A, Kaverina I (2009) Golgi-derived CLASP-dependent microtubules control Golgi organization and polarized trafficking in motile cells. *Nat Cell Biol* **11**(9)**:** 1069-1080

Moissoglu K, Schwartz MA (2006) Integrin signalling in directed cell migration. *Biol Cell* **98**(9)**:** 547-555

Morgan MR, Humphries MJ, Bass MD (2007) Synergistic control of cell adhesion by integrins and syndecans. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(12)**:** 957-969

Murrey HE, Hsieh-Wilson LC (2008) The chemical neurobiology of carbohydrates. *Chem Rev* **108**(5)**:** 1708-1731

Nakamura N (2010) Emerging new roles of GM130, a cis-Golgi matrix protein, in higher order cell functions. *J Pharmacol Sci* **112**(3)**:** 255-264

Neufeld EF, Muenzer J (2001) The mucopolysaccharidoses. In *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds), McGraw-Hill edn, 136, pp 3421-3452. New York: SSIEM and Kluwer Academic Publishers

Nishimura K, Ishii M, Kuraoka M, Kamimura K, Maeda N (2010) Opposing functions of chondroitin sulfate and heparan sulfate during early neuronal polarization. *Neuroscience* **169**(4)**:** 1535-1547

Osmani N, Vitale N, Borg JP, Etienne-Manneville S (2006) Scrib controls Cdc42 localization and activity to promote cell polarization during astrocyte migration. *Curr Biol* **16**(24)**:** 2395-2405

Palazzo AF, Eng CH, Schlaepfer DD, Marcantonio EE, Gundersen GG (2004) Localized stabilization of microtubules by integrin- and FAK-facilitated Rho signaling. *Science* **303**(5659)**:** 836-839

Peng H, Shah W, Holland P, Carbonetto S (2008) Integrins and dystroglycan regulate astrocyte wound healing: the integrin beta1 subunit is necessary for process extension and orienting the microtubular network. *Dev Neurobiol* **68**(5)**:** 559-574

Pompe T, Starruss J, Bobeth M, Pompe W (2006) Modeling of pattern development during fibronectin nanofibril formation. *Biointerphases* **1**(3)**:** 93-97

Prinz R, Klein U, Sudhakaran PR, Sinn W, Ullrich K, von Figura K (1980) Metabolism of sulfated glycosaminoglycans in rat hepatocytes. Synthesis of heparan sulfate and distribution into cellular and extracellular pools. *Biochim Biophys Acta* **630**(3)**:** 402-413

Rivero S, Cardenas J, Bornens M, Rios RM (2009) Microtubule nucleation at the cis-side of the Golgi apparatus requires AKAP450 and GM130. *EMBO J* **28**(8)**:** 1016-1028

Rodriguez A, Webster P, Ortego J, Andrews NW (1997) Lysosomes behave as Ca2+-regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells. *J Cell Biol* **137**(1)**:** 93-104

Ronca F, Andersen JS, Paech V, Margolis RU (2001) Characterization of Slit protein interactions with glypican-1. *J Biol Chem* **276**(31)**:** 29141-29147

Roy E, Bruyere J, Flamant P, Bigou S, Ausseil J, Vitry S, Heard JM (2012) GM130 gain-of-function induces cell pathology in a model of lysosomal storage disease. *Hum Mol Genet* **21**(7)**:** 1481-1495

Sagne C, Gasnier B (2008) Molecular physiology and pathophysiology of lysosomal membrane transporters. *J Inherit Metab Dis*

Sarrazin S, Lamanna WC, Esko JD (2011) Heparan sulfate proteoglycans. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**(7)

Sasisekharan R, Raman R, Prabhakar V (2006) Glycomics approach to structure-function relationships of glycosaminoglycans. *Annu Rev Biomed Eng* **8:** 181-231

Stepp MA, Daley WP, Bernstein AM, Pal-Ghosh S, Tadvalkar G, Shashurin A, Palsen S, Jurjus RA, Larsen M (2010) Syndecan-1 regulates cell migration and fibronectin fibril assembly. *Exp Cell Res* **316**(14)**:** 2322-2339

Stringer SE, Gallagher JT (1997) Heparan sulphate. *Int J Biochem Cell Biol* **29**(5)**:** 709-714

Vinogradova T, Miller PM, Kaverina I (2009) Microtubule network asymmetry in motile cells: role of Golgi-derived array. *Cell Cycle* **8**(14)**:** 2168-2174

Vitry S, Bruyere J, Hocquemiller M, Bigou S, Ausseil J, Colle MA, Prevost MC, Heard JM (2010) Storage vesicles in neurons are related to Golgi complex alterations in mucopolysaccharidosis IIIB. *Am J Pathol* **177**(6)**:** 2984-2999

Xian X, Gopal S, Couchman JR (2010) Syndecans as receptors and organizers of the extracellular matrix. *Cell Tissue Res* **339**(1)**:** 31-46

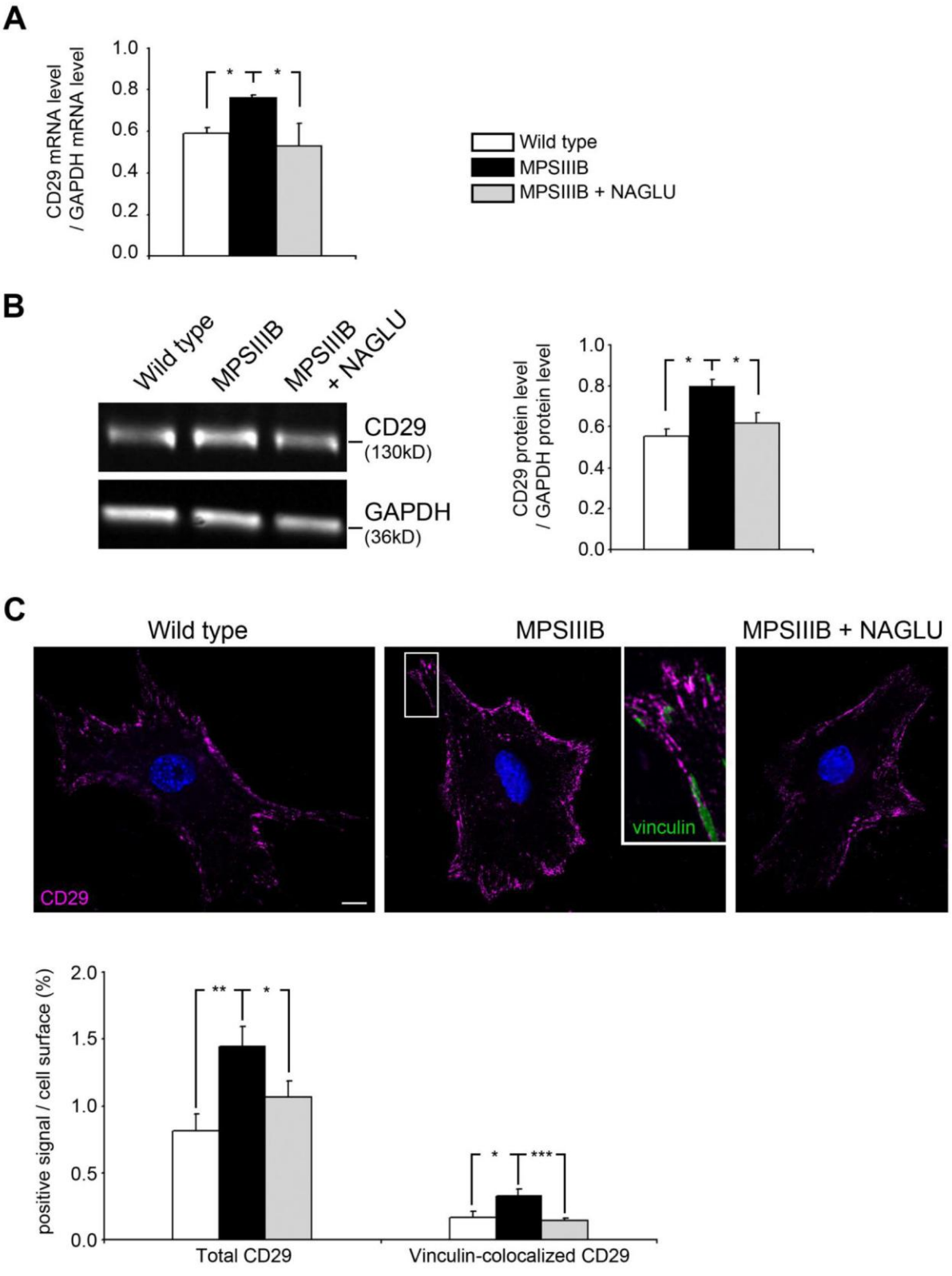

A
CD29 mRNA level / GAPDH mRNA level
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Wild type
MPSIIIB
MPSIIIB + NAGLU
B
Wild type
MPSIIIB
MPSIIIB + NAGLU
CD29
(130kD)
GAPDH
(36kD)
CD29 protein level / GAPDH protein level
C
Wild type
MPSIIIB
MPSIIIB + NAGLU
CD29
vinculin
positive signal / cell surface (%)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Total CD29
Vinculin-colocalized CD29

**Figure 1**

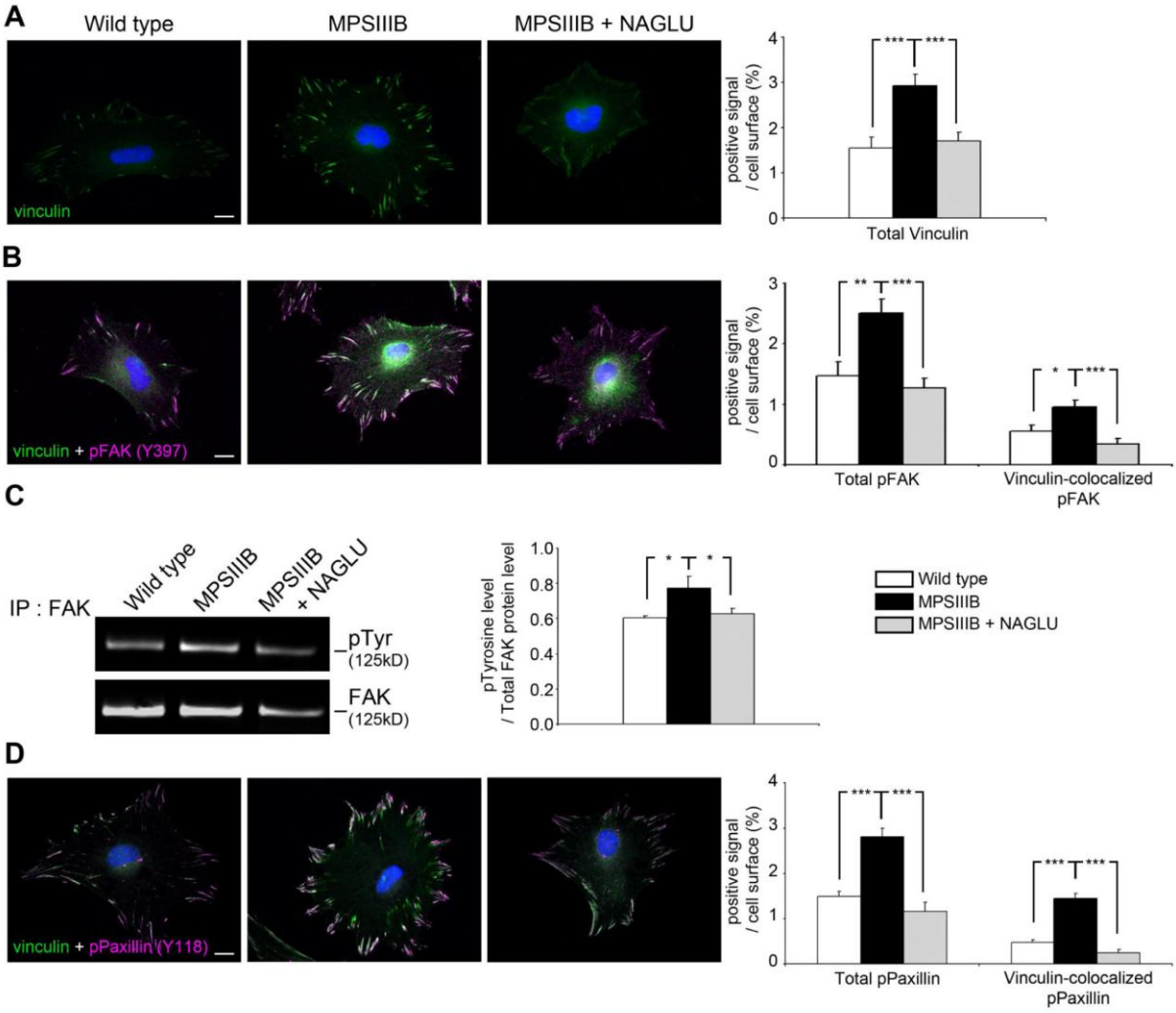

A
Wild type
MPSIIIB
MPSIIIB + NAGLU
vinculin
positive signal / cell surface (%)
Total Vinculin
B
vinculin + pFAK (Y397)
Total pFAK
Vinculin-colocalized pFAK
C
IP : FAK
Wild type
MPSIIIB
MPSIIIB + NAGLU
pTyr (125kD)
FAK (125kD)
pTyrosine level / Total FAK protein level
Wild type
MPSIIIB
MPSIIIB + NAGLU
D
vinculin + pPaxillin (Y118)
Total pPaxillin
Vinculin-colocalized pPaxillin

**Figure 2**

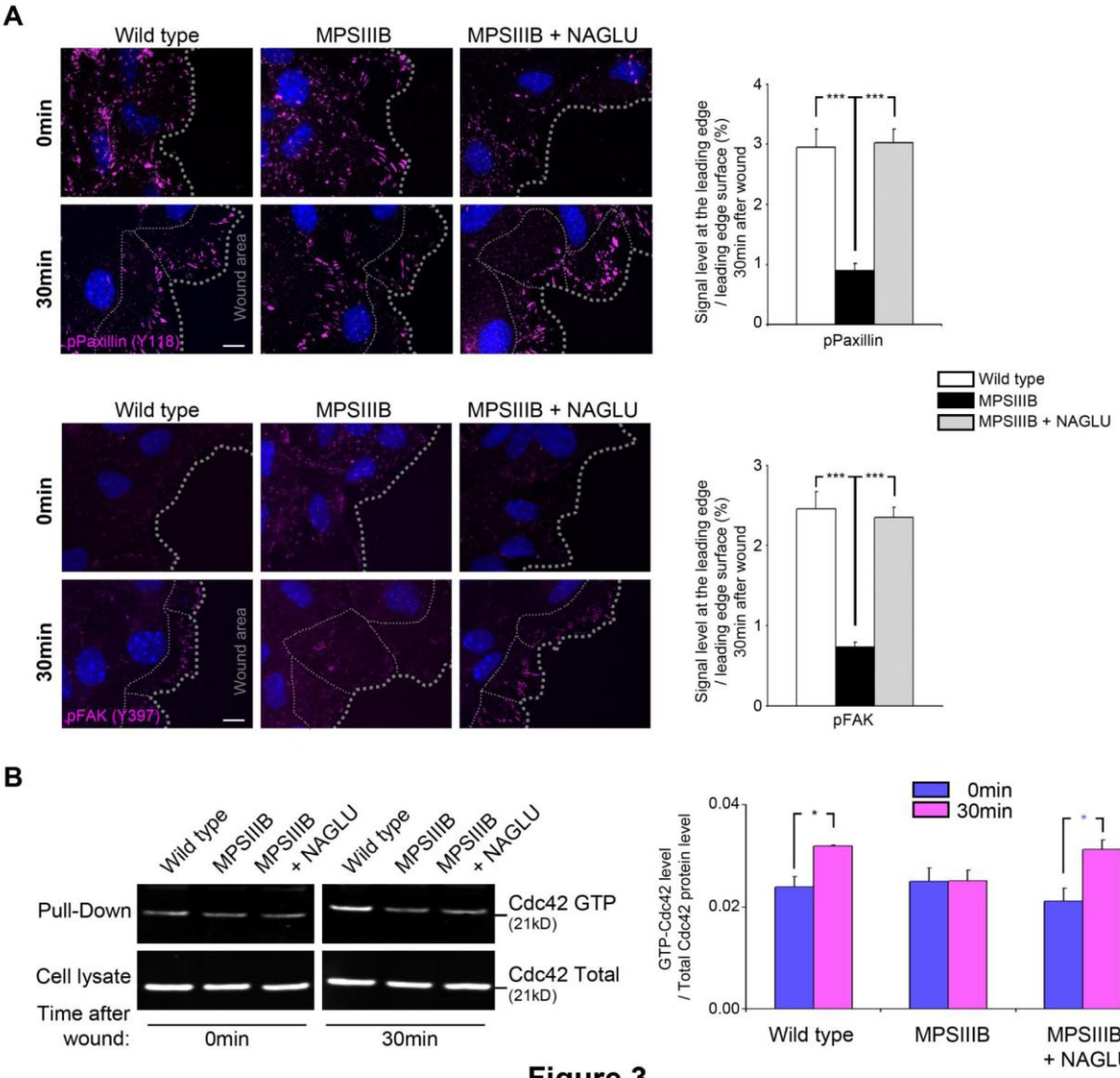

A
Wild type
MPSIIIB
MPSIIIB + NAGLU
0min
30min
Wound area
pPaxillin (Y118)
Signal level at the leading edge / leading edge surface (%) 30min after wound
pPaxillin
Wild type
MPSIIIB
MPSIIIB + NAGLU
pFAK (Y397)
pFAK
B
Pull-Down
Cell lysate
Time after wound:
Cdc42 GTP (21kD)
Cdc42 Total (21kD)
0min
30min
GTP-Cdc42 level / Total Cdc42 protein level

**Figure 3**

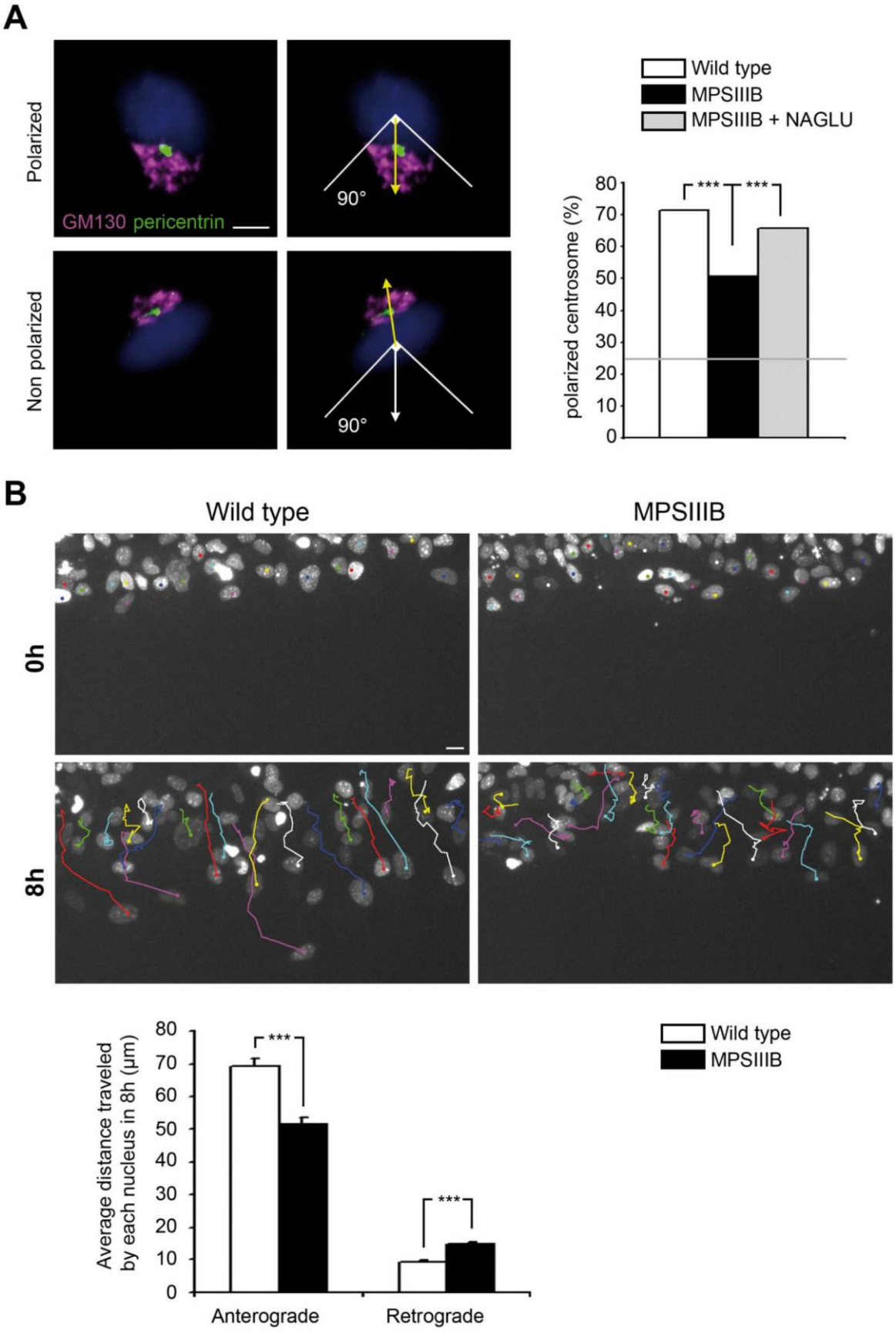

A
Polarized
Non polarized
GM130 pericentrin
90°
90°
Wild type
MPSIIIB
MPSIIIB + NAGLU
polarized centrosome (%)
***
***
B
Wild type
MPSIIIB
0h
8h
Average distance traveled by each nucleus in 8h (µm)
Wild type
MPSIIIB
***
***
Anterograde
Retrograde

**Figure 4**

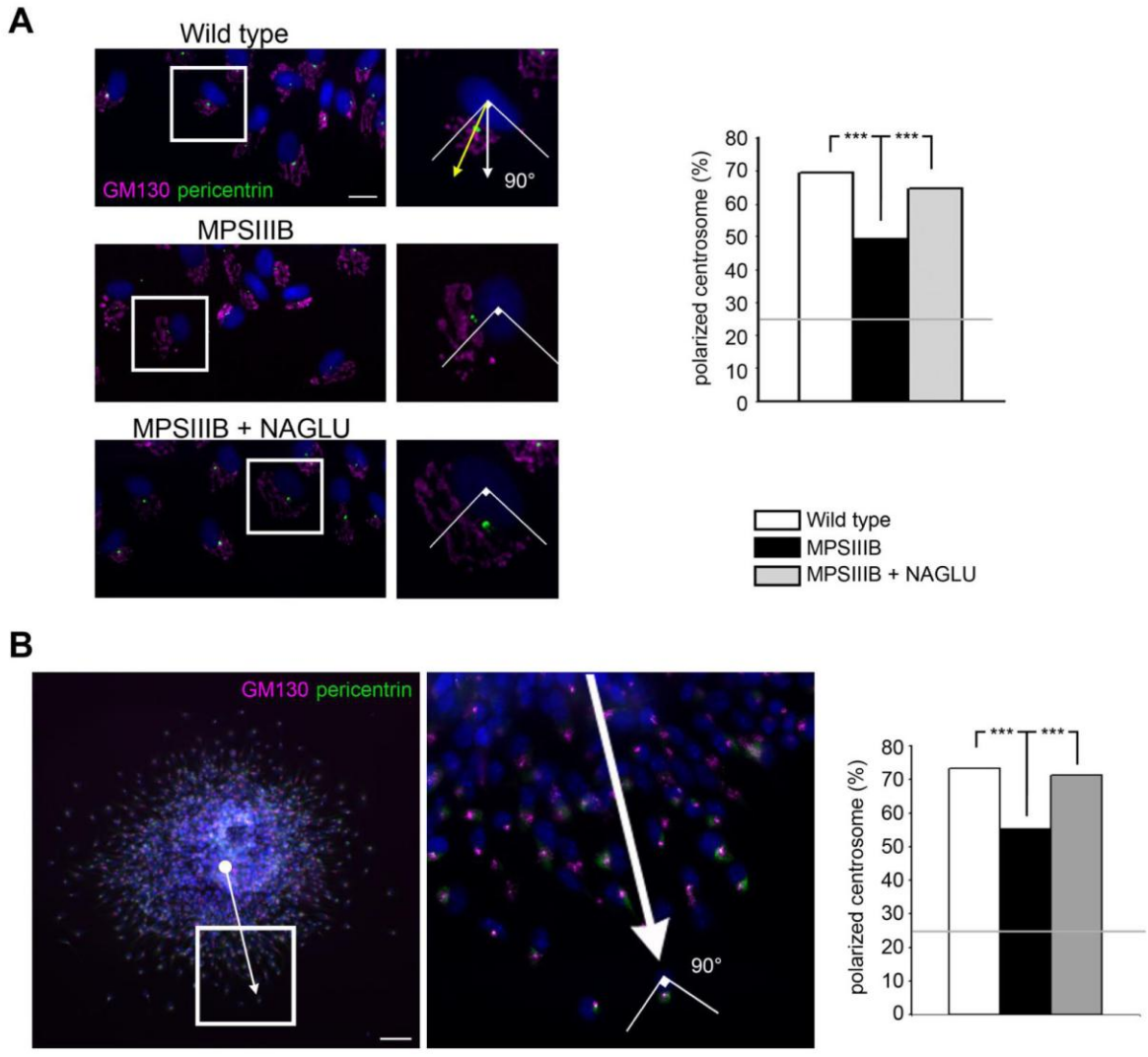

A
Wild type
GM130 pericentrin
90°
MPSIIIB
MPSIIIB + NAGLU
polarized centrosome (%)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
***
***
Wild type
MPSIIIB
MPSIIIB + NAGLU
B
GM130 pericentrin
90°
polarized centrosome (%)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
***
***

**Figure 5**

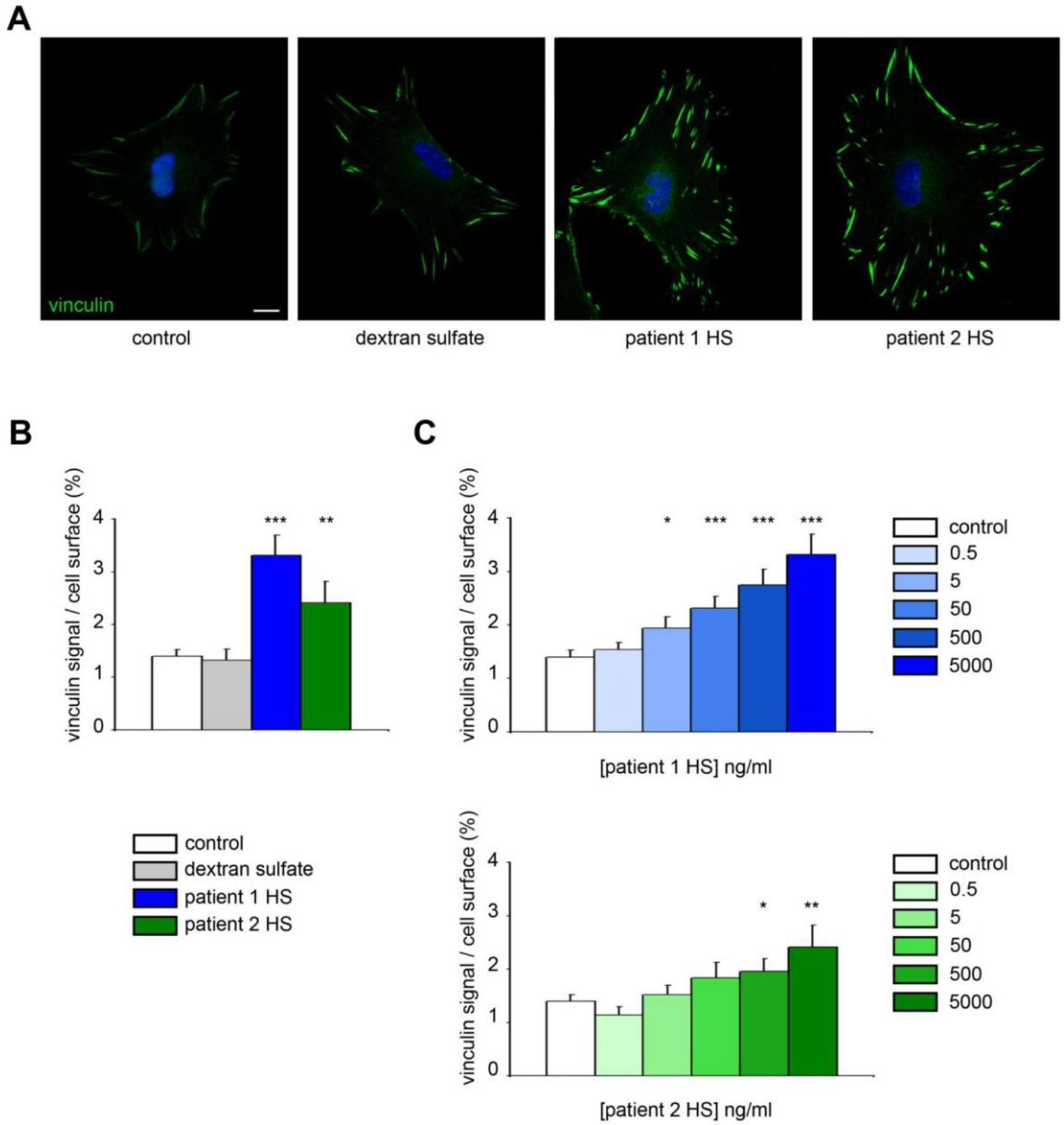

A
vinculin
control
dextran sulfate
patient 1 HS
patient 2 HS
B
vinculin signal / cell surface (%)
0
1
2
3
4
***
**
control
dextran sulfate
patient 1 HS
patient 2 HS
C
vinculin signal / cell surface (%)
*
***
***
***
control
0.5
5
50
500
5000
[patient 1 HS] ng/ml
vinculin signal / cell surface (%)
*
**
control
0.5
5
50
500
5000
[patient 2 HS] ng/ml

**Figure 6**

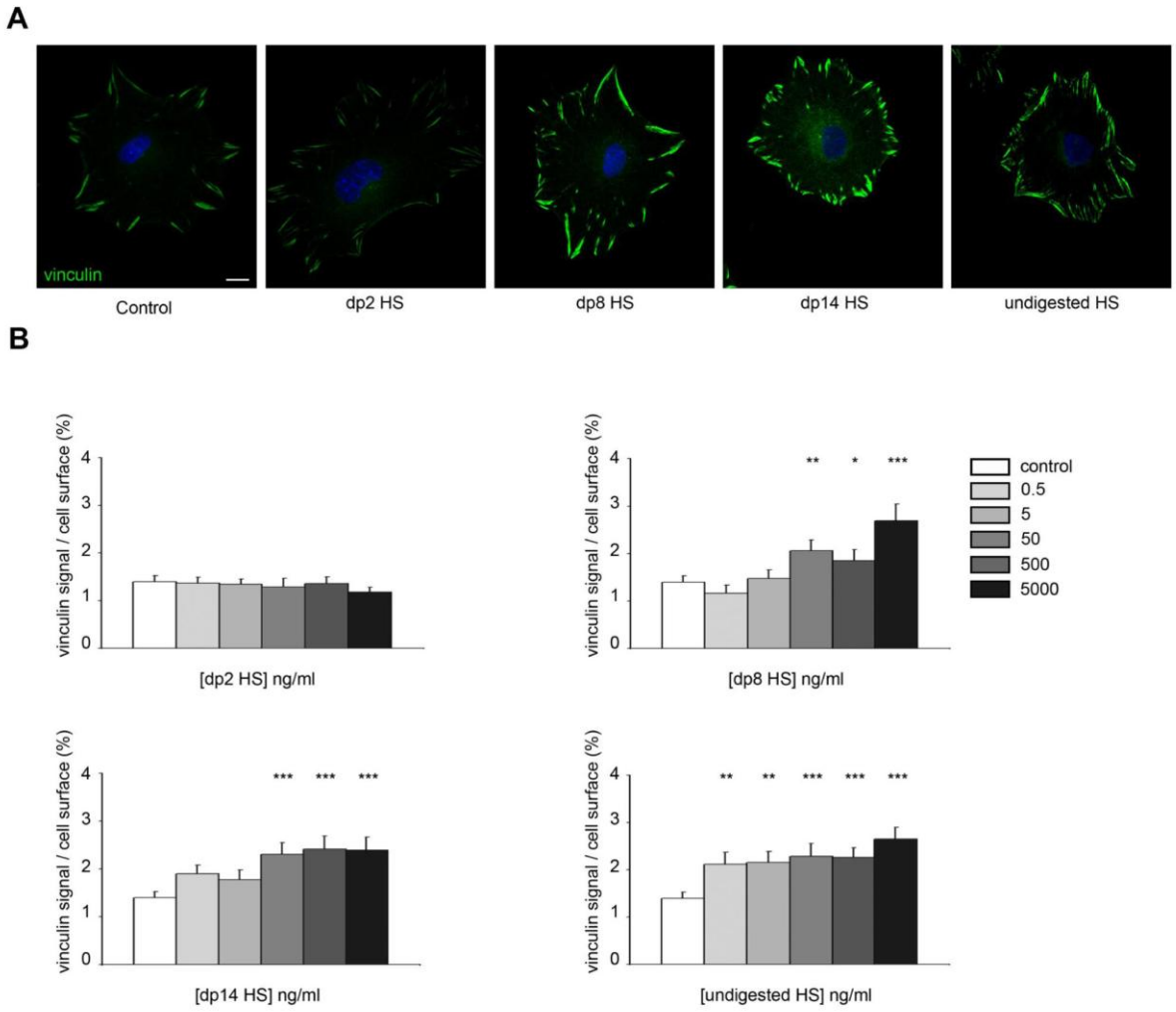



**Figure 7**

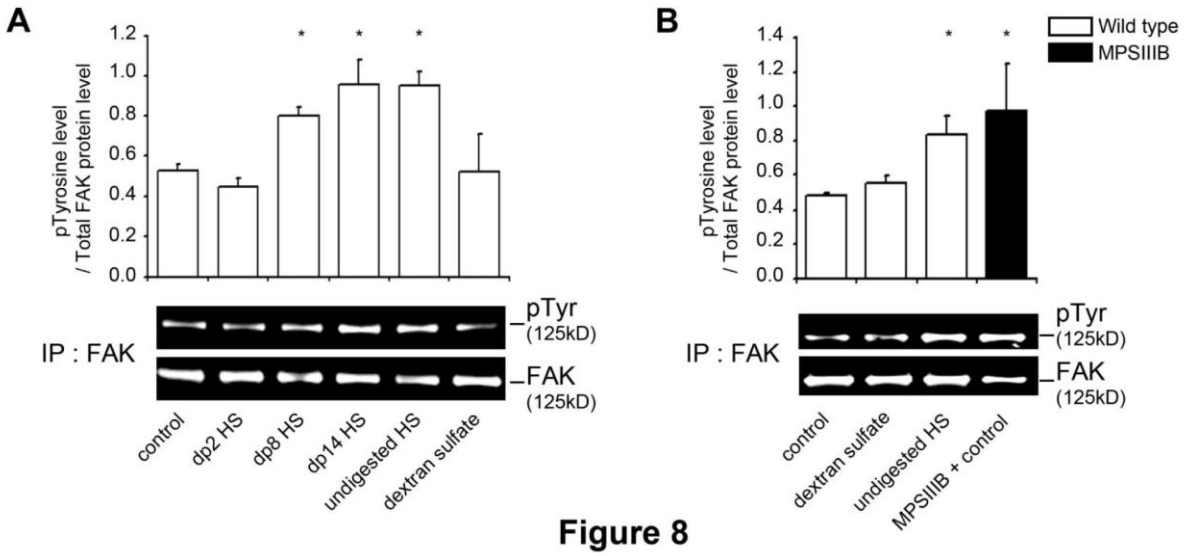



**Figure 8**

**Supplementary information**

**Supplemental Figure S1. Supplement to Figure 2.**

Astrocyte cultures were established from wild type or MPSIIIB mice. Panel A: mRNA levels of FAK, Paxillin and Vinculin detected by quantitative RT-PCR and normalized according to GAPDH mRNA levels. Mouse astrocytes were prepared as for figures 1 and 2 and immunolabeled. Panel B: single staining of cells doubly labeled with antibodies against vinculin (in green) and paxillin phosphorylated on tyrosine 118 (in purple). Panel C: single staining of cells doubly labeled with antibodies against vinculin (in green) and FAK phosphorylated on tyrosine 397 (in purple). Apotome sections, scale bars: 10µm.

**Supplemental Figure S2. Actin organization.**

Astrocytes, prepared as for figures 1 and 2, were doubly labeled with antibodies against vinculin (in green) and with fluorescent TRITC-phalloidin (in purple). Nuclei were counterstained in blue. Apotome sections, scale bar: 10µm.

**Supplemental Figure S3. Glycosaminoglycan storage and exocytosis**

Panel A: Glycosaminoglycan storage. Wild type mouse astrocytes (wild type), MPSIIIB mouse astrocytes (MPSIIIB), or MPSIIIB mouse astrocytes exposed to lentivirus vectors to induce the expression of NAGLU (MPSIIIB+NAGLU) were grown for 72h in the presence of $^{3}$H-glucosamine, then washed and pelleted. Wild type mouse astrocytes grown for 72h in the presence of $^{3}$H-glucosamine were incubated for 1h in the presence of undigested and non-fractionated commercial porcine HS (10µg/ml, wild type + 10µg/ml undigested HS) were similarly washed and pelleted. Radioactivity measured in cell pellets was normalized according to protein content. Histogram shows equivalent radioactivity levels in wild type astrocytes, MPSIIIB astrocytes producing NAGLU and wild type astrocytes incubated with HS, indicating that glycosaminoglycans did not accumulate in these cells. In contrast, higher radioactivity level in MPSIIIB astrocytes indicates glycosaminoglycan storage in cell pellets. Data are from 3 independent astrocyte cultures, values are means ± SEM, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$, Mann-Whitney test (n=3). Panel B: Exocytosis. Mouse astrocytes were exposed to 8mM calcium alone or in combination with 2.5µM ionomycin to stimulate lysosomal exocytosis, then stained with anti-LAMP1 antibodies and fixed. Lysosomal exocytosis stimulation resulted in increased cell surface LAMP1 signal in both control and MPSIIIB astrocytes, indicating efficient exocytosis in affected cells. Nuclei were counterstained in blue. Apotome sections, scale bars: 10µm.

**Supplemental Figure S4. Analysis of HS saccharide by PAGE, heparinase digestion and CD29 expression**

Panel A: PAGE analysis. Commercial porcine HS were either undigested (undigested HS), or digested by heparinase III and fractionated according to size to obtain pure preparations of tetrasaccharides (dp4), octasaccharides (dp8) and tetradecasaccharides (dp14). HS saccharides were purified from the urines of two patients with MPSIIIB (patient 1 HS and patient 2 HS) and either not treated or treated with heparinases (patient 1 HS + heparinases). HS preparations and dextran sulfate were separated in a 30% PAGE electrophoresis. Staining of the gel with Azure A revealed well-defined bands for dp8 and dp14. dp4 consisted in two bands presumably resulting from different sulfated saccharide species. Undigested HS show a predominant high molecular weight band, with trace amounts of lower molecular weight species. HS from patient 1 and 2 show high molecular weight signals associated with a smear indicating the presence of abundant amounts of low molecular weight materials of different sizes down to dp8. Absence of signal after heparinase treatment indicates nearly complete degradation of HS saccharides. Panel B: Wild type mouse astrocytes were incubated for 1h with increasing concentrations of HS saccharides purified from patient urine (0.5ng/ml to 5µg/ml), which were either previously digested with heparinases or untreated (similar to data shown in figure 8, except that samples were incubated overnight at 37°C in heparinase buffer). Cells were fixed and immunostained for vinculin to reveal FA. Histograms show that FA were not activated when HS saccharides had been previously digested by heparinases. Panel C: Wild type mouse astrocytes were untreated (control), or incubated for one hour with dextran sulfate (10µg/ml), or undigested and non-fractionated commercial porcine HS (undigested HS, 10µg/ml). Western blot of total protein extracts revealed with anti-β1-integrin (anti-CD29 clone 18, 130kD) and anti-GAPDH (36kD) antibodies. The histogram shows the relative intensity of CD29 versus GAPDH signals. Data are from 3 independent astrocyte cultures, values are means ± SEM, *: $P<0.05$, **: $P<0.01$, ***: $P<0.001$, Student's t-test (B, $n\geq60$ scored cells per condition) and Mann-Whitney test (C, n=3).

## SUPPLEMENTAL MATERIEL AND METHODS

### Heparinase treatment of patient HS

200µl (10µg) of patient 1 HS saccharides were completely digested using a mixture of heparinase I (5mIU), II (1mIU), and III (1mIU) diluted in heparinase solution (20mM Tris–HCl containing 0.1mg/mL bovine serum albumin (BSA) and 4mM $CaCl_2$, pH 7.0) at 37°C overnight. This step was repeated at 25°C overnight. Undigested control HS saccharides were incubated at 37°C overnight and at 25° overnight in enzyme buffer. The reaction was terminated, through enzyme denaturation, by heating the sample for 5 min at 100 °C. Heparinase digestion was analyzed using PAGE

### HS PAGE

Glycosaminoglycan samples were electrophoresed on 30% polyacrylamide gels. Oligosaccharide samples (40 µl), containing 1.5 µg UA, and marker samples dp4 (18µg), dp8 (6µg) and dp14 (3µg) were combined with 10% glycerol and trace amounts of phenol red and bromphenol blue. Electrophoresis was performed at 30 mA until the phenol red dye front was 1 cm from the bottom of the gel. Oligosaccharides within the resolving gel were stained with Azure A (Sigma).

### NAGLU enzyme assays

To determine NAGLU enzymatic activity, cells were lysated in water, submitted to 10 freeze thaw cycles, and clarified by centrifugation. Samples were diluted to a total protein concentration (determined with a Bradford protein assay kit) of 2 mg/ml, and the enzyme assay for NAGLU was carried out as previously described (Marsh and Fensom, 1985) using 4-methylumbelliferyl-N-acetyl-α-D-glucosaminide (4MU) (Merck, Nottingham, UK) as fluorogenic substrate. Hydrolysis of 1 nmol of substrate per hour per milligram of protein was defined as one catalytic unit.

### Glycosaminoglycan analysis

For metabolic labeling, cells were incubated 72h before harvesting with 10 µCi/ml [3H]-glucosamine (Perkin Elmer, Waltham, MA) in medium containing 2% FBS. The cells were collected, washed with DPBS, resuspended in water and lysed using freeze thaw cycles. An aliquot was taken out for determination of the protein concentration using a Bradford protein assay kit. Lipids were extracted by addition of chloroform and methanol (chloroform-methanol-water 4:8:3, v/v/v). After a 10-min incubation at room temperature, the GAG pellet was recovered by centrifugation (1000g for 10 min) and the supernatant removed. The pellet was washed with acetone, dried, and subjected to proteolysis overnight at 65°C with 1 mg/ml papain (Sigma) in 100 mM Sodium Acetate buffer containing 5 mM EDTA and 5 mM cysteine (pH 5.5). The incorporation of [3H]-glucosamine into GAGs was measured by liquid scintillation counting.

**Exocytosis**

Astrocytes were seeded at high density onto coverslips coated with poly-ornithine(1.5 µg/ml) and laminin (5 µg/ml). After 24 hours, cells were washed with extracellular buffer (2.6M NaCl, 0.5M KCl, 0.1M MgCl2, 1.8mg/ml D-glucose, 1M Hepes, 2% FCS) and incubated for 30 seconds at 37°C with the same extracellular buffer supplemented with 8mM CaCl2 and/or 1µM ionomycin. Coverslips were then transferred on ice and washed with cold DPBS before incubation for 30 minutes at 4°C with anti-LAMP1 antibodies diluted in DPBS 1% horse serum. After 3 washes with DPBS, cells were fixed with 2% PFA, re-washed 3 times with DPBS and incubated for 1 hour at room temperature with AlexaFluor488®-conjugated secondary antibodies and Hoechst dye. Coverslips were mounted on FluoromountG.

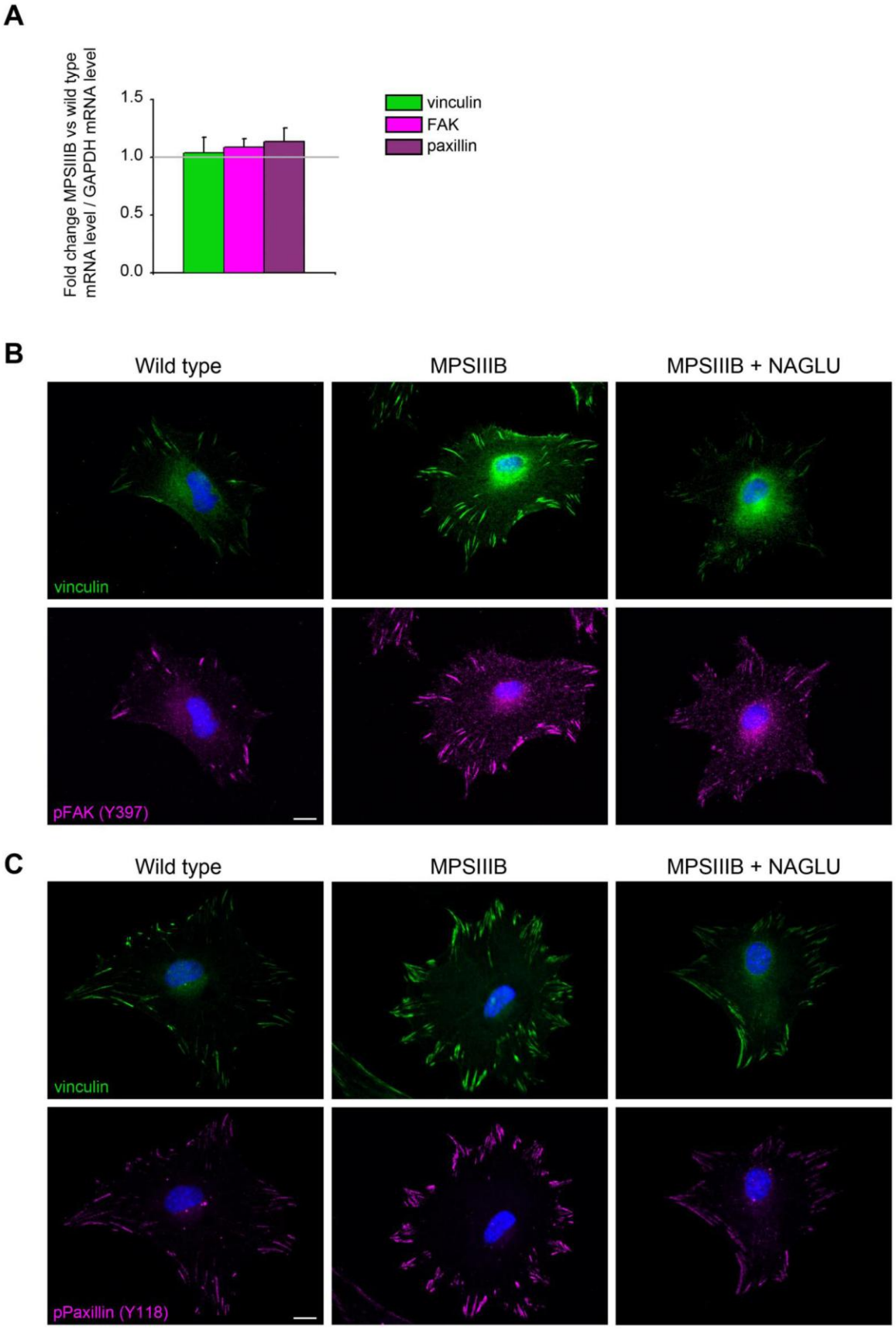

A
Fold change MPSIIIB vs wild type mRNA level / GAPDH mRNA level
1.5
1.0
0.5
0.0
vinculin
FAK
paxillin
B
Wild type
MPSIIIB
MPSIIIB + NAGLU
vinculin
pFAK (Y397)
C
Wild type
MPSIIIB
MPSIIIB + NAGLU
vinculin
pPaxillin (Y118)

**Figure S1**

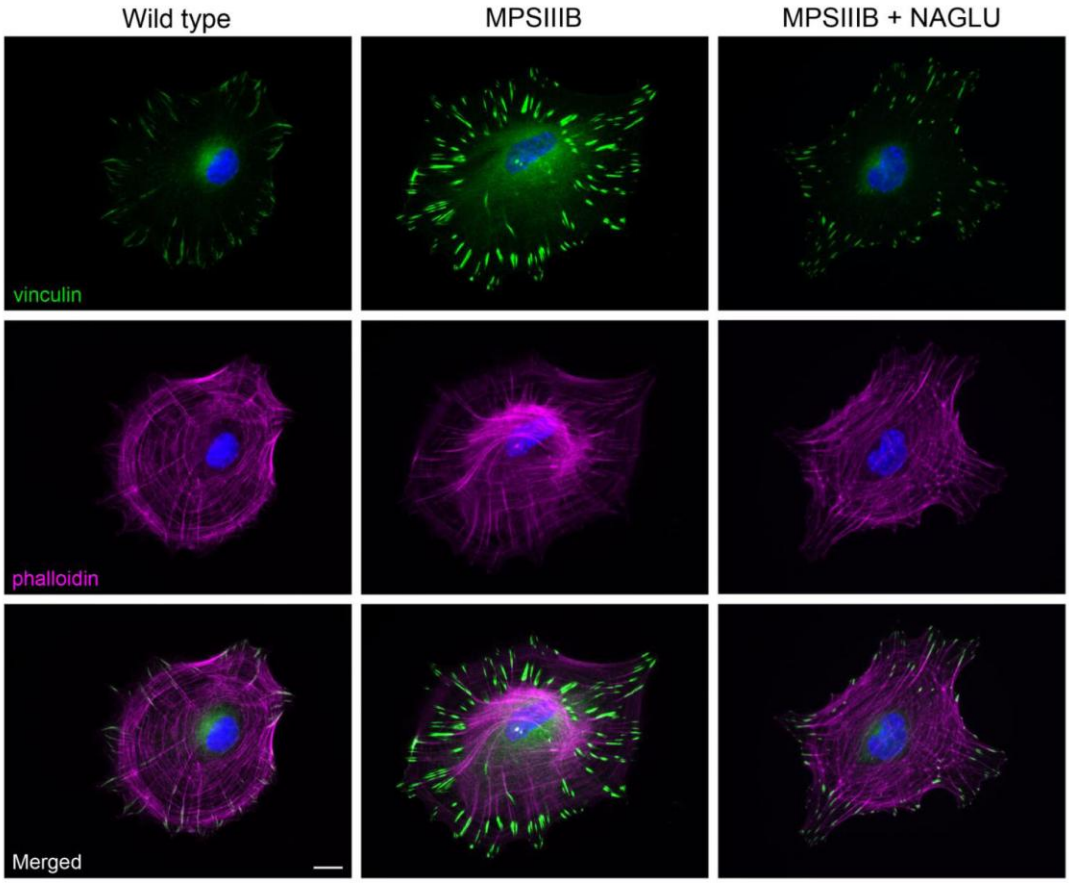

Wild type
MPSIIIB
MPSIIIB + NAGLU
vinculin
phalloidin
Merged

**Figure S2**

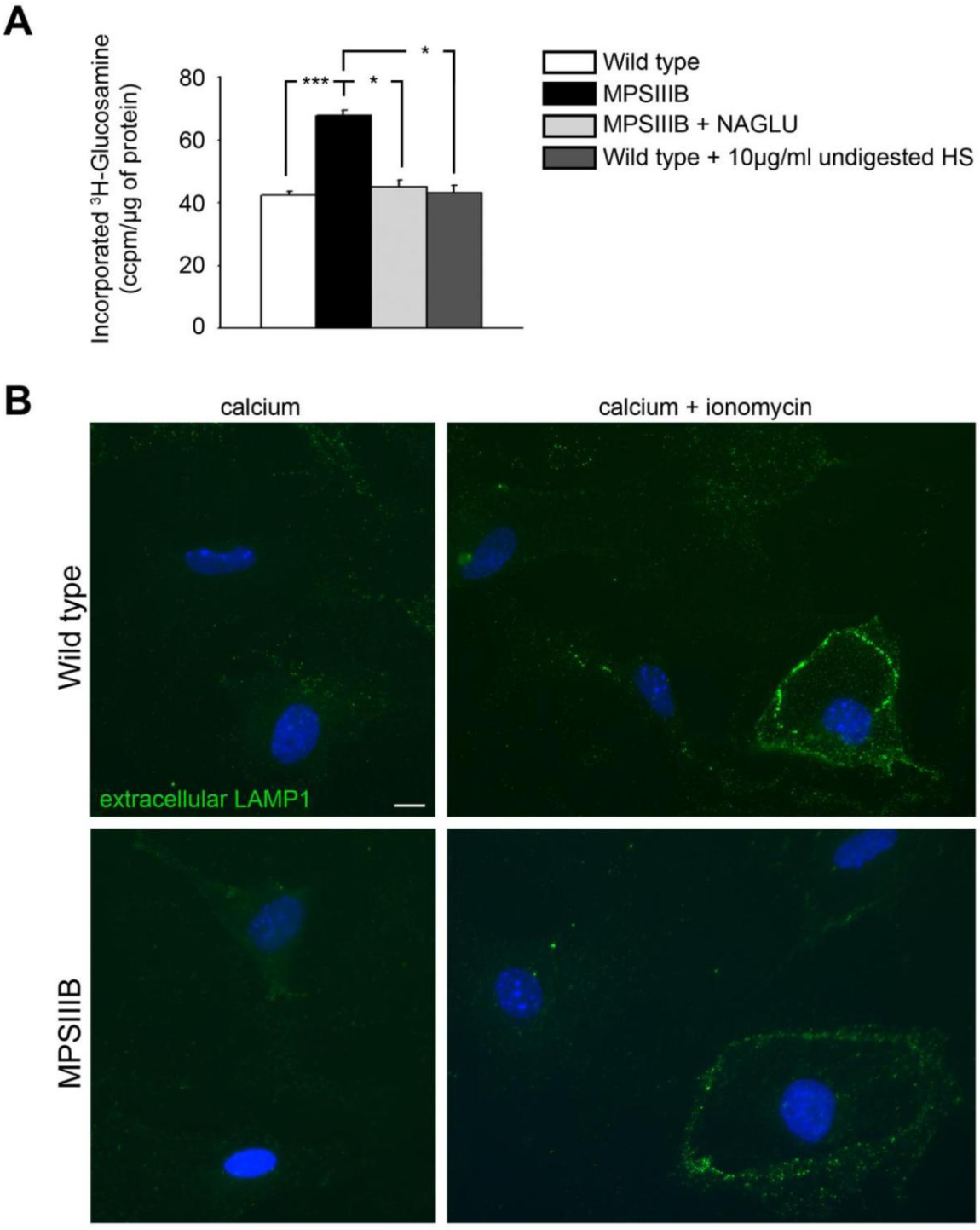

A
Incorporated ³H-Glucosamine (ccpm/µg of protein)
80
60
40
20
0
***
*
*
Wild type
MPSIIIB
MPSIIIB + NAGLU
Wild type + 10µg/ml undigested HS
B
calcium
calcium + ionomycin
Wild type
MPSIIIB
extracellular LAMP1

**Figure S3**

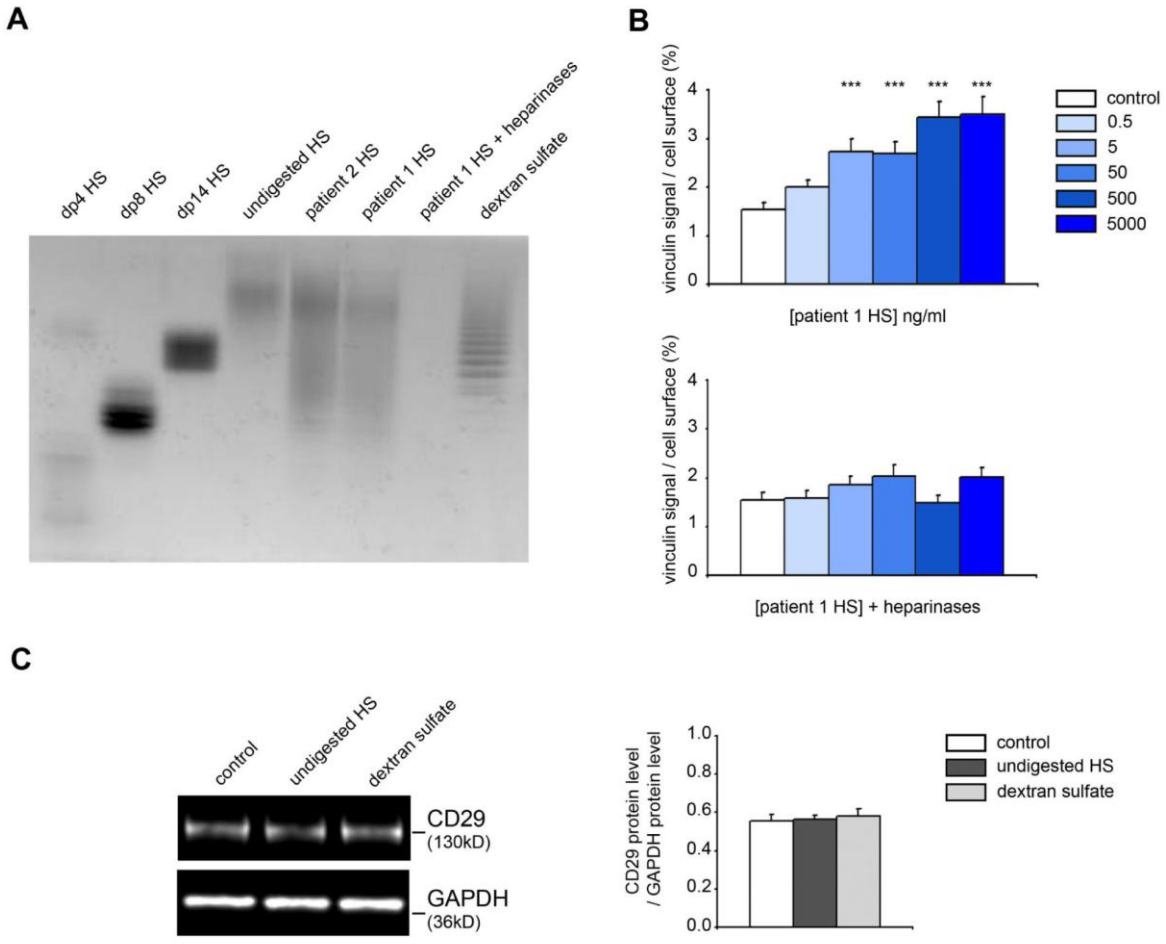

A
dp4 HS
dp8 HS
dp14 HS
undigested HS
patient 2 HS
patient 1 HS
patient 1 HS + heparinases
dextran sulfate
B
vinculin signal / cell surface (%)
***
control
0.5
5
50
500
5000
[patient 1 HS] ng/ml
[patient 1 HS] + heparinases
C
control
undigested HS
dextran sulfate
CD29
(130kD)
GAPDH
(36kD)
CD29 protein level
/ GAPDH protein level
undigested HS

**Figure S4**

**Résumé : Modélisation de maladies neurodégénératives à l'aide de cellules souches pluripotentes induites humaines**

La technologie de reprogrammation de cellules somatiques en cellules souches pluripotentes induites (iPS) offre aujourd'hui l'opportunité de modéliser des maladies neurodégénératives et d'étudier des neurones de patients. Nous avons utilisé cette technologie pour générer deux modèles de maladies neurodégénératives: la mucopolysaccharidose de type IIIB (MPSIIIB) et la forme ALS2 de la sclérose latérale amyotrophique (SLA).
Dans le modèle MPSIIIB, nous avons montré que les iPS et les neurones de patients présentaient des défauts caractéristiques de la pathologie telle que l'accumulation de vésicules de surcharge. Des altérations de l'appareil de Golgi dans ces cellules ont également été mises en évidence. Une analyse du transcriptome de précurseurs neuraux MPSIIIB a montré des modifications transcriptionnelles touchant notamment des gènes impliqués dans les interactions de la cellule avec la matrice extra-cellulaire. Ainsi, dans une seconde étude, des altérations de la migration et de l'orientation de cellules de souris mutantes MPSIIIB ou de patients ont été démontrées. Ces altérations pourraient être responsables des perturbations de la neurogénèse et de la neuritogénèse chez les enfants malades.
Dans le modèle SLA/ALS2, nous avons montré que les neurones de patients présentaient des défauts incluant une diminution de la surface des endosomes et des anomalies de la croissance neuritique. Alors qu'il n'existait jusqu'alors aucun modèle cellulaire pertinent reproduisant cette maladie, ce modèle permettra à présent d'étudier les processus physiopathologiques impliqués dans la maladie.
En conclusion, la génération de cellules iPS permet de modéliser des maladies neurodégénératives et d'étudier les processus physiopathologiques qui sont associés sur des neurones humains en culture. Ces modèles cellulaires pourraient permettre dans un avenir proche de réaliser des criblages de molécules à visée thérapeutique.

Mots-clés : Cellules souches pluripotentes induites (iPS), Muccopolysaccharidoses de type IIIB (MPSIIIB), Sclérose latérale amyotrophique (SLA), appareil de Golgi, Alsine/ALS2

**Abstract: Modeling of neurodegenerative diseases using human induced pluripotent stem cells**

Reprogramming technology of somatic cells in induced pluripotent stem cells (iPS) now offers the opportunity to model neurodegenerative diseases and to study patient's neurons. We used this technology for generating two models of neurodegenerative diseases: the muccopolysaccharidosis type IIIB (MPSIIIB) and the ALS2 form of amyotrophic lateral sclerosis (ALS).
In the MPSIIIB model, we have shown that iPS and neurons of patients had characteristic defects of the disease such as the accumulation of storage vesicles. Alterations of the Golgi apparatus in these cells were also highlighted. Transcriptome analysis of MPSIIIB neural precursors showed transcriptional changes involving particularly genes implicated in cell-extracellular matrix interactions. Thus, in a subsequent study, alterations of migration and orientation of MPSIIIB mutant mouse cells and MPSIIIB patients' cells have been demonstrated. These alterations may be responsible for the disruption of neurogenesis and neuritogenesis in sick children.
In the ALS2 model, we have shown that patients' neurons had defects including decreased endosomes' surface and abnormal neurite outgrowth. **A**s there was previously no relevant cellular model reproducing the disease, this model will now allow the study of physiopathological processes involved in the disease.
In conclusion, the generation of iPS cells allows to model neurodegenerative diseases and to study associated physiopathological processes on cultured human neurons. These cell models could allow in the near future the screening of molecules of potential therapeutical interest.

Keywords: Induced pluripotent stem cells (iPS), Muccopolysaccharidosis type IIIB (MPSIIIB),Amyotrophic lateral sclerosis (ALS), Golgi apparatus, Alsine/ALS2