université PARIS-SACLAY

NNT : 2019SACLE002

Thèse de doctorat

Modélisation pathologique de la neurofibromatose de type. Développement d'un test d'étude et applications pour la découverte de molécules actives.

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Université d'Evry-Val d'Essonne

Ecole doctorale n°569 : innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (ITFA)

Spécialité de doctorat : Biologie Cellulaire et Moléculaire

Thèse présentée et soutenue à Evry, le 15 janvier 2019, par

Déborah Aubin

Composition du Jury :

Mme Bénédicte Sturbois Professeure, Université Evry-Val-d'Essonne	Présidente
Mme Nadège Bondurand Directrice de Recherche, Institut Imagine (U1163)	Rapporteure
M. Morad Bensidhoum Chargé de Recherche, B2OA (UMR7052)	Rapporteur
Mme Béatrice Parfait Chargée de Recherche, Paris-Descartes (UMR-S745)	Examinatrice
M. Frank Yates Chargé de Recherche, CEA Fontenay-Aux-Roses	Examinateur
Mme Brigitte Onteniente Directrice générale de Phenocell SAS	Directrice de thèse
M. Gilles Lemaitre Chargé de Recherche, ISTEM	Co-directeur de thèse

I-Stem INNOVER POUR GUERIR

Phenocell Stem Cells for better Drugs

AFMTÉLÉTHON INNOVER POUR GUERIR

Remerciements ... 3
Liste des abréviations ... 6
Liste des Figures ... 8
Liste des Tableaux ... 10
Résumé ... 11
Abstract ... 12
Introduction ... 13
I. La neurofibromatose de type 1 ... 13
A. Historique ... 13
B. Epidémiologie ... 16
C. Le gène NF1 ... 20
D. Le produit de NF1 ... 22
E. Tableau clinique de la NF1 ... 27
1. Défauts pigmentaires ... *28*
2. Gliome des voies optiques (Fig. 6D) ... *29*
3. Défauts cognitifs ... *30*
4. Neurofibromes ... *30*
5. Lésions osseuses ... *31*
F. Le traitement de la neurofibromatose de type 1 ... 33
1. Les essais cliniques NF1 ... *33*
G. Les modèles d'études NF1 ... 35
II. Les cellules souches pluripotentes humaines (CSPh) ... 38
A. Généralités ... 38
B. Cellules souches embryonnaires humaines (hESC) ... 44
1. Origine des hESC ... *44*
2. Diagnostic pré-implantatoire et hESC pathologiques ... *45*
3. Les lois de bioéthique et réglementations relatives à l'utilisation des cellules embryonnaires humaines : Cadre législatif français ... *48*
C. Cellules souches humaines induites à la pluripotence (hiPSC) ... 50
1. Origine des hiPSC ... *50*
2. Production des hiPSC ... *51*
3. Techniques de reprogrammation ... *53*
D. Caractéristiques de cellules souches pluripotentes ... 55
1. Maintien de la pluripotence ... *55*
2. Caractérisation des cellules souches pluripotentes ... *58*
E. Modélisation pathologique à partir des cellules souches pluripotentes ... 62
III. Le tissu osseux ... 65
A. Généralités ... 65
B. Origine embryonnaire des osteoblasts ... 66
C. Différenciation ostéoblastique ... 70
D. Les cellules souches comme source de cellules osteoblastiques ... 74
E. La neurofibromatose de Type 1 et les anomalies osseuses ... 76
IV. Les cellules de Schwann ... 81
A. Généralités ... 81
B. Origine embryonnaire de la cellule de Schwann ... 81

1. Cellules de la crête neurale ... *82*
2. Les précurseurs de cellules de Schwann ... *85*
3. Les cellules de Schwann immatures ... *86*
4. Les cellules de Schwann matures ... *89*
C. Les pathologies liées aux cellules de Schwann ... 92
1. Schwannomatose ... *92*
2. Les neurofibromes dans NF1 ... *92*
D. La neurofibromatose de type 1 et les cellules de Schwann ... 93
E. Les cellules souches comme source de cellules de Schwann ... 98
1. Les cellules souches multipotentes ... *98*
2. Les cellules souches pluripotentes ... *99*

V. Objectifs ... 102
A. Modélisation pathologique de la neurofibromatose de type 1 ... 102
B. Mise au point d'un protocole de différenciation des CSP en cellules de Schwann ... 103

VI. Matériel et Méthodes ... 104

VII. Résultats ... 115
A. Modélisation pathologique de la neurofibromatose de type 1 ... 115
1. Contexte de l'étude ... *115*
2. Induction des CSPh en cellules souches mésenchymateuses in vitro. ... *119*
3. Effet de la perte d'expression de la neurofibromine sur les hiPS-MSC ... *126*
4. Capacité de différenciation des hiPS-MSC dans le lignage ostéoblastique ... *131*
5. Analyse du phénotype ostéoblastique lié à la perte d'expression de la neurofibromine. *134*
6. Utilisation de molécules potentiellement actives dans la restauration d'un phénotype normal dans les cellules NF1. ... *141*
7. Mise en place de lignées isogéniques à l'aide de la technologie CRISPR/Cas9 ... *144*
8. Conclusions et perspectives ... *149*
B. Mise au point d'un protocole de différenciation des CSP en cellules de Schwann ... 151
1. Contexte de l'étude ... *151*
2. Introduction ... *151*
3. Induction des CSP vers le lignage Schwann in vitro ... *152*
4. Optimisation du protocole d'induction des hiPS vers le lignage Schwann in vitro ... *158*
5. Conclusion et Perspectives ... *168*

VIII. Discussion ... 170
A. Modélisation pathologique : avantage de l'utilisation des hCSP ... 170
B. La modélisation pathologique de la neurofibromatose de type 1 à partir de hiPS. ... 172
C. Utilisation des cellules souches pluripotentes pour la recherche de composés pharmaceutique avec le criblage à haut débit. ... 174
D. Différenciation des hCSP en d'autres types cellulaires pertinents de la maladie : développement d'un protocole de différenciation des hiPS en cellules de Schwann. ... 175

IX. Conclusion générale ... 177

X. Annexe ... 178
1. Introduction ... *178*
2. Caractérisation du type cellulaire présent dans les cultures de hiPS différenciées vers le lignage Schwann ... *179*
3. Discussion et Perspectives ... *184*

Références Bibliographiques ... 187

Remerciements

Je souhaite en premier lieu sincèrement remercier le Dr. Nadège Bondurand et le Dr. Morad Bensidhoum d'avoir accepté d'être rapporteurs de mon travail de thèse et d'avoir pris le temps de corriger mon manuscrit.
Je remercie également le Pr. Bénédicte Sturbois de me faire l'honneur d'avoir accepté de présider ce jury de thèse.
Je remercie vivement mes examinateurs, le Dr. Béatrice Parfait et le Dr. Frank Yates pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse en participant à mon jury.

Je tiens à présenter mes remerciements à Marc Peschanski et Cécile Martinat pour m'avoir permis d'intégrer ISTEM et de poursuivre mes travaux au sein du laboratoire. Bien évidemment, je te remercie Christine Baldeschi pour m'avoir accueillie au sein de ton équipe « Génodermatose » et de m'avoir suivi durant ces quatre années.

Je tiens tout particulièrement à remercier très chaleureusement mes directeurs de thèse, Brigitte Onteniente et Gilles Lemaitre. Brigitte je ne vous remercierai jamais suffisamment de m'avoir accordé votre confiance pour faire partie de l'aventure Phenocell. Votre accompagnement sous « haute bienveillance » m'a fait grandir personnellement et scientifiquement, me permettant de prendre confiance dans mes choix et décisions de « jeune chercheur ». Merci d'avoir toujours su vous rendre disponible pour moi et ce même après le départ de Phenocell sous le soleil de Grasses (une des décisions la plus difficile de cette thèse : sentir que je ne ferai désormais plus partie de l'aventure à vos côtés…). Gilles, j'ai eu la chance d'être ta première étudiante en thèse et je te remercie pour ton soutien et ton aide tout au long de ces années. Merci de m'avoir toujours poussée à aller au bout de mes idées et réflexions lors de nos réunions en me répondant « à ton avis ? », « tu en penses quoi toi ? », « pourquoi ? », « essaie tu verras ! » et de ne pas m'avoir permis de céder à la facilité. J'ai beaucoup appris à tes côtés et surtout grâce ton côté « pinailleur » (comme tu le dis) sur les résultats que je te présentais va me manquer car toujours très utile et pertinent !!

Je tiens aussi à sincèrement te remercier, Julien Maruotti, d'avoir toujours été présent pour m'aider sur les différents projets qui ont fait cette thèse, que ce soit au niveau des expérimentations ou pour la rédaction du manuscrit, tes conseils m'ont toujours aidée à dépasser certains blocages auxquels je pouvais faire face. Un grand merci également à toi Adrien d'avoir participé à ce projet difficile qu'a été la partie « Schwann » de cette thèse. Ton aide et ton implication ont réellement été précieuses et on sait à quel point cela a été

challengeant !! Bien évidemment un grand merci aussi à toute l'équipe de Phenocell présente et passée.

Merci à toi Nathalie d'avoir pris le temps de travailler avec moi sur le manuscrit (Le déclic a été salvateur : la mise en place de plans détaillés n'a plus de secret pour moi !) et pour notre travail sur les MSC et les CRISPR. Ce qui m'amène également à te remercier, Annabelle, d'avoir pris le relai avec Nathalie à la fin de la thèse, pour aboutir le projet. Merci à toute l'équipe Génodermatose : Manoubia d'avoir toujours été présente (nos discussions de hotte à hotte m'ont très vite manquées !), Aurélie pour ta bonne humeur et ton soutien et tous ceux qui ont fait partie de l'équipe (Carole, Anaïs …).

Merci a mes collègues devenus amis au cours de ces dernières années, Valentin, Vincent, Margot, Gurvan, Sylvain et Florian. C'était super de se retrouver après le labo pour une séance d'escalade ou juste pour passer des soirées cinés, raclettes, bredeles et j'en passe, même si on finissait toujours par parler de nos thèses et nos résultats à un moment (Vincent, les HOX n'ont plus de secret pour nous). Florian, on a commencé au labo ensemble et on a fini le même jour, je t'avoue que la rédaction a été moins difficile tant je te savais dans la même galère ! Nos conversations presque quotidiennes en étaient la preuve « tu en es ou toi ? ok ça va moi aussi » « tu as fait ça toi ?» etc … On essaie de se rassurer comme on peut !!

Je tiens maintenant à remercier tous mes proches, mes amis dans un premier temps. Marion, ma collègue des premiers jours chez Phenocell devenue une de mes amies les plus précieuses et c'est bien parti pour durer longtemps !!
Merci à tout le groupe « SupBiotech », nous sommes diplômés depuis déjà 5 ans et pourtant on se voit toujours aussi souvent (pas toujours facile de trouver de la place pour 15 personnes mais on y arrive !). Merci particulièrement à Lorine, Agathe et Yohann qui ont toujours été là pour moi dans les moments difficiles et qui ont toujours cru en moi et qui m'ont aidée à passer les caps difficiles de ces années de thèse.

Enfin, les personnes sans qui je ne serai jamais arrivée au bout des mes projets : ma famille. Je ne serais jamais assez reconnaissante pour tout ce que vous avez fait pour moi, c'est grâce à vous que j'en suis là aujourd'hui … Merci maman pour ta bienveillance à toute épreuve et ton soutien sans faille, même si c'était parfois stressant de voir à quel point tu avais confiance en moi et mes compétences, ce fut moteur pour donner le meilleur de moi même. Merci d'avoir été l'épaule sur laquelle je pouvais me reposer quand le doute et la confusion m'emportaient. Merci d'avoir été présente durant ce parcours jonché d'obstacles et de m'avoir promis que tout irait mieux … tu avais raison … comme d'habitude ! Merci à toi papa, de m'avoir montré l'exemple, te voir travailler si dur pendant toutes ces années m'a appris que l'on a rien sans rien et j'essaie

d'appliquer ton fameux leitmotiv « quand on veut quelque chose, on se donne les moyens d'y parvenir » qui a beaucoup résonné dans mon esprit durant cette thèse. Merci d'avoir toujours été présent dans les moments difficiles et d'avoir mis ton costume de papa poule quand tu pressentais mes périodes de détresse… Je vous remercie de m'avoir inculqué toutes ces valeurs et j'espère pouvoir un jour accomplir tout ce que vous avez accompli …
Bien évidemment j'ai une grosse pensée pour mes deux sœurs, Aurélia et Elodie. Merci d'avoir toujours été là pour moi et très bientôt on pourra enfin se retrouver toutes les trois pour partager tant de choses encore !

Pour finir, Pierre, merci de m'avoir rendu cette dernière année plus facile à gérer grâce à ton aide et ta patience. Ce ne fut pas facile pour toi car la dernière année reste la plus stressante mais tu as toujours su me redonner le sourire et me déstresser. Merci de croire aussi fort en moi et d'avoir toujours été aussi positif et optimiste. Si on avait su, il y a 8 ans sur les bancs de l'école, que l'on en serait la aujourd'hui … et que ce n'est que le début d'une longue aventure …

Liste des abréviations

AC : Adénylate cyclase

ALP : Alcalin phosphatase

AMPc : Cyclic adenosine monophosphate

BMP : Bone morphogenic protein

BSP : Sialoprotein

CCNE : Comité Consultatif National d'Ethique

CNTF : Ciliary neurotrophic factor

COL1A : Collagène type 1

CSPh : Cellules souches pluripotentes humaines

DPI : Diagnostic pré-implantatoire

ECM : Extracellular matrix

EVI2A/EVI2B : ecotropic viral integration site

FGF : Fibroblast growth factor

FOX : Forkhead box

FSK : Forskolin

GRB2 : Adapter protein growth factor receptor bound protein 2

GSK3 : Glycogen synthase kinase 3

hESC : Cellules souches embryonnaires humaines

hiPS : Cellules souches humaines induites à la pluripotences

IGF : Insulin growth factor

OCN : Osteocalcin

OMGP : Oligodendrocyte-myelin glycoprotein

OriP/EBNA-1 : Epstein-Barr Nuclear Antigen-1

LCR : Liquide céphalorachidien

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

MBP : Myelin basic protein

MCI : Masse cellulaire interne

MEF : Mouse embryonic fibroblast

MN : Motoneurone

MNPST : Malignant peripheral nerve sheath tumor

MPD : Méthylphénidate

MSC : Mesenchymal stem cell

NCSC : Neural crest stem cell

NF : Neurofibromatose

NF1 : Neurofibromatose de type 1

NGF : Neural growth factor

NGR1 : Neuregulin 1

NT3 : Neurotrophin 3

PDGF : Platelet-derived growth factor

PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase

ROCK : Rho kinase

SCPs : Schwann cell precursors

SNP : Système nerveux périphérique

SOS : Ras guanine nucleotide exchange factor

TCL : Taches café au lait

TDAH : Troubles de type hyperactivité avec déficit de l'attention

VM : Vésicule matricielle

Liste des Figures

Figure 1 : Première représentation de NF1 par Heinricus 14
Figure 2 : Evolution de la perception de NF1. De créatures mythologiques à patients 15
Figure 3 : Autopsie de Marie Kientz 15
Figure 4 : Représentation du gène NF1 21
Figure 5 : Structure et fonction de la neurofibromine 26
Figure 6 : Tableau clinique de NF1 28
Figure 7 : Diagramme de Venn des modèles NF1 38
Figure 8 : Caractéristiques des cellules souches pluripotentes 39
Figure 9 : Obtention et dérivation des cellules souches embryonnaires humaines 45
Figure 10 : Génération de cellules souches humaines induites à la pluripotence (hiPSC) 51
Figure 11 : Mécanisme du maintien de la pluripotence et de la différenciation des hCSP 58
Figure 12 : Contrôle qualité des cellules souches pluripotentes 61
Figure 13 : Composition du tissus osseux 66
Figure 14 : Biogenèse des ostéoblastes. 69
Figure 15 : Contrôle de la différenciation ostéoblastique par TGF- β et les BMP 71
Figure 16 : Différenciation des ostéoblastes à partir des cellules souches mésenchymateuses 73
Figure 17 : Formation du tube neural et dérivation des cellules de la crête neurale 82
Figure 18 : Différenciation des cellules de Schwann 84
Figure 19 : Caractérisation des hiPS dérivées de fibroblastes 117
Figure 20 : Schéma du protocole de différenciation au robot TAP Biosystem des hCSP en cellules mésenchymateuses utilisées pour la modélisation pathologiques de la NF1 120
Figure 21 : Morphologie des cellules hiPS WT-1 différenciées en MSC à l'aide du robot CompacT SelecT 120
Figure 22 : Analyse de la prolifération de cellules hiPS-MSC après le dernier passage au CompacT SelecT 121
Figure 23 : Morphologie des cellules hiPS-MSC WT et hiPS-MSC NF1 après la décongélation par microscopie optique 122
Figure 24 : Caractérisation des cellules souches mésenchymateuses différenciées à partir des hiPS-MSC WT-1 123
Figure 25 : Différenciation adipocytaire des hiPS-MSC WT et NF1 125
Figure 26 : Expression du transcrit *NF1* dans les cellules MSC au passage 6 126
Figure 27 : Analyse par Western Blot de l'expression de la neurofibromine dans les cellules hiPS-MSC WT et hiPS-MSC NF1 127
Figure 28 : Analyse de la prolifération des hiPS-MSC 129
Figure 29 : Analyse des voies de signalisation régulées par la neurofibromine 130
Figure 30 : Schéma de la différenciation des hiPS-MSC en osteoblasts 131
Figure 31 : Marquage à la phosphotase alcaline des hiPS-MSC différenciées en ostéoblastes 132

Figure 32 : Marquage au rouge alizarine des hiPS-MSC différenciées en ostéoblatses 133
Figure 33 : Analyse par cytométrie de flux de la protéine ALP au bout de 10 jours de différenciation ostéoblastique 135
Figure 34 : Analyse par colorimétrie de l'activité ALP au bout de 10 jours de différenciation ostéoblastique 136
Figure 35 : Expression des marqueurs de différenciation ostéoblastique à J0 et J7 dans les hiPS-MSC WT et hiPS-MSC NF1 138
Figure 36 : Analyse des voies de signalisation normalement régulées par la neurofibromine 140
Figure 37 : Traitements des cellules en cours de différenciation ostéoblastique avec des inhibiteurs des voies impactées par la mutation NF1 142
Figure 38 : Effet du traitement des cellules en cours de différenciation ostéoblastique avec des statines sur l'activité ALP 144
Figure 39 : Représentation du système CRISPR-Cas9 145
Figure 40 : Analyse de la perte d'expression de la neurofibromine dans les lignées isogéniques éditées avec la technologie CRISPR/Cas9 147
Figure 41 : Analyse du phénotype osseux dans les lignées isogéniques 148
Figure 42 : Protocole de différenciation des CSP en cellules de Schwann 153
Figure 43 : Comparaison morphologique entre les hiPS-SC et les cellules de Schwann primaires ScienCell™ par microscopie optique 154
Figure 44 : Morphologie des cellules E1P4 en microscopie optique 155
Figure 45 : Comparaison de l'expression des marqueurs de crête neurale et des marqueurs précoces et matures dans les cellules E1P4 par rapport aux cellules de Schwann ScienCell™ 156
Figure 46 : Expression des marqueurs de Schwann des hiPS-SC au cours de la différenciation 157
Figure 47 : Optimisation du protocole de différenciation des hiPS en cellules de Schwann 158
Figure 48 : Analyse morphologique par microscopie optique des hiPS-SC 159
Figure 49 : Expression des marqueurs de cellules de Schwann des hiPS-SC au cours de la différenciation 160
Figure 50 : Analyse par cytométrie en flux du marqueur des cellules de Schwann précurseurs Cad19 au 30e jour de différenciation 161
Figure 51 : Analyse par Western blot de l'expression protéique de Cad19, P75, Pax3, GFAP et MBP 162
Figure 52 : Analyse morphologique de la co-culture hiPS-SC/hiPS-MN par microscopie optique 163
Figure 53 : Comparaison de l'expression des marqueurs Schwann Sox10, GFAP, S100 et Krox20 entre les hiPS-SC, les co-cultures hiPS-SC/hiPS-MN et les hiPS-MN 165
Figure 54 : Analyse par immunofluorescence des co-cultures hiPS-SC/hiPS-MN 167
Figure 55 : Analyse morphologique post décongélation des cellules différenciées issues du premier protocole développé pour la différenciation des hiPS en cellules de Schwann 179
Figure 56 : Expression des marqueurs des cellules musculaires 182
Figure 57 : Analyse en immunofluorescence par microscopie confocale 183

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Récapitulatif des variants naturels de NF1 25
Tableau 2 : Critères diagnostiques de la NF1 selon la NIH 27
Tableau 3 : Liste non exhaustive des essais cliniques passés et en cours pour la NF1 34
Tableau 4 : Liste des maladies monogéniques analysées par DPI selon la Société européenne de reproduction humaine et d'embryologie (ESHRE Consortium)..... 47
Tableau 5 : Liste des publications qui décrivent la différenciation en cellules de la crête neurale et en cellules de Schwann à partir de cellules souches pluripotentes 101
Tableau 6 : Séquences des primers utilisés pour la RT-qPCR..... 109
Tableau 7 : Liste des anticorps utilizes 112
Tableau 8 : Caractéristiques des mutations des lignées NF1..... 118
Tableau 9 : Quantification des marqueurs mésenchymateux pour les hiPS-MSC 124
Tableau 10: Quantification des adipocytes différenciés à partir des hiPS-MSC..... 125
Tableau 11 : Résumé des lignées obtenues avec la technologie CRISPR/Cas9..... 146

Résumé

La neurofibromatose de type 1 (NF1) représente la maladie génétique autosomale dominante la plus fréquente en France, après la mucovisidose, avec une incidence de 1 individu sur 3500. Il s'agit d'une pathologie multi-systémique présentant un tableau clinique varié. Parmi la pléthore de symptômes, sont comptées des manifestations neurocutanées telles que les taches « café-au-lait » (zone d'hyperpigmentation localisée) et les neurofibromes (tumeurs bénignes de la gaine périphérique de la myéline) mais également des défauts osseux et des troubles cognitifs. La pénétrance de la NF1 est complète mais la manifestation et la sévérité des symptômes peuvent varier d'un individu à l'autre. Le gène *NF1* responsable de la maladie, localisé sur le chromosome 17, est un gène suppresseur de tumeur qui code pour la neurofibromine. Dans le but de développer un modèle cellulaire humain pertinent pour l'étude des défauts osseux associés à la NF1, nous avons utilisé des cellules souches induites à la pluripotence porteuses de la mutation causale *NF1* (hiPS-NF1). Dans ces travaux, nous avons montré qu'une perte d'expression de la neurofibromine dans les ostéoblastes dérivés de hiPS-NF1 reproduisait le phénotype d'ostéogénèse réduite et qu'il était possible d'améliorer la capacité des hiPS-NF1 à se différencier en ostéoblastes à l'aide de molécules pharmacologiques. Toujours dans le but de proposer un modèle cellulaire humain le plus pertinent possible, nous avons développé des lignées isogéniques avec la technologie CRISPR/Cas 9 afin d'étudier l'impact d'une perte partielle ou totale de l'expression de la neurofibromine sur le phénotype osseux. En parallèle, afin de pouvoir étudier un autre phénotype associé à NF1, un protocole de différenciation de cellules de Schwann sous culture définie en utilisant des facteurs de croissance et des molécules de signalisation, à partir des hiPS a été développé. Des cellules de Schwann-like ont été obtenues en 30 jours après engagement des cellules souches vers la crête neurale afin d'induire l'émergence de précurseurs de cellules de Schwann par l'action de molécules telles que le récepteur de type I du TGF-ß (SB431542), l'hereguline ß1, l'IGF1, le FGF2 et un activateur de WNT3a (CHIR99021). L'analyse par q-PCR montre une augmentation des marqueurs de différents stades de différenciation de la cellule de Schwann : crête neurale (SOX10, ERBB3), cellules de Schwann précurseurs (MPZ, CAD19) et cellules de Schwann immatures (S100) au bout de 30 jours de différenciation. Ces résultats ont été complétés par l'analyse protéique des cellules différenciées et par la mise en co-culture de ces cellules avec des motoneurones différenciés à partir d'hiPS. L'ensemble de ce travail a permis de valider la pertinence de l'utilisation des cellules souches pluripotentes porteuses de mutation dans la modélisation de pathologie génétique, permettant à plus long terme, la recherche de molécules actives par des approches de criblage pharmacologique ou par des approches de thérapie cellulaire.

Mots clés : neurofibromatose de type 1 | cellules souches induites à la pluripotence | ostéoblastes | CRISPR/Cas9 | cellules de Schwann | modélisation pathologique.

Abstract

Neurofibromatosis type 1 (NF1) is an autosomal genetic disease with an incidence of 1 in 3,500 individuals. This is a multi-systemic disorder with a plethora of symptoms. Among NF1-related symptoms we find neurocutaneous manifestations such as "café-au-lait" spots (zone of localized hyperpigmentation) and neurofibromas (benign tumors of the peripheral sheath of myelin), but also bone defects and cognitive disorders. The penetrance of NF1 is complete but the manifestation and severity of symptoms may vary from one individual to another. The *NF1* gene responsible for the disease, located on chromosome 17, is a tumor suppressor gene that encodes neurofibromin. In order to develop a relevant human cellular model for the study of bone defects associated with NF1, we used pluripotency-induced stem cells that carry the *NF1* causal mutation (hiPS-NF1). In this work, we have shown that loss of neurofibromin expression in osteoblasts derived from hiPS-NF1 reproduces the reduced osteogenesis phenotype. We have also shown that pharmacological molecules can improve the ability of hiPS-NF1 to differentiate into osteoblasts. In order to propose the most relevant human cell model, we have developed isogenic lines with CRISPR / Cas 9 technology to study the impact of a partial or total loss of neurofibromin on the bone phenotype. Simultaneously, a Schwann cells differentiation protocol from hiPS was developed with culture defined medium using growth factors and signaling molecules. Schwann-like cells were obtained in 30 days by the use of molecules such as the type I receptor TGF-β (SB431542), heregulin β1, IGF1, FGF2 and activator of WNT3a (CHIR99021). The q-PCR analysis shows an increase in Schwann cell markers: neural crest (SOX10, ERBB3), precursor Schwann cells (MPZ, CAD19) and immature Schwann cells (S100). These results were confirmed by protein analysis of the differentiated cells and by the co-culture analysis of these cells with differentiated motoneurons from hiPS. All of this work validated the relevance of pluripotent stem cells in the modeling of genetic pathology.

Keywords: neurofibromatosis type 1 | induced pluripotent stem cell | osteoblasts | CRISPR / Cas9 | Schwann cells | disease modeling.

Introduction

I. La neurofibromatose de type 1

A. Historique

La neurofibromatose de type 1 (NF1) est une maladie génétique, aussi appelée maladie de Von Recklinghausen. Décrite dès le XIIIème siècle sous forme de descriptions picturales, et notamment dans un dessin d'Heinricus, un moine cistercien, qui semble représenter un patient atteint de neurofibromes (tumeur bénigne des nerfs périphériques) (Fig. 1). Bien évidemment, à cette époque, anomalies pathologiques et créatures mythologiques étaient souvent associées et ce n'est qu'au XVIIème siècle que la description de NF1 est devenue fondamentalement scientifique (Fig. 2). Le physicien et poète anglais Mark Akenside (1721-1770) décrira pour la première fois la notion d'atteinte nerveuse, ainsi qu'une potentielle nature familiale de NF1. C'est en 1811 que le mot « neurome ou névrome » fut inventé par Louis Odier pour décrire les tumeurs des fibres nerveuses. Le chirurgien irlandais Robert William Smith spécifia le terme en sous-catégorisant différents types : neuromes traumatiques, neuromes solitaires et neuromes multiples. En 1849, Smith décrit pour la première fois deux cas de patients atteints de tumeurs multiples caractéristiques de NF1 dans son œuvre massive « A Treatise on the Pathology, Diagnosis and Treatment of Neuroma ». Rudolf Ludwig Virchow (1821-1902) élargira les travaux de Smith et posera des bases solides d'études pour son étudiant Friedrich Daniel Von Recklinghausen. Entre 1847 et 1863, Virchow s'évertuera à établir une classification plus précise et complète des neuromes et fibromes (tumeurs bénignes se développant à partir de tissu conjonctif). Il introduira alors le concept de « vrais neuromes » (englobant les sous catégories établies par Smith) qui sont des tumeurs touchant les fibres nerveuses ainsi que les gaines nerveuses alors que les « faux neuromes » ne touchent que les gaines des nerfs. En 1863, il publie « Die Krankhaften Geschwülste » dans lequel il met en évidence le caractère héréditaire de la pathologie, presque cent ans après l'hypothèse émise par Mark Arkenside. A l'occasion d'une conférence pour le 25e anniversaire de l'institut d'anatomo-pathologie de Berlin, Von Recklinghausen dédie un rapport à son mentor Virchow, dans lequel il fait l'état de l'art de la maladie. Il présentera les cas

décrits dans la littérature mais ajoutera également deux cas issus de son expérience personnelle dont celui de Marie Kientz (Fig. 3). A partir de ses conclusions, il fera le lien entre l'existence simultanée des neuromes et des fibromes. Parce que les deux lésions présentent des structures similaires, il statuera sur le terme neurofibrome pour les décrire. C'est ainsi que la pathologie fut nommée maladie de Von Recklinghausen.

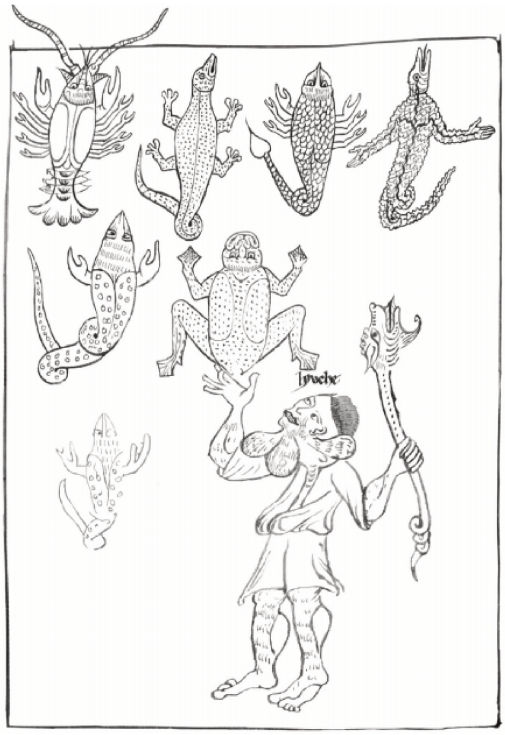


Figure 1 : Première représentation de NF1 par Heinricus

Dans cette image datant du début du XIIIe siècle, les arthropodes se transforment en monstres semblables à des amphibiens qui partagent un espace avec un homme, qui a également muté en une figure grotesque. Trois tumeurs bulbeuses descendent de son menton et de son cou. Deux autres protubérances s'étendent de ses aisselles à sa taille poussant sous sa chemise. Ces protubérances sont similaires aux images modernes des neurofibromes plexiformes. (Hermann, 1926).

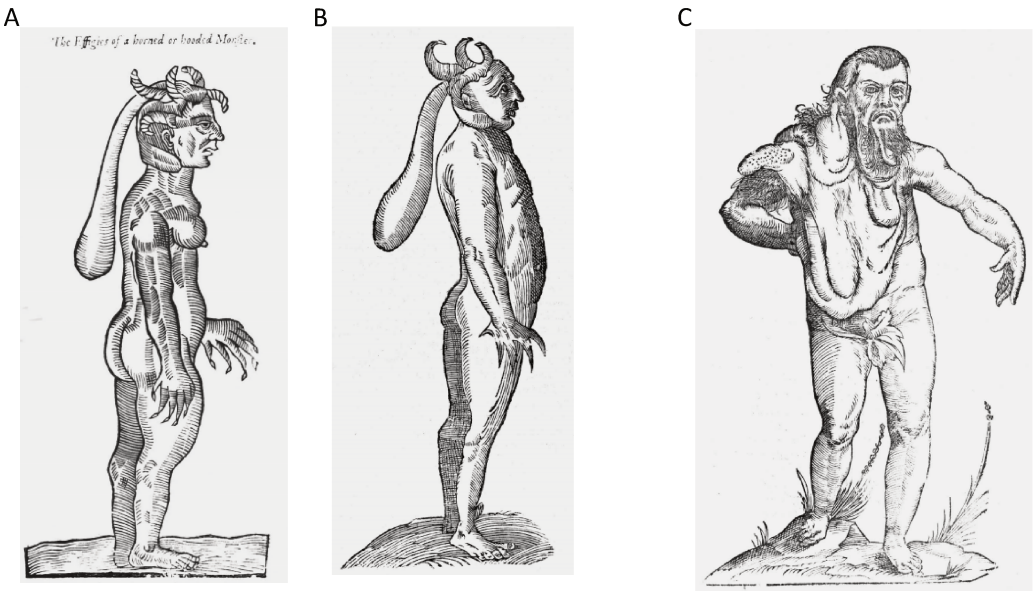


Figure 2 : Evolution de la perception de NF1. De créatures mythologiques à patients

(A) Le monstre corné de Paré du Piémont représente la première description de ce qui pourrait être un nourrisson avec NF1 (Céard, 1971). (B) Représentation moins mythologique du monstre de Paré repris par Aldrovandi dans son "Monstrorum historia" (Aldrovandi, 1642). (C) Dans son dessin et sa description de l'Homuncio (1642), Aldrovandi commence à faire la distinction entre les anomalies humanoïdes et les créatures mythologiques (Aldrovandi, 1642).

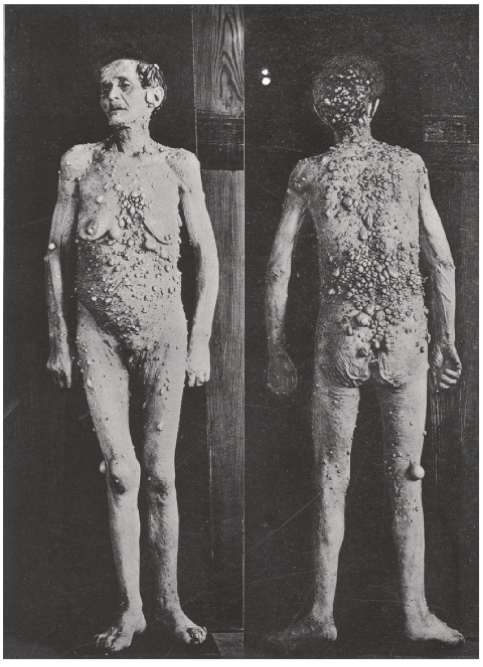


Figure 3 : Autopsie de Marie Kientz

L'autopsie de cette femme de 55 ans, le 24 janvier 1870 a fourni à von Recklinghausen l'évidence préliminaire des neurofibromes (von Recklinghausen, 1882).

B. Epidémiologie

La neurofibromatose de type 1 est une pathologie qui se transmet de manière autosomique dominante. Elle touche autant les hommes que les femmes toutes ethnies confondues. La mutation du gène *NF1* responsable de la pathologie peut donc être transmise de façon héréditaire mais peut également provenir d'une mutation « de novo » (50% des cas). La prévalence de la NF1 est de 1/3500 (Huson et al., 1989) avec pénétrance totale dès l'adolescence. L'espérance de vie des patients atteints de NF1 est diminuée de 15 ans par rapport à la population générale (Zöller et al., 1995 ; Rasmussen et al., 2001)

De par la grande variabilité des mutations responsables, la sévérité des symptômes varie d'un individu à un autre mais également entre les membres d'une même famille.

Il est probable que cette variabilité clinique de NF1 résulte d'une combinaison de facteurs génétiques, non génétiques et stochastiques. De nombreux patients atteints de NF1 ont été génotypés, mais peu de preuves d'une corrélation génotype–phénotype ont été observées. Il est possible que des corrélations importantes entre le génotype et le phénotype de la NF1 existent, mais qu'elles n'aient pas été identifiées en raison de la complexité du phénotype de la NF1, de sa forte dépendance à l'âge, de la non-dépendance de nombreuses caractéristiques cliniques et de l'énorme hétérogénéité allélique des mutations pathogènes de la NF1. Cependant, les patients NF1 porteurs de la même mutation peuvent développer une forme très grave de la maladie ou une forme bénigne. Parmi les différentes causes de phénotypes variables (y compris la variabilité intra-familiale) figurent les gènes non liés à *NF1* (gènes modificateurs) et les effets environnementaux. Les études sur les familles ont d'abord suggéré que la variation de l'expression observée dans la majorité des familles de NF1 pourrait être causée par l'influence des gènes modificateurs (gènes qui modifient l'expression d'un autre gène).

Les premières preuves de l'existence de gènes modificateurs proviennent d'études sur la corrélation phénotypique au sein de familles de NF1 bien phénotypées.

Trois grandes études ont montré que des modificateurs génétiques, sans lien avec le locus de *NF1*, contribuaient à l'expressivité variable de *NF1* (Easton et al. 1993; Szudek et al. 2002; Sabbagh et al., 2009).

En 1993, Easton et al. a étudié 175 individus atteints de NF1 appartenant à 48 familles, dont six paires de jumeaux monozygotes, 76 paires de frères et soeurs, 60 paires parent-enfant, 54 paires de famille du deuxième degré et 43 paires de famille du troisième degré (Easton et al., 1993). Huit caractéristiques cliniques de la NF1 ont été observées: trois caractères quantitatifs (nombre de taches café au lait, neurofibromes cutanés et circonférence de la tête) et cinq caractères binaires (présence ou non de neurofibromes plexiformes, gliomes optiques, scoliose, épilepsie et retard moteur). Des corrélations intrafamiliales significatives ont été trouvées pour trois variables quantitatives: nombre de taches café-au-lait, nombre de neurofibromes cutanés et circonférence de tête: la corrélation était la plus élevée entre les jumeaux monozygotes, la plus faible entre les parents du premier degré et encore plus faible entre les parents les plus éloignés. La forte corrélation entre les jumeaux monozygotes suggère une forte composante génétique dans la variation de l'expression, mais la faible corrélation entre les parents éloignés suggère que le type de mutation au locus *NF1* lui-même n'a joué qu'un rôle mineur. Easton et al. a conclu que l'expression phénotypique de *NF1* était en grande partie déterminée par le génotype d'autres locus modificateurs et que ces gènes modificateurs étaient spécifiques à un trait clinique.

Szudek et al., a examiné, 10 ans après, l'agrégation familiale des caractéristiques de la NF1 chez 904 personnes affectées dans 373 familles comptant au moins deux membres atteints de NF1 (346/373 étaient des familles comprenant un parent affecté et un ou plusieurs enfants affectés ou deux enfants ou plus affectés). Dans cette étude, dix caractéristiques cliniques ont été examinées (taches CAL, lentigines, nodules de Lisch, neurofibromes cutanés, neurofibromes sous-cutanés, neurofibromes plexiformes, epilepsie, scoliose, gliome optique, et autres néoplasmes). Szudek et al. a démontré que, bien que le phénotype NF1 soit très variable, certains patients sont plus susceptibles que d'autres de développer certaines caractéristiques de la maladie. En outre, ils ont montré que des facteurs génétiques peuvent déterminer des caractéristiques phénotypiques particulières qui se développent dans de nombreux cas. Ces deux études ont été cruciales dans la mesure où elles ont démontré une forte composante génétique dans la variabilité de l'expression de *NF1*.

Dans une troisième grande étude phénotypique familiale, les caractéristiques des corrélations familiales ont été examinées pour 12 caractéristiques cliniques

liées à la NF1, y compris 5 caractères quantitatifs (nombre de petites et grandes taches CAL et nombre de neurofibromes cutanés, sous-cutanés et plexiformes) et 7 caractères binaires (Sabbagh et al. 2009). Toutes les caractéristiques cliniques étudiées, à l'exception des néoplasmes, ont montré une agrégation familiale significative après ajustement en fonction de l'âge et du sexe. Pour la plupart d'entre eux, les modèles de corrélation familiale indiquaient une forte composante génétique sans influence apparente de la mutation constitutionnelle de *NF1*. Conformément aux conclusions précédentes de Szudek et d'Easton, plusieurs associations statistiquement significatives entre des combinaisons de caractéristiques de NF1 ont été observées, suggérant que certaines caractéristiques cliniques de NF1 pourraient avoir des déterminants génétiques communs. Ces résultats indiquent un répertoire commun possible de modificateurs génétiques pour certaines combinaisons de traits.

Cette hypothèse a été confirmée par les modèles de souris NF1 développés depuis l'identification du gène *NF1*. Le développement de modèles murins NF1 a permis de mieux comprendre l'initiation et la progression de tumeurs associées à NF1. Les origines génétiques de la souris et la susceptibilité au développement de tumeurs associée à NF1 ont été reliées (Reilly et al 2000, 2004-2006). Les modèles murins ont récapitulé, à des degrés divers, les signes cliniques NF1 présents chez leurs homologues humains. Cependant, il convient également de souligner les limitations des modèles murins pour imiter le phénotype complet de NF1 chez l'homme. C'est pourquoi une approche génétique humaine pour l'identification de gènes modificateurs de *NF1* chez l'homme est nécessaire.

Pasmant et al., a opté pour une stratégie, dans laquelle ils ont utilisé l'hybridation génomique comparative dans des neurofibromes plexiformes associés à NF1 pour identifier des gènes modificateurs candidats. Pour la première fois, les délétions 9p21.3 ont été identifiées comme les seules altérations somatiques récurrentes dans les neurofibromes plexiformes associés à NF1. La plus petite région de délétion commune dans 9p21.3 comprend le groupe de gènes CDKN2A - CDKN2B - ARF ainsi que le gène ANRIL. Une association familiale de l'allèle T du SNP rs2151280 (situé dans ANRIL) avec un nombre plus élevé de neurofibromes plexiformes a été constatée. Cette association a été observée uniquement avec les neurofibromes plexiformes et non avec les neurofibromes dermiques, suggérant un rôle spécifique du SNP

rs2151280 dans la genèse des neurofibromes plexiformes, mais pas dans les neurofibromes dermiques. Pour confirmer le rôle fonctionnel de rs2151280, CDKN2A, CDKN2B, ARF et ANRIL, l'expression a été analysée dans le sang périphérique de 124 patients atteints de NF1. L'allèle T de rs2151280 (associé à un nombre plus élevé de neurofibromes plexiformes par rapport aux autres SNP marqués) était statistiquement associé à une réduction du taux de transcription d'ANRIL. L'identification du premier gène modificateur de *NF1* associé au nombre de neurofibromes plexiformes a ouvert de nouvelles perspectives dans la pathogenèse moléculaire de la maladie, en particulier la formation de neurofibrome. Cette étude a démontré la pertinence de la caractérisation du génome entier pour l'identification de gènes modificateurs candidats impliqués dans la genèse des neurofibromes plexiformes. Les stratégies ciblées sont très prometteuses pour l'identification de nouveaux variants génétiques responsables des caractéristiques héréditaires et des complications de NF1. Cependant, cette approche de gène candidat a été critiquée en raison du manque de reproductibilité des résultats et limite sa capacité à inclure tous les gènes et polymorphismes causatifs possibles (Tabor et al., 2002).

Depuis les travaux de Pasmant, d'autres équipes ont choisi cette stratégie pour identifier d'autres gènes modificateurs impliqués dans certains phénotypes. En 2014, Pemov et al., a cherché à identifier si de tels gènes pouvaient influencer la sévérité des taches café-au-lait associé à NF1. Pour cela, ils ont déterminé le nombre de taches café-au-lait chez deux groupes de personnes atteintes de NF1. Ils ont alors mesuré l'expression génique d'environ 10 000 gènes dans les globules blancs d'un groupe de personnes. Ils ont ensuite séquencé un groupe de gènes dont le niveau d'expression a été augmenté chez les personnes présentant un nombre élevé de taches café-au-lait. Dans le premier groupe, ils ont trouvé des variants communs dans les gènes MSH6 et proches de DPH2 et ATP6V0B qui étaient significativement associés au nombre de taches café-au-lait. Certain de ces variants étaient presque significatifs dans le deuxième groupe de personnes. Les deux variants proches de DPH2 et ATP6V0B étaient très significatifs lorsqu'ils ont été analysés dans les deux groupes. Démontrant ainsi que ces variants génétiques influencent la sévérité du phénotype dans NF1.

C. Le gène *NF1*

Le gène *NF1*, localisé sur le chromosome 17q11.2, a été mis en évidence pour la première fois en 1990 par clonage positionnel (Cawthon et al., 1990; Viskochil et al., 1990; Wallace et al., 1990). Il s'agit d'un gène de très grande taille puisqu'il couvre environ 350 kb du génome et est composé de 60 exons (exons numérotés de 1 à 49 et certains exons voisins portant le même numéro avec des lettres distinctives) (Fig. 4). Un trait distinctif du gène est la présence de trois gènes dans l'intron 27b sur le brin antisens : OMGP (oligodendrocyte-myelin glycoprotein), EVI2A et EVI2B (ecotropic viral integration site) homologues humains de deux proto-oncogènes, (Evi-2A et Evi-2B chez la souris), qui sont impliqués dans le développement de la leucémie chez la souris. Le gène *NF1* possède un promoteur faible ce qui explique sa faible expression dans la plupart des cellules de mammifères (Viskochil 1999). Les niveaux d'expression les plus élevés se trouvent dans le système nerveux central, en particulier dans les neurones, les astrocytes, les oligodendrocytes et les cellules de Schwann (Nordlund et al., 1993).

Le taux de mutation du gène *NF1* (environ 1x10-4 gamètes/génération) est environ 10 fois plus élevé que celui de nombreux autres gènes impliqués dans des pathologies, car environ la moitié des patients atteints de NF1 semblent avoir une mutation de novo. Différentes hypothèses ont été avancées pour expliquer la forte mutabilité du gène *NF1*, notamment sa taille relativement importante (environ 350 Kb) et la survenue d'événements de conversion de gènes via les 11 pseudogènes dispersés dans le génome. La figure 5 montre la distribution exon par exon du nombre et des types de mutations dans le gène *NF1*, selon la base de données internationale sur les mutations *NF1* (http://www.nfmutation.org/). Des mutations ponctuelles ont été rapportées sur toute la longueur du gène, sans « hot spots » clairs, bien que quelques exons (4b, 7, 16 et 27b) regroupent un grand nombre de mutations. Un nombre important de mutations conduisant au saut d'exon ne se produisent pas dans les sites d'épissage canoniques (Colapietro et al., 2003), mais affectent les éléments régulateurs impliqués dans la transcription pré-ARNm et la modulation de l'expression génique (Baralle et al., 2006 ; Wimmer et al., 2007).

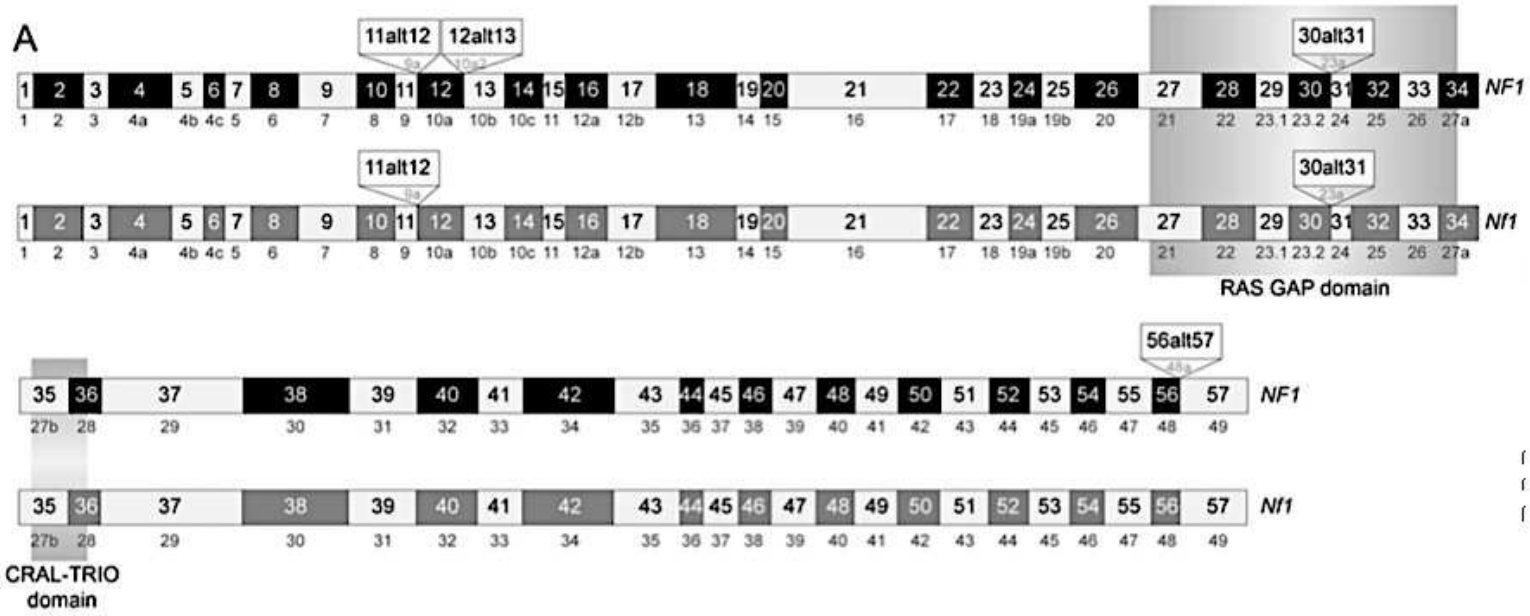


Figure 4 : Représentation du gène *NF1*

Schéma illustrant les 57 exons des transcrits complets humains (panneau supérieur) et souris (panneau inférieur), ainsi que les positions des exons épissés (11alt12, 12alt13, 30alt31 et 56alt57). Le nouveau système de numérotation proposé est noté dans chaque exon, tandis que le système de numérotation précédent est indiqué sous chaque exon. La protéine activant RAS-GTPase et les domaines CRAL-TRIO sont surlignés en gris. (Anastasaki et al., 2017)

D. Le produit de *NF1*

Le gène *NF1* code pour une très large protéine, appelée neurofibromine (NF1) constituée d'approximativement 2800 acides aminés. Il s'agit d'une protéine cytosolique de 319kDa (DeClue J.E et al., 1991, Marchuk D.A et al., 1991) (Fig. 5).

Il s'agit d'une protéine ubiquitaire que l'on retrouve dans toutes les cellules bien qu'elle soit exprimée de manière beaucoup plus importante dans les neurones, les cellules gliales, les cellules de Schwann et les leucocytes (Gutmann et al., 1991; Daston et al., 1992).

Cette séquence protéique a été grandement conservée au cours de l'évolution. Elle présente de grandes similarités avec son homologue murin (plus de 98%) (Bernards et al., 1993) mais également avec celle de la drosophile (60%) (The et al., 1997). Structuralement parlant, on retrouve des similitudes entre la NF1 et les protéines activatrices des GTPases (GAP) qui agissent comme « régulateurs négatif » de l'oncogène RAS (Fig. 5). Ces protéines ont la capacité intrinsèque de catalyser la conversion du GTP (guanine triphosphate) en GDP (guanine di-phosphate). Les GTPases sont généralement actives lorsqu'elles sont liées au GTP et inactives lorsqu'elles sont liées au GDP.

La majorité des mutations de *NF1* prédisent des troncatures dans la protéine et il n'y a pas de corrélation claire entre la mutation spécifique et les présentations cliniques (Castle et al., 2003). Le domaine apparenté à RasGAP (Ras-GRD) dans *NF1* s'étend entre les acides aminés 1125-1537 et correspond aux exons 20-27a (Ballester et al., 1990; Trovo-Marqui et Tajara, 2006). Il accélère la conversion du Ras actif lié au GTP en sa forme inactive liée au GDP. Ras est activé à la membrane plasmatique lors de la liaison de ligands spécifiques à des récepteurs de facteur de croissance déclenchant le recrutement d'un complexe contenant la protéine GRB2 (adapter protein growth factor receptor bound protein 2) et Sos (Ras guanine nucleotide exchange factor) sur le site d'activation du récepteur tyrosine kinase. Ras est alors catalysée pour passer à son état actif lié au GTP. Cette forme active de Ras se lie et active la kinase Raf et la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), qui déclenche ensuite une cascade de kinases, aboutissant à l'activation des voies MAPK et PI3K.

Certains de ces signaux sont ensuite transmis au noyau, régulant l'expression

des gènes contrôlant la prolifération cellulaire, la mort cellulaire, la différenciation et la migration. En effet, il est établi que des mutations engendrant une sur-activation de Ras sont fréquentes. Elles sont associées à de multiples cancers humains suite à une stimulation permanente des cascades de signalisation Raf-MAPK et/ou PI3K conduisant à une prolifération cellulaire incontrôlée et à une dérégulation de l'apoptose (Weiss et al ., 1999).

NF1, via son Ras-GRD, exerce un effet inverse sur Ras en augmentant le taux d'hydrolyse du GTP. Par conséquent, on pense que sa fonction de suppresseur de tumeur se produit en limitant l'activité de Ras dans la cellule saine. C'est cette propriété biologique de *NF1* qui est considérée comme la clé majeure des mécanismes physiopathologiques à la base des présentations cliniques des mutations de *NF1* chez la souris et chez l'homme, allant du trouble d'apprentissage aux tumeurs malignes (Costa et al., 2002 ; Larizza et al., 2009). En effet, en cas d'anomalie quantitative et/ou qualitative de la neurofibromine, la protéine RAS n'est plus normalement régulée ce qui va entraîner une stimulation excessive du cycle cellulaire et par voie de conséquence une prolifération cellulaire excessive, première étape dans la cancérisation d'un tissu (Lau et al. 2000, Jacob et al. 2011, Dai et al. 2012, Sharma et al. 2013).

La neurofibromine joue également un rôle dans la régulation de l'activité de l'adénylate cyclase (AC), qui génère l'AMP cyclique intracellulaire (AMPc) en permettant la conversion de l'ATP. Des études réalisées chez la drosophile suggèrent que la neurofibromine favorise les capacités cognitives via la stimulation de l'AC, la production d'AMPc et l'activation de la protéine kinase A (PKA) (Guo et al., 2000;, Hannan et al., 2006). Les taux d'AMPc dans le cerveau des drosophiles déficientes en Nf1 sont réduits par rapport aux phénotypes sauvages (Ho et al., 2007; Tong et al., 2002). Il a été constaté que la voie de l'AMPc peut être dérégulée soit positivement soit négativement en fonction du type cellulaire atteint. En effet, des études faites sur les cellules de Schwann murines ont montré que les niveaux d'expression d'AMPc étaient augmentés lorsque la Nf1 était mutée (Kim et al., 2001). Ces résultats ont été ensuite confirmés chez l'homme à partir de l'étude de cellules de tumeurs malignes de la gaine des nerfs périphérique (MNPST) (Dang and De Vries, 2011). A contrario, les astrocytes de souris Nf1+/- présentent une diminution du taux d'AMPc (Dasgupta et al., 2003; Warrington et al., 2007) ce qui confirme que les niveaux d'expression d'AMPc peuvent être régulés soit positivement soit

négativement.

Il persiste aujourd'hui une incertitude sur les mécanismes d'action de la voie de l'AMPc et de son interaction avec la neurofibromine. Hannan et al., (2006) a mis en évidence dans le cerveau de la drosophile, deux voies de signalisation de l'AC impliquant la neurofibromine. La première implique RAS via une stimulation par des ligands de récepteurs tyrosine kinase, mais de façon indépendante de la sous- unité Gαs de la protéine G. La seconde quant a elle, est stimulée par la sérotonine, l'histamine et nécessite la sous-unité Gαs. Le contrôle de ces voies est assuré par le domaine Ras-GAP ainsi que par la région C-terminale de Nf1. Ces données illustrent l'importance et la complexité de Nf1 dans la physiologie du système nerveux.

Le pré ARN messager subit des épissages alternatifs naturels ou liés aux mutations. Parmi les variants naturels on peut citer 9a/9br, 10a-2, 23a, et 48a, (Tableau 1) qui ne modifient pas le cadre de lecture et ont été identifié chez l'homme et les rongeurs. (Barron and Lou, 2012, Danglot et al., 1995, Gutmann et al., 1995) L'exon alternatif 9a/9br ajoute dix acides aminés au transcrit et son inclusion semble se limiter au système nerveux central (SNC; Gutmann et al., 1999; Danglot et al., 1995; Geist et al., 1996). L'inclusion de 9a/9br ne semble pas affecter la fonction du domaine lié aux protéines activant la GTPase (GRD). L'exon 10a-2 est un exon alternatif inséré entre les exons 10a et 10b qui ajoute quinze acides aminés à la protéine traduite, ce qui ajoute à son tour un segment trans-membranaire absent de l'isoforme dépourvu de cet exon (Kaufmann et al., 2002). Bien que sa fonction n'ait pas été étudiée de manière approfondie, on pense que l'exon alternatif 10a-2 possède les fonctions cellulaires de base (Kaufmann et al., 2002). L'exon 48a alternatif ajoute dix-huit acides aminés à la transcription. L'expression de l'exon 48a de *NF1* est plus élevée dans les tissus musculaires cardiaques et squelettiques fœtaux et adultes (Gutmann et al., 1994). Bien que sa fonction soit encore à l'étude, il est supposé que l'exon 48a pourrait jouer un rôle dans le développement et la différenciation des muscles cardiaques et squelettiques (Skuse et al., 1997, Gutmann et al., 1993)

Tableau 1 : Récapitulatif des variants naturels de *NF1*

(Skuse et al., 1997)

Transcript name	Alternative exon included	Tissues in which it is expressed	Consequence in neurofibromin	Does it affect the GRD?	Species
9br	9br	CNS only, reduced expression in brain tumors	Addition of 10 amino acids	**no**	human, mouse
Type II	23a	all, increased expression in brain tumors	Addition of 21 amino acids	yes	human, mouse, rat
Type III (rodent)	23a and 23b	Adrenal glands, kidney, ovanes	Introduction of frame shift	yes	mouse, rat
Type IV (rodent)	23b	testis	Introduction of frame shift	yes	mouse
Type 3	48a	fetal and adult cardiac and skeletal muscle	Addition of 18 amino acids	no	human, mouse, rat
Type 4	23a and 48a	fetal and adult cardiac and skeletal muscle	Addition of 21 amino acids in GRD and 18 amino acids at carboxy terminus	yes	human, mouse, rat
N-Isoform	Excludes exons 11-most of 49	normal brain and brain tumors	Excludes amino acids 548-2815	yes	human

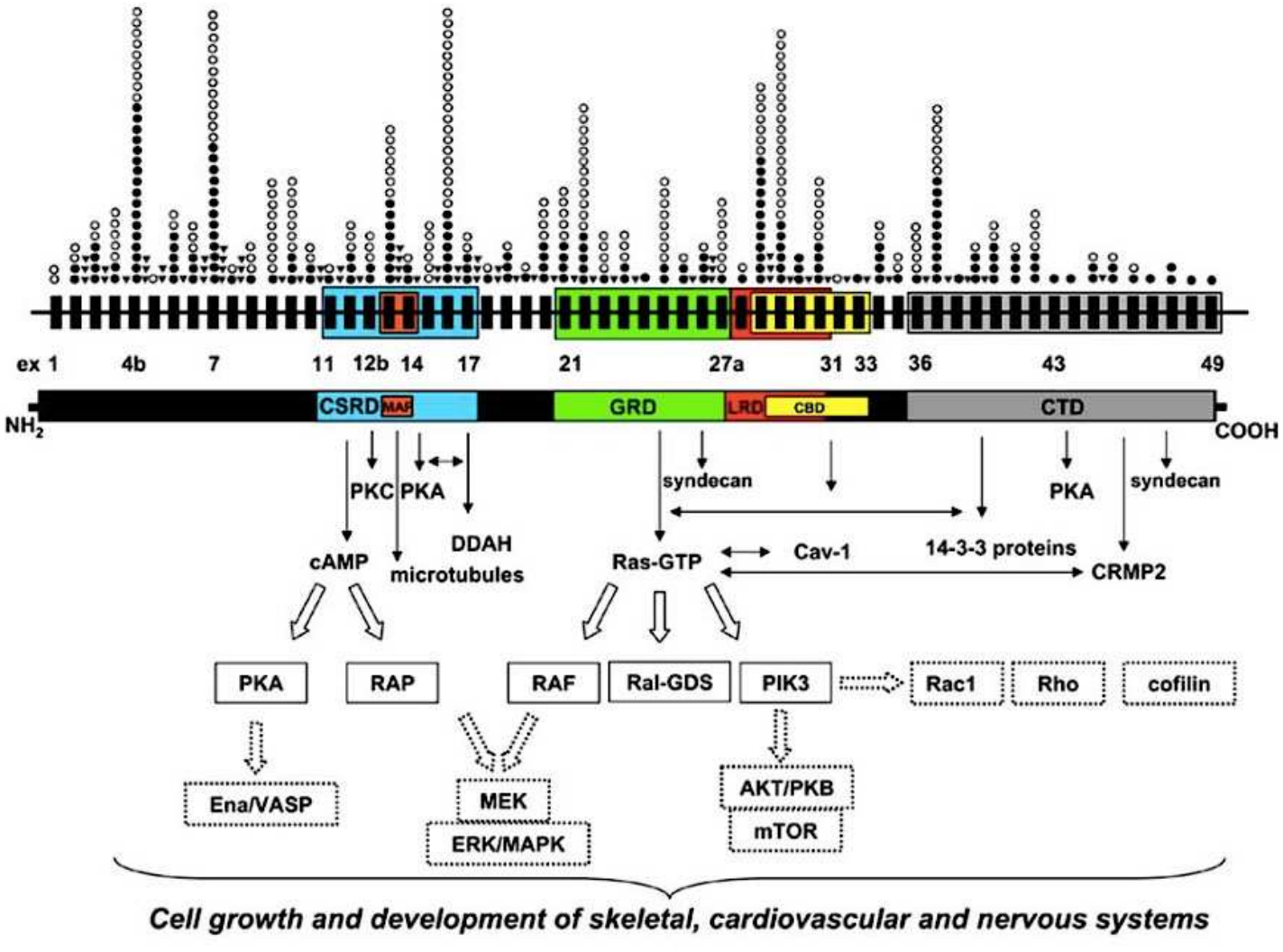


Figure 5 : Structure et fonction de la neurofibromine

Représentation schématique du gène *NF1* avec les exons représentés par des rectangles noirs encadrés dans les mêmes couleurs que les domaines correspondants de la neurofibromine.
En haut: il s'agit de la distribution du nombre de mutations à travers le gène *NF1* montrée exon par exon selon la base de données NF1 International Mutation (http://www.nfmutation.org/). Les cercles noirs représentent les mutations non-sens et du décalage du cadre de lecture, les cercles blancs correspondent à des mutations faux-sens et les triangles noirs représentent les mutations de site d'épissage. Chaque symbole fait référence à deux mutations.
Les domaines de la neurofibromine ayant une fonction biologique validée sont :

CSRD (bleu clair) = domaine riche en cystéine/sérine (exons 11-17) hébergeant trois sites de reconnaissance de la PKA dépendants de l'AMPc, y compris les sites de liaison du DDAH et les sites de reconnaissance de la PKC.
MAP (orange) = domaine protéique associé aux microtubules (exons 13-14) similaire à celui de tau
GRD (vert) = domaine lié à GAP (GTPase), y compris la région d'interaction syndecan (exons 21-27a)
LRD (rouge) = domaine riche en leucine (exons 27b-31)
CBD (jaune) = domaine de liaison de la cavéoline-1 (exons 28-33)
CTD (gris) = domaine C-terminal (exons 36-49), incluant la protéine 14-3-3, la région CRMP2 et la région d'interaction syndécane et les sites de phosphorylation de la PKA.

Les petites flèches noires relient des domaines spécifiques de la neurofibromine à des interacteurs majeurs tels que l'AMPc et la PKA, la PKC, les protéines associées aux microtubules, le DDAH, le Ras-GTP, les syndécans, les protéines Cav-1, 14-3-3 et le CRMP2.
Les larges flèches blanches indiquent l'implication des domaines de la neurofibromine dans les deux voies cellulaires les plus connues.

- cAMP / PKA / Ena-VASP
- La voie Ras-GTP avec les principaux interacteurs en aval:
  i) la cascade de signalisation Raf-MEK-ERK-MAPK connectée à la cascade de RAP
  ii) le stimulateur Ral-GDS, qui est un important régulateur de la survie cellulaire
  iii) la cascade PI3K / AKT / PKB / TSC1-TSC2 / mTOR impliquée dans la croissance et la prolifération cellulaire
  iv) PI3K- Cascade Rac1 – Rhocofilline impliquée dans la réorganisation du cytosquelette d'actine.

Ces voies sont, individuellement ou conjointement, impliquées dans des processus de développement spécifiques qui ne fonctionnent pas lorsque la neurofibromine est perdue ou altérée (Larizza et al., 2009).

E. Tableau clinique de la NF1

La pathologie NF1 est complexe et associe plusieurs symptômes (Fig. 6) qui se trouvent être d'expressions variables mais également qui diffèrent d'un individu à autre et qui évoluent avec l'âge, ce qui rend le diagnostic laborieux. En 1987, La conférence de consensus du National Institute of Health posera les sept critères qui permettront de diagnostiquer la pathologie. La présence de deux de ces critères chez un même individu permettra de poser le diagnostic de la NF1 (Tableau 2).

Tableau 2 : Critères diagnostiques de la NF1 selon la NIH

D'après Pinson and Wolkenstein, 2005

Critères diagnostiques de la NF1 (conférence de consensus du NIH, 1987)	Fréquence (%) et date d'apparition des manifestations cliniques de la NF1.
Si **deux** ou plus des signes suivants sont trouvés: • ≥ 6 taches cafés au lait > **5 mm** dans leur plus grand diamètre chez des individus prépubertaires ou > **15 mm** chez des individus pubères. • Des lentigines axillaires ou inguinales. • ≥ **2** nodules de Lisch. • **1** gliome optique. • ≥ **2** neurofibromes de n'importe quel type ou **1** neurofibrome plexiforme. • **1** lésion osseuse caractéristique, comme une dysplasie sphénoïde, un amincissement de la corticale des os longs avec ou sans pseudoarthrose. • **1** parent du 1er degré atteint de NF1 suivant les critères précédents	• Taches café au lait 99 à 100%, < 5 ans • Lentigines 50 à 80%, < 6 ans • Neurofibromes cutanés 100%, < 30 ans • Neurofibromes nodulaires 15 à 24%, enfance, âge adulte • Neurofibrome plexiformes 30 à 39%, < 5 ans • Xanthogranulome juvénile 1 à 2%, enfance • Nodule de Lisch 67 à 82%, > 6 ans • Gliome optique 5%, petite enfance • Pseudoarthrose 3 à 4%, enfance • Scoliose nécessitant la chirurgie 2 à 4,4%, enfance ou adolescence

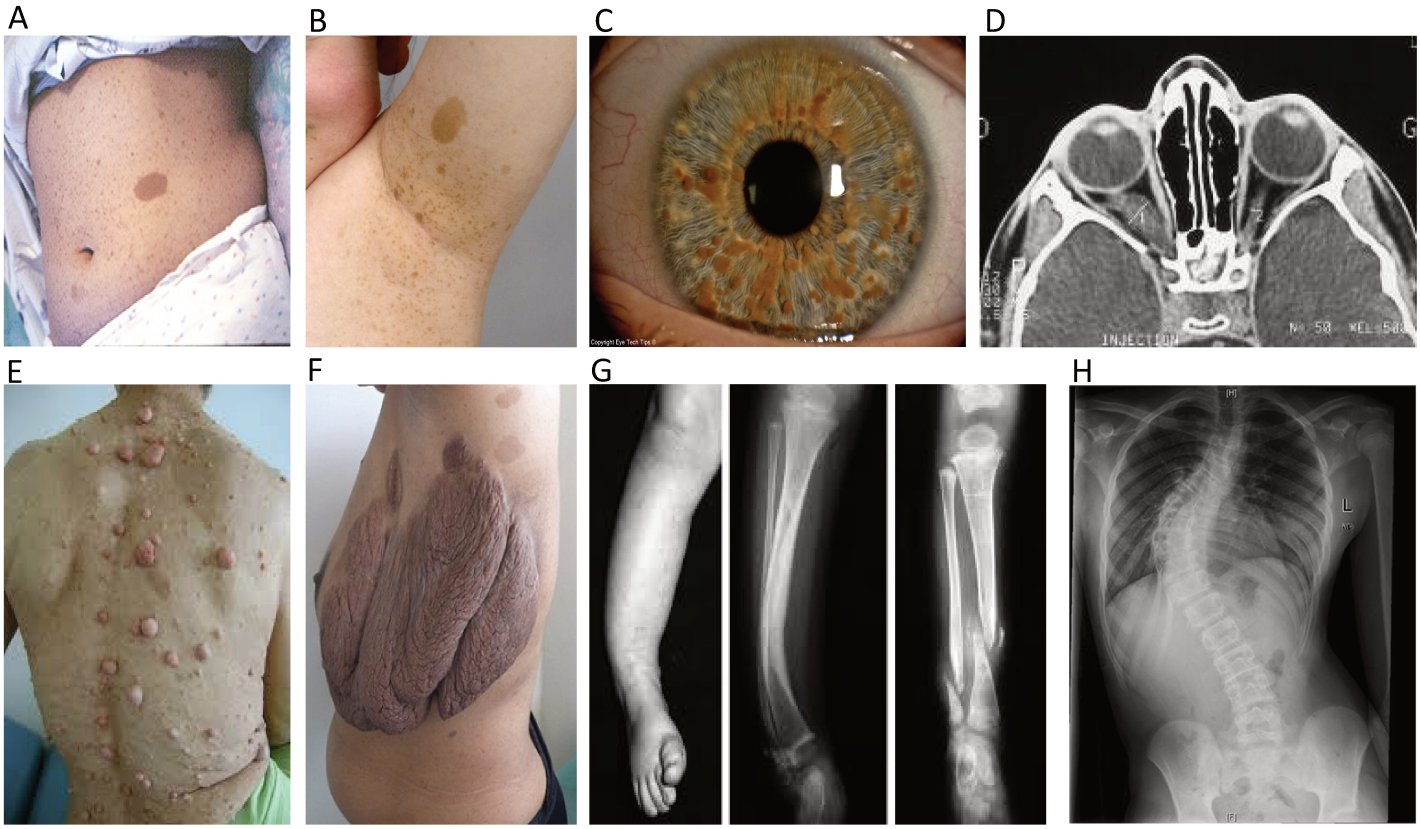


Figure 6 : Tableau clinique de NF1

(A) Tâche café au lait; (B) Lentigines axillaires; (C) Nodules de Lisch; (D) Gliome des voies optiques; (E) Neurofibromes cutanés; (F) Neurofibrome plexiforme; (G) Pseudoarthrose tibiale; (H) Scoliose.

1. Défauts pigmentaires

a) Taches Café au lait (Fig. 6A)

Les taches café-au-lait (TCL) sont des zones hyper-pigmentées de la peau. Elles sont les symptômes paranéoplasiques les plus communs et les plus étudiés de la pathologie. En effet, la présence de 6 TCL ou plus, de diamètre supérieur à 5 mm avant la puberté ou 15 mm après la puberté, est un critère diagnostic clinique de NF1. Ces zones hyper-pigmentées sont présentes dès la naissance ou apparaissent dans les deux premières années du patient (Ferner et al., 2006). Elles sont réparties sur le corps de façon aléatoire (Boyd et al., 2010) et sont dues à une forte concentration de mélanocytes (cellules

responsables de la pigmentation de la peau) et à une forte teneur en mélanine de ces derniers. Contrairement aux mélanocytes présents autour de la TCL, ceux présents dans la zone de la TCL montrent une inactivation bi-allélique de *NF1* (De Schepper et al., 2008). *In vitro*, des mélanocytes dérivés de TCL présentent une prolifération plus importante comparée à celle des mélanocytes de patients sains (Diwakar et al., 2008).

b) Lentigines (Fig. 6B)

Les lentigines sont des petites taches pigmentaires qui se différencient des TCL de par leurs tailles beaucoup plus petites. Elles sont observées après l'âge de 3 ans dans 85% des cas de patients atteints de NF1. On les distingue également des TCL, par leur localisation : on les retrouve au niveau des aisselles, dans les plis inguinaux, les paupières ou encore en dessous de la poitrine (Ferner et al., 2007).

c) Nodules de Lisch (Fig. 6C)

Ces nodules ont été mis en évidence en 1937 par Lisch et sont aujourd'hui considérés comme quasi pathognomoniques de la maladie. Il s'agit de petites tumeurs pigmentées de l'iris que l'on nomme hamartomes iriens qui sont principalement constitué de mastocytes, mélanocytes et fibroblastes (Richetta et al., 2004)

2. Gliome des voies optiques (Fig. 6D)

On retrouve la présence de ces gliomes dans environ 15% des enfants atteint de NF1. Ces tumeurs apparaissent le long des voies optiques et peuvent toucher les nerfs, le chiasma optique ou les réseaux post-chiasmatiques (Listernick et al., 1994; 1995). De façon évidente, la sévérité de la tumeur va dépendre de sa localisation, cependant de manière générale seulement 5 à 7% de ces gliomes sont symptomatiques (Listernick et al., 2007).

3. Défauts cognitifs

On retrouve, chez les patients NF1, des troubles de l'apprentissage et du comportement ainsi que des cas de QI inférieur à la population normale (North et al., 1997). En effet, on retrouve de nombreux enfants souffrant de troubles du déficit de l'attention, avec ou sans hyperactivité, mais également souffrant de troubles autistiques. Les soins prodigués à ces patients ne diffèrent pas de la prise en charge usuelle de ces troubles chez des patients non NF1 (Van der Valt et al., 2013, Lyon-François et al., 2014, Van der Vaart et al., 2016).

4. Neurofibromes

Il s'agit de tumeurs hétérogènes de la gaine des nerfs périphériques, constituées de plusieurs types de cellules : principalement de cellules de Schwann mais également de fibroblastes, mastocytes, cellules périneurales, le tout siégeant dans un important réseau de fibres de collagène. Les neurofibromes peuvent apparaitre sporadiquement chez un individu et de façon isolée mais il est vrai que le développement de neurofibromes multiples est caractéristique de la NF1 (Zhu et al., 2002). On distingue trois types de neurofibomes :

a) Cutanés. (Fig. 6E)

Ce sont des tumeurs bénignes qui n'apparaissent en général pas avant l'adolescence pour être présent à plus de 90% chez l'adulte (Duong et al., 2011). Elles correspondent à des pseudo-hernies de couleur proche de celle de la peau. Ces nodules sont en général dépressibles au toucher et non douloureux bien qu'ils puissent causer des démangeaisons et des sensations de picotement. Ils sont source de détresse psychologique pour les patients de par leur aspect inesthétique. En effet, ils peuvent varier en taille (de 0,1 cm à quelques centimètres) et en nombre (de quelques-uns à plusieurs milliers). Les seuls traitements proposés aujourd'hui pour pallier ce symptôme, résident soit dans l'exérèse des nodules (qui laisse une cicatrice importante) ou dans l'utilisation de laser dans le cas de lésions de petite surface.

b) Sous-cutanés.

A l'instar des neurofibromes cutanés, on les retrouve non plus situés sur la peau mais localisés profondément dans le derme. Ils se développent sur les troncs nerveux et ont une consistance ferme. Ce sont des tuméfactions sous-cutanées de tailles variables, parfois douloureuses et qui peuvent subir une transformation maligne. Ils sont présents chez 20% des malades à l'âge adulte.

c) Plexiformes. (Fig. 6F)

Les neurofibromes plexiformes (NF) sont des symptômes assez fréquents chez les personnes atteintes de NF1. Au cours de leur vie, on estime que 50% des patients NF1 développeront un neurofibrome plexiforme. Les NF poussent le long de la gaine des nerfs et peuvent impliquer plusieurs fascicules et branches du nerf (Korf et al., 1999). Ils peuvent se développer dans n'importe quelle partie du corps et ce tout au long de la vie du patient. Originellement bénignes, ces tumeurs peuvent subir une conversion maligne (sarcome) entrainant la mort du patient (Lin et al., 2013).

5. Lésions osseuses

Parmi les anomalies squelettiques engendrées par NF1, on peut différencier les manifestations dites généralisées (ostéoporose/ostéopénie, ostéomalacie et macrocéphalie) et les manifestations focales (scoliose et cyphoscoliose, courbures congénitales et pseudarthroses du tibia et de l'avant-bras, difformités de la paroi thoracique et tumeurs des tissus mous). Les complications focales apparaissent assez tôt dans la vie du patient et sont responsables d'une morbidité significative. Près de 38% des patients NF1 sont atteints d'anomalies squelettiques focales (Crawford et al., 1999). En effet les lésions des os longs, des vertèbres et des os craniaux sont les anomalies osseuses les plus représentées dans la NF1.

a) Pseudoarthrose tibiale (Fig. 6G)

La dysplasie des os longs, observée chez 5% des patients atteints de NF1 (Friedman and Birch, 1997) touche communément le tibia bien que d'autres os

long peuvent être touchés. Elle se manifeste fréquemment par une courbure antérolatérale de la partie inférieure de la jambe pouvant évoluer vers une fracture et une pseudarthrose. Ce symptôme se développe à l'enfance bien qu'un enfant peut naître avec une fracture et/ou une pseudarthrose, ou développer ces manifestations peu de temps après la naissance.

b) Scoliose (Fig. 6H)

Les enfants atteints de la NF1 développent une ou deux formes de scoliose : dystrophique ou non dystrophique.

Les manifestations non dystrophiques sont similaires à ce que l'on appelle des scolioses idiopathiques de l'adolescent. Ces malformations sont assez classiques même chez les enfants non atteints par la maladie.

A l'inverse les scolioses dystrophiques sont directement liées à la présence de neurofibromes qui vont entrainer des changements osseux au niveau de la colonne vertébrale. Il s'agit de la forme la plus sévère détectée par radiographie. Souvent, chez le patient, la scoliose est associée à des côtes anormalement minces, des os vertébraux affaiblis et des courbures vertébrales sévères, y compris une cyphose (voussure progressive du squelette dorsal) et des déformations rotationnelles. La prise en charge chirurgicale reste la seule option pour les patients.

c) Dysplasie de l'aile sphnéoidale

3 à 11% des sujets atteints de neurofibromatose de type 1 présente une dysplasie de l'aile sphénoidale qui se trouve être une malformation typique de la pathologie (Arrington et al., 2013). Elle est caractérisée entre autre par une proptose (déplacement vers l'extérieur de l'oeil) progressive.
Unilatéral dans la plupart des cas, la dysplasie osseuse sphénoïdale est souvent associée à un neurofibrome plexiforme dans le territoire du nerf trijumeau avec accumulation de liquide céphalorachidien (LCR). La chirurgie avec reconstruction de l'os reste là aussi, le traitement de choix.

F. Le traitement de la neurofibromatose de type 1

Aujourd'hui, il n'existe aucun traitement contre la pathologie dans son ensemble et il n'existe également aucun moyen d'empêcher l'apparition spécifique de certaines manifestations cliniques.

Evidemment, chaque complication clinique fait l'objet d'une surveillance accrue et les symptômes sont pris en charge à mesure de leur gravité. En priorité, les neurofibromes et les gliomes des voies optiques seront traités chirurgicalement par exérèse lorsque cela est possible suivi de chimiothérapie.

Les neurofibromes cutanés font l'objet d'interventions au laser.
Une veille clinique est mise en place en fonction de l'âge du malade et de l'évolution de la pathologie.

Les neurofibromes plexiformes ne peuvent qu'être retirés par chirurgie et cela reste une stratégie délicate en raison de la difficulté de la dissection et de l'importance du risque hémorragique. En effet l'ensemble des chirurgiens s'accorde sur la difficulté du geste opératoire et la difficulté de contrôler les saignements et éviter une anémie aigue secondaire.
De plus, l'exérèse d'un neurofibrome plexiforme n'empêche pas la formation d'autres neurofibromes et les chirurgies successives, en plus d'être invasives, peuvent avoir un retentissement esthétique non négligeable et par conséquence altérer de façon considérable la qualité de vie des patients.

1. Les essais cliniques NF1

Il y a aujourd'hui 170 études cliniques répertoriées sur ClinicalTrials.gov, dans le cas de NF1. Une liste non exhaustive est présentée dans le Tableau 3. Parmi ces études, 29 sont en phase I, 66 en phase II, 6 en phase III et 2 en phase IV. Des deux études en phase IV, celle dont les résultats sont accessibles, cible les troubles de type hyperactivité avec déficit de l'attention (TDAH) qui sont souvent rapportés chez les patients atteints de NF1. Ils ont émit l'hypothèse que les troubles d'apprentissage chez les enfants NF1 étaient liés aux symptômes du TDAH. Le traitement au méthylphénidate (MPD) a amélioré les troubles d'apprentissage lié au TDAH en agissant sur les neurotransmetteurs. L'objectif de l'étude était d'évaluer son efficacité sur les symptômes similaires à ceux liés au TDAH chez les enfants atteints de neurofibromatose de type 1 (7 à

12 ans). Ils ont réussi à démontrer l'efficacité sur du court terme du MPD pour améliorer la concentration des enfants atteints de NF1 (Lion François et al., 2014_ NCT00169611).

Tableau 3 : Liste non exhaustive des essais cliniques passés et en cours pour la NF1

Title	Status	Study results	Intervention
Neuropsychological Impairment and Quality of Life in Neurofibromatosis Type 1	Completed	No Results Available	•Other: Neuropsychological examination and quality of life measures
Vision, Attention and Reading in Neurofibromatosis Type 1 (NF1) Children	Not yet recruiting	No Results Available	•Other: Neuropsychological evaluation •Other: Evaluation of the reading assistance technique
A Randomized Placebo-Controlled Study of Lovastatin in Children With Neurofibromatosis Type 1	Completed	Has Results	•Drug: Lovastatin TM •Device: placebo
Hypotonia and Neurofibromatosis Type 1 (NF1) Glioma	Recruiting	No Results Available	•Device: Magnetic resonance imaging •Drug: Gadolinium contrast
Efficacy of Computerized Cognitive Training and Stimulant Medication in Neurofibromatosis Type 1	Recruiting	No Results Available	•Other: CogmedRM •Other: Mobymax
A Phase II Study of the mTOR Inhibitor Sirolimus in Neurofibromatosis Type 1 Related Plexiform Neurofibromas	Completed	Has Results	•Drug: Sirolimus
Effects of Physical Training on Bone and Muscle Quality, Muscle Strength, and Motor Coordination in Children With NF1	Completed	No Results Available	•Other: Plyometric training program
NF1-Attention: Study of Children With Neurofibromatosis Type 1 Treated by Methylphenidate	Completed	No Results Available	•Drug: methylphenidate
Effect of Lamotrigine on Cognition in NF1	Recruiting	No Results Available	•Drug: Lamotrigine •Drug: Placebo
Vitamin D Supplementation for Adults With Neurofibromatosis Type 1 (NF1)	Recruiting	No Results Available	•Drug: Cholecalciferol

G. Les modèles d'études NF1

L'étude de NF1 grâce à des modèles cellulaires a permis d'étendre les connaissances sur les mécanismes liés à la pathologie. Des cellules dérivées de patients NF1 ainsi que des cellules primaires de souris mutantes ont été particulièrement utiles dans cet effort (Guo et al., 2017). En ce qui concerne le développement des neurofibromes, l'un des objectifs a été d'essayer d'identifier des défauts cellulaires spécifiques, établissant ainsi les types de cellules dans lesquelles la fonction NF1 est critique (Le et al., 2009 ; Spyra et al., 2011). Étant donné la complexité de ces lésions, il n'est pas surprenant que la NF1 ait un rôle dans tous les types de cellules qui comprennent les neurofibromes; cellules de Schwann, neurones, cellules périneurales, fibroblastes et mastocytes (Muir et al., 2001 ; Li et al., 2016).

En plus de l'utilisation de modèles cellulaires primaires ou immortalisées, des méthodes de transduction par siRNA ont été développées permettant notamment de mettre en évidence un phénotype caractéristique de la pathologie dans un type cellulaire d'intérêt (Mellert et al., 2018 ; Allouche et al., 2015). L'équipe de Larribère et al., a ainsi pu démontrer, avec l'utilisation des siRNA, que la perte de l'expression de la neurofibromine entrainait la senescence des melanocytes adultes. Dans cette étude, l'utilisation de siRNA a été choisi dans le but de confirmer des résultats obtenus à partir de cellules souches induites à la pluripotence porteuses de la mutation *NF1* (Larribère et al., 2015).
Ces observations confirment en outre la possibilité que, même si des défauts dans un type de cellule peuvent déclencher une tumorigenénèse, plusieurs types de cellules peuvent contribuer à leur développement. Afin d'approfondir les recherches sur NF1, l'utilisation de modèles animaux est indispensable.

NF1 est la RASopathie la plus étudiée dans les modèles animaux. En effet, plusieurs des principaux phénotypes associés à NF1 ont été récapitulés en utilisant des organismes modèles. Ces études ont permis de comprendre progressivement les bases moléculaires et cellulaires de plusieurs phénotypes associés à la NF1. Les deux premiers modèles de souris pour NF1 (Nf1+/Fcr et Nf1+/n31) ont été établis il y a plus de 20 ans en insérant une cassette néomycine dans la région exonale de l'exon 31 de Nf1 (Brannan et al., 1994, Jacks et al., 1994) permettant l'invalidation du gène. Alors que les lignées de souris hétérozygotes pour ces insertions ne présentent aucun phénotype de la NF1, les deux lignées homozygotes présentent des malformations cardiaques et des défauts de la crête neurale, entraînant une létalité embryonnaire à environ

12,5-14 jours de gestation (Brannan et al., 1994, Lakkis et al., 1999). Les modèles NF1 de drosophile sont également présents depuis environ 20 ans, et ont été créés en utilisant une insertion d'élément P-transposon dans la région du gène Nf1 (The et al., 1997). Contrairement aux souris Nf1-/-, les mouches Nf1-/- sont viables, mais présentent des défauts de croissance généraux post-embryonnaires, tels qu'une taille réduite des larves et des adultes. De tels défauts de croissance généraux sont également rapportés chez les individus atteints de NF1. Les modèles NF1 de drosophile présentent certains phénotypes uniques, y compris une tendance réduite à s'envoler lorsqu'ils sont libérés (The et al., 1997, Tong et al., 2007). Les modèles Nf1-knockout générés plus récemment chez le poisson-zèbre présentent des défauts de pigmentation (Shin et al., 2012), tandis que les modèles de poisson-zèbre induits par morpholino présentent des anomalies cardiaques (Padmanabhan et al., 2009).

Une autre approche implique la génération de souris knock-out conditionnelles spécifiques aux cellules. Récemment, des souris ont été générées par Luis Parada et ses collègues, dans lesquelles le gène est perturbé sous certaines conditions grâce à la technologie Cre-LoxP (Bajenaru et al., 2002). Dans cette approche, des exons spécifiques du gène *Nf1* sont encadrés par des séquences recombinatoires de LoxP placées dans des introns non codants. Ces souris flox Nf1 ne peuvent pas être distinguées phénotypiquement des souris de type sauvage, car l'insertion de ces séquences LoxP ne perturbe pas l'expression du gène *Nf1*. L'inactivation du gène *Nf1* se produit en présence de l'enzyme bactériophage Cre recombinase, qui peut être exprimée *in vitro* par délivrance adénovirale ou *in vivo* en utilisant des promoteurs spécifiques de tissu dans des souris transgéniques. Plusieurs souris knock-out conditionnelles *Nf1* ont été générées, y compris celles présentant une inactivation *Nf1* spécifique des neurones (Hegedus et al. 2007, Wang et al. 2012), spécifique des astrocytes (Bajenaru et al., 2002, Bajenaru et al., 2003) et spécifique des cellules de Schwann (Keng et al., 2012). L'ablation de *Nf1* dans les neurones à l'aide du promoteur synapsin-I se traduit par des souris viables présentant des retards de croissance, une astrogliose cérébrale massive et des anomalies du développement cortical (Zhu et al., 2001). L'astrogliose dans ce modèle semble être la réponse d'une fonction neuronale anormale et n'est pas liée à une prolifération accrue des astrocytes. En revanche, l'inactivation de *Nf1* spécifique aux astrocytes semble être insuffisante pour la formation d'astrocytomes, mais confère un avantage de croissance significatif pour les astrocytes *in vitro* et *in vivo* (Bajenaru, Zhu, Parada et Gutmann, observations

non publiées).

Les modèles animaux développés pour l'étude des défauts osseux et des neurofibromes seront développés dans les chapitres correspondants de ce manuscript.

Malheureusement, les modèles animaux disponibles n'offrent pas une représentation exacte de la maladie, car les animaux ne présentent pas l'ensemble des symptômes observés dans NF1. Ces modèles ont permis d'améliorer les connaissances sur le rôle du produit du gène *NF1* dans la pathogenèse de la NF1 et d'autres tumeurs apparentées. Ils ont également contribué à mieux comprendre la biologie du produit du gène *NF1* et ont mis en exergue de nouvelles conséquences biologiques, jusqu'alors inconnues, de l'altération de ce produit (Fig. 7). Néanmoins, cette année, une équipe à générée un modèle de mini porc du Yucatan portant une mutation hétérozygote dans *NF1* (délétion de l'exon 42) orthologue à une mutation trouvée chez les patients atteints de NF1. Le mini porc NF1+/ex42del phénocopie le large éventail de manifestations observées chez les patients atteints de NF1, notamment les taches café-au-lait, les neurofibromes, les lentigines axillaires et les défauts d'apprentissage et de mémoire (White et al., 2018). C'est un des premiers modèles animaux qui reproduit autant de symptômes de la pathologie.

Une des lacunes majeures dans la recherche sur la maladie NF1, est le manque de modèles cellulaires pertinents, ralentissant les progrès des chercheurs. En effet, la dépendance aux modèles animaux pour comprendre la pathologie et identifier les agents qui pourraient être efficaces contre les symptômes sont extrêmement couteux et chronophage. Bien sûr, la possibilité de travailler sur des cellules spécifiques de la pathologie permettrait également d'étendre les connaissances acquises à propos de NF1. Les cellules souches sont donc des candidats prometteurs pour permettre une modélisation pathologique la plus représentative de la maladie.

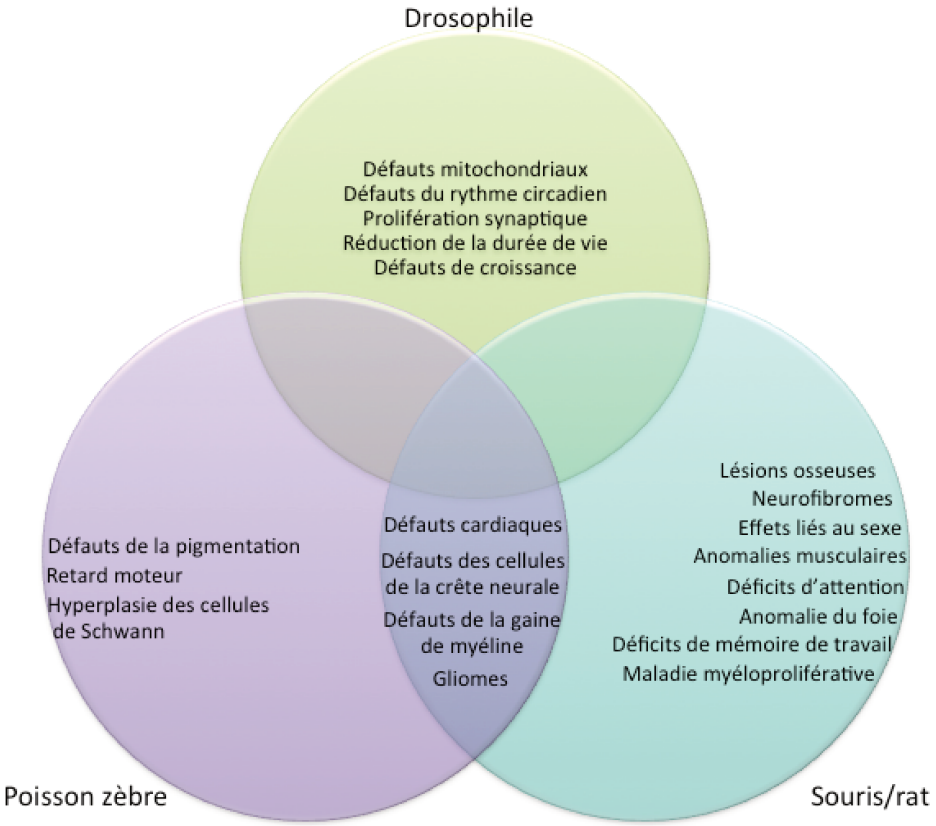


Figure 7 : Diagramme de Venn des modèles NF1

Représentation des différents phénotypes modélisés dans des modèles animaux pour l'étude de NF1. Adapté de Jendal et al., 2015

II. Les cellules souches pluripotentes humaines (CSPh)

A. Généralités

Les cellules souches pluripotentes humaines (CSPh) ont la capacité de se renouveler indéfiniment en culture tout en conservant la possibilité de se différencier en n'importe quel type cellulaire (Takahashi et al., 2007, Thomson et al., 1998, Yu et al., 2007) (Fig. 8) On distingue deux catégories de CSPh: les cellules souches embryonnaires humaines (hESC) et les cellules souches humaines induites à la pluripotences (hiPSC).

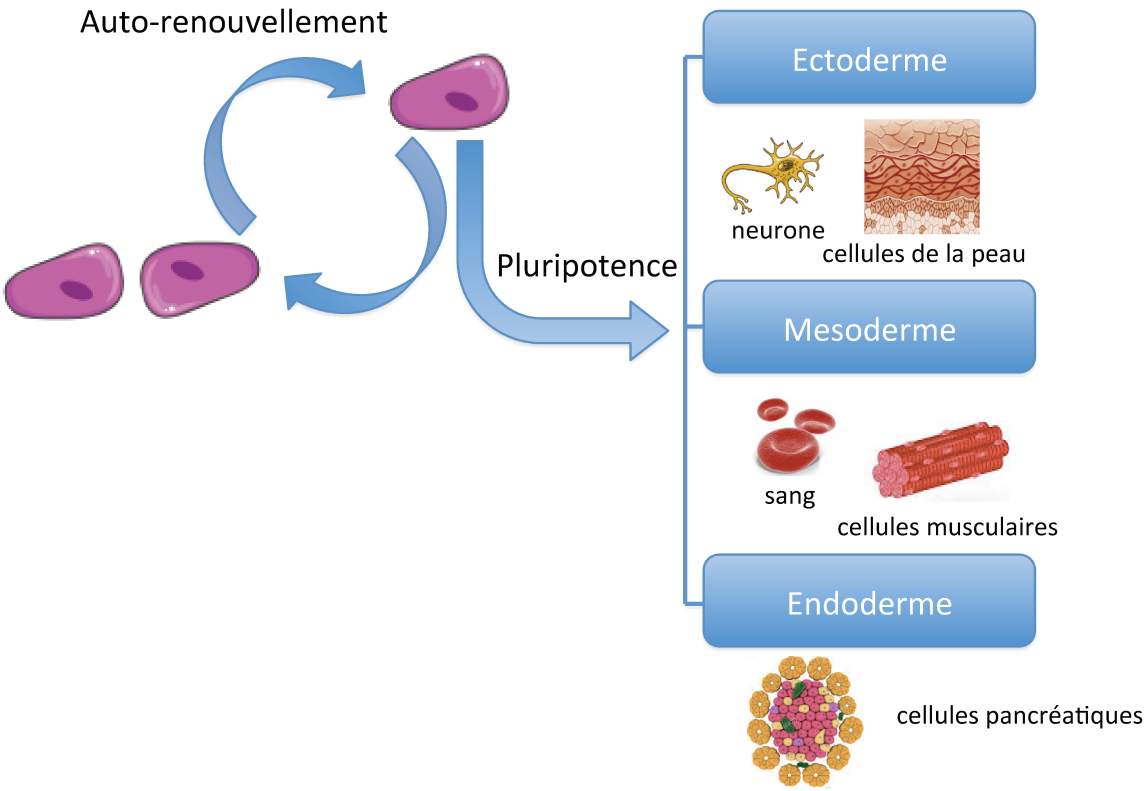


Figure 8 : Caractéristiques des cellules souches pluripotentes

L'auto-renouvellement est une des propriétés caractéristiques des cellules souches pluripotentes, elles se multiplient indéfiniment par division mitotiques. La plasticité exceptionnelle de ces cellules, leurs permettent de se différencier dans n'importe quels types cellulaires (schéma non exhaustif).

Un peu d'histoire

1981, les débuts. (Evans et al., 1981)

Martin Evans de l'Université de Cardiff au Royaume-Uni, puis à l'Université de Cambridge, est le premier à identifier chez la souris les cellules souches embryonnaires. Il a ainsi été un des premiers à pouvoir les amplifier en culture. Ce qui lui a permis de pouvoir les modifier génétiquement puis d'implanter ces cellules souches modifiées chez des souris femelles adultes dans le but de créer une progéniture génétiquement modifiée. La disponibilité de ces cellules souches cultivées a finalement permis l'introduction de modifications génétiques spécifiques dans la lignée germinale de souris et la création de souris transgéniques à utiliser comme modèles expérimentaux pour des maladies humaines.

1997, Dolly la brebis. (Wilmut et al., 2018)

Ian Wilmut et ses collègues de l'Institut Roslin d'Edimbourg présentent au monde entier Dolly, le premier mammifère né sans qu'un ovule et un spermatozoïde ne se rencontrent. Il s'agit là du premier clone animal (mammifère) artificiel. La manipulation génétique consiste à extraire le noyau cellulaire de cellules de glande mammaire d'une brebis (nommée Geenies) et de le réincorporer dans une ovule énuclée d'une autre brebis (nommée Bélinda). Sur les 277 oocytes fécondés seulement 30 sont devenus des embryons et un seul d'entre eux s'est développé jusqu'à l'âge adulte: Dolly était née. Fort de ce succès, les chercheurs supposent que des hybrides similaires, obtenus en fusionnant des cellules souches embryonnaires humaines avec des cellules adultes d'une personne donnée, pourraient être utilisés pour créer des tissus et des organes génétiquement appariés (Sumer et al., 2005)

1998, les cellules souches ... humaines. (Thomson et al., 1998)

James Thomson de l'Université du Wisconsin à Madison et John Gearhart de l'Université Johns Hopkins à Baltimore isolent des cellules souches embryonnaires humaines à partir du blastocyte d'embryons et les cultivent en laboratoire.

2001, la controverse de Bush.

Le président américain George W. Bush limite le financement fédéral de la recherche sur les hESC parce qu'un embryon humain est détruit dans le processus. Mais G.W. Bush autorise la poursuite des recherches sur les lignées de cellules souches embryonnaires humaines qui ont été créées avant l'annonce des restrictions.

2005, des clones frauduleux. (Science 2004 – Retracted article)

Woo-Suk Hwang de l'Université nationale de Séoul en Corée du Sud rapporte que son équipe a utilisé le clonage thérapeutique - une technique inspirée de celle utilisée pour créer Dolly - pour créer des cellules souches embryonnaires humaines. Il présente et publie la génération de 11 lignées de cellules souches, chacune obtenues à partir de personnes différentes. Finalement, fin 2005, une commission d'enquête de l'Université de Séoul confirme que ses résultats sont falsifiés. En 2006, Woo Suk Hwang sera inculpé par les autorités sud-coréennes pour « fraude, détournement de fonds et violation des lois sur la bioéthique ».

2007, un premier prix Nobel

Martin Evans partage le prix Nobel de médecine avec Mario Capecchi et Oliver Smithies pour des travaux sur la génétique et les cellules souches embryonnaires.

2009, Obama-power

Le président Barack Obama lève les restrictions de 2001 sur le financement fédéral pour la recherche sur les hESC.

2010, Premier succès humain. (Lebrowski Jane, 2011)

Une personne atteinte d'une lésion de la colonne vertébrale devient le premier patient à recevoir un traitement médical dérivé de hESC dans le cadre d'un essai mené par la société Geron de Menlo Park, Californie, pionnière pour les thérapies utilisant des hESC

2012, Cécité bientôt traitée ? (Shwartz et al., 2012)

Pour la première fois, des cellules souches embryonnaires humaines (différenciées en cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien) ont été greffées à des patientes atteintes de maladies de l'œil : la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) et la maladie de Stargardt. L'expérience menée par la société américaine Advanced Cell Technology (ACT) se révèle très prometteuse puisque les patientes ont montré une augmentation de leur acuité visuelle (Schwartz et al., 2012).

2012, un autre prix Nobel

Le prix Nobel de Physiologie/Médecine est attribué à Shinya Yamanaka (Université de Kyoto) pour la création des hiPSC, ainsi qu'à John Gurdon (Université de Cambridge) pour le clonage.

2012, les premiers organoides. (Eiraku et al., 2012)

Yoshiki Sasai et ses collègues ont été les premiers à aller plus loin en se demandant si un tel système *in vitro* pourrait récapituler certains des systèmes de régulation robustes de l'organogenèse en termes non seulement de différenciation cellulaire, mais aussi de configuration spatiale et de morphogenèse. Dans un remarquable tour de force, ils ont développé des méthodes pour générer des structures cérébrales, de la rétine et de l'hypophyse

2013, Clonage thérapeutique. (Tachibana et al., 2013)

Shoukhrat Mitalipov au Oregon National Primate Research Center à Beaverton et ses collègues produisent des hESC à partir de cellules fœtales en utilisant le clonage thérapeutique - la percée faussement revendiquée en 2005 est cette fois-ci validée.

2014, Etat pré-embryonnaire. (Obokata et al., 2014)

Charles Vacanti du Harvard Medical School et Haruko Obokata du Centre de biologie du développement de Riken à Kobe, au Japon, et ses collègues ont annoncé une découverte révolutionnaire selon laquelle toute cellule peut potentiellement être renvoyée à un état pré-embryonnaire - en utilisant une technique simple de 30 minutes. Cette technique consiste à exposer Les cellules à un environnement acide "sous-létal", avec un pH de 5,7, pendant 30 minutes. Puis de laisser ces cellules croître en laboratoire. Après seulement 7 jours, les cellules qui ont survécu au choc, présentent des marqueurs spécifiques de pluripotence, les mêmes que ceux présents dans les cellules souches embryonnaires. L'équipe nomme les cellules ainsi obtenues des cellules STAP (Stimulus-Triggered Aquisition of Pluripotency). Cependant, l'équipe d'Obakata annonce le 19 décembre 2014, que les recherches sur les cellules STAP sont arrêtées, le phénomène décrit n'ayant jamais pu être reproduit.

2014, Clonage thérapeutique - avec des cellules adultes. (Egli et al., 2014 – Chung et al., 2014)

Les équipes dirigées par Dieter Egli de la New York Stem Cell Foundation et Young Gie Chung de l'Université CHA à Séoul, en Corée du Sud, produisent indépendamment des cellules souches embryonnaires humaines à partir de cellules adultes, en utilisant le clonage thérapeutique. L'équipe d'Egli utilise des cellules cutanées d'une femme atteinte de diabète et démontre que les cellules souches résultantes peuvent être transformées en cellules bêta productrices d'insuline. En théorie, les cellules pourraient être utilisées pour remplacer celles perdues à cause de la maladie.

2014, Essais sur l'homme

Le premier essai au monde d'une thérapie basée sur des hiPSC a été mené à Kobe (Japon) sur une patiente atteinte de dégénérescence maculaire liée à l'âge (Masayo Takashi, Centre Riken). L'essai a été stoppé à l'apparition d'un œdème rétinien six mois après la transplantation.

2016, Reproduction de l'oogénèse in vitro.(Morohaku et al., 2016)

Des scientifiques japonais dirigés par Katsuhiko Hayashi de l'Université de Kyushu à Fukuoka transforment des cellules de peau de souris en oocytes. Les souris qui ont reçus ces oocytes ont donné naissance à une progéniture fertile, avec un maximum de sept petits issus d'une gonade de culture.

2018, « Embryo in a dish ». (Rivron et al., 2018)

Des scientifiques néerlandais ont construit des embryons «synthétiques» dans leur laboratoire en utilisant des cellules souches de souris autres que les spermatozoïdes et les oocytes. L'objectif final étant de pouvoir avoir une meilleure compréhension sur les raisons pour lesquelles de nombreuses grossesses échouent à un stade précoce.

B. Cellules souches embryonnaires humaines (hESC)

1. Origine des hESC

Solter et Knowles ont développé en 1975 une procédure d'immunochirurgie encore utilisée aujourd'hui, pour la dérivation des cellules ES à partir du blastocyte d'embryon de souris. Cette stratégie a ensuite été appliquée à d'autres mammifères, et c'est en 1998 que la première lignée d'ESC humaine a été isolée (Thomson et al., 1998), suscitant de nombreux espoirs pour la recherche médicale. Les ESC humaines sont principalement isolées à partir d'embryons au stade blastocyste provenant d'œufs fécondés *in vitro* associés ou non à un diagnostic pré-implantatoire (Fig. 9). Entre le 5ème et 7ème jour après fécondation, le blastocyte humain se compose de l'épithélium trophectodermique environnant, de la masse cellulaire interne (MCI) et de l'endoderme extra-embryonnaire (Pera et al., 2004, Reubinoff et al., 2000). Le trophectoderme participe à la formation du placenta, la masse cellulaire interne donne naissance à toutes les cellules du corps, tandis que l'endoderme extra-embryonnaire fournit à l'embryon des nutriments et des informations structurales (Bielinska et al., 1999). La MCI est une structure constituée de l'hypoblaste (à l'origine du sac vitellin et de l'endoderme pariétal) et de l'épiblaste, siège des cellules pluripotentes. En plus de se différencier par leurs composantes, ces deux structures se distinguent par leur localisation : l'hypoblaste se retrouve plus en profondeur et l'épiblaste forme une couche de cellules à la surface de la MCI (Chazaud, 2008). Les hESC représentent donc les cellules pluripotentes de l'épiblaste (Shamblott et al., 1998; Thomson et al., 1998).

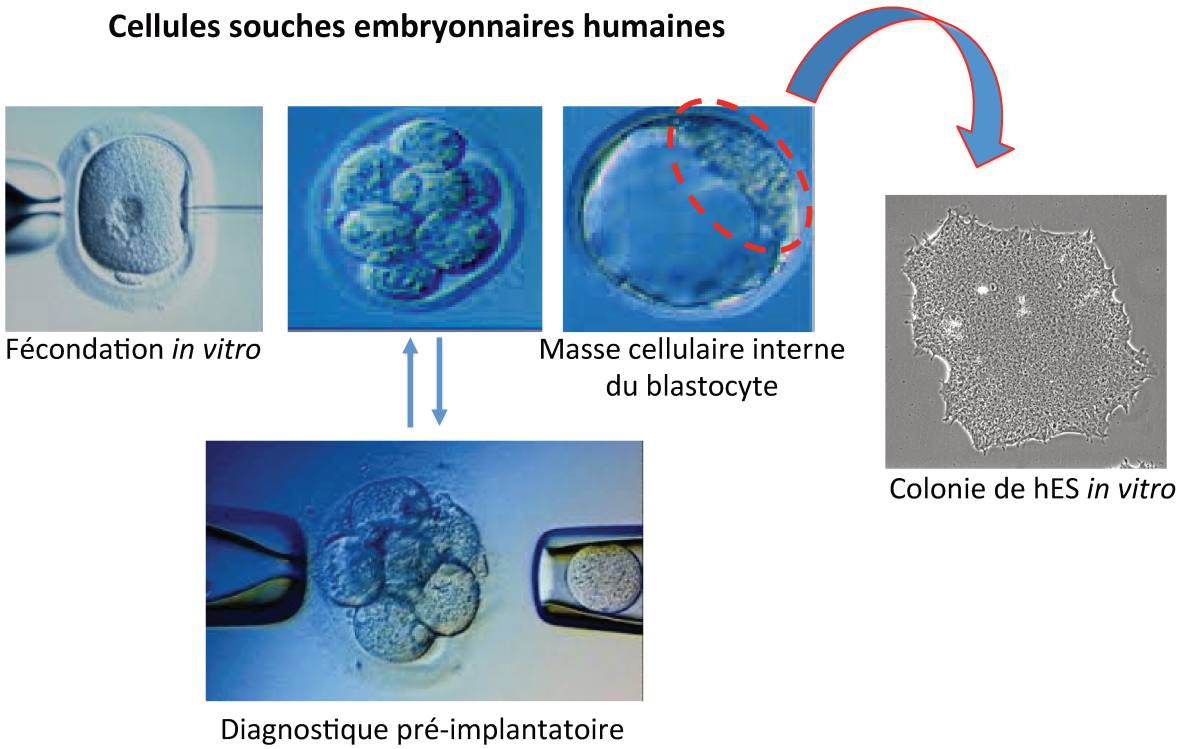


Figure 9 : Obtention et dérivation des cellules souches embryonnaires humaines

Les cellules hES sont obtenues à partir des cellules de la masse interne du blastocyte au 5-7e jour après fécondation et après diagnostique pré-implantatoire. Adapté de (Gauthier et al., 2011).

2. Diagnostic pré-implantatoire et hESC pathologiques

Les cellules souches embryonnaires sont obtenues à partir d'embryons provenant de procédure de fécondation in vitro (FIV). Les embryons non implantés et donc surnuméraires peuvent être donnés à la recherche par consentement éclairé de la famille. Le diagnostic pré-implantatoire est effectué pour écarter tout risque d'implantation d'un embryon porteur de mutations génétiques lorsqu'il y a des cas de maladie génétique dans le pattern familial (Tableau 4). Ce test a lieu au stade de la morula (8 cellules), deux cellules (blastomères) sont prélevées et utilisées pour établir le diagnostic génétique de l'embryon sans qu'il n'y ait de conséquence pour le développement de l'embryon qui a subi le prélèvement. Le génome des deux blastomères va être analysé indépendamment afin d'identifier de mutations génétiques ou des défauts chromosomiques.

Ces embryons porteurs de mutations peuvent ainsi être utilisés pour la génération de cellules souches embryonnaires (Mateizel et al., 2006),

permettant ainsi l'étude de cellules pathologiques pour une meilleure compréhension de la mise en place et le développement de la maladie. Cependant, seules quelques mutations sont testées lors du DPI : comme par exemple les mutations causales de la mucoviscidose, de la myopathie de Duchenne, du syndrome de l'X fragile, de la Dystrophie Myotonique de type I, de la maladie de Huntington ou de la neurofibromatose. On compte aujourd'hui près de 150 lignées de hESC pathologiques qui sont utilisées pour modéliser certaines maladies génétiques humaines (Ben-Yehudah et al., 2012).

Tableau 4 : Liste des maladies monogéniques analysées par DPI selon la Société européenne de reproduction humaine et d'embryologie (ESHRE Consortium)

Liste des maladies monogéniques analysées par DPI selon la Société européenne de reproduction humaine et d'embryologie (ESHRE Consortium).
• Achondroplasie • Acidurie glutarique de type 1 • Adrénoleucodystrophie • Alpha-thalassémie • Amyotrophie spinale • Amyotrophie spinale et bulbaire • Anémie de Fanconi • Anémie falciforme • Ataxie spinocérébelleuse de type 1, 2 et 3 • Charcot-Marie-Tooth • Chorée de Huntington • Défaut congénital de glycosylation de type Ia • Déficit en alpha-1-antitrypsine • Dysautonomie familiale • Dysplasie spondylo-métaphysaire type Schmidt • Dystonie 1, Torsion • Dystrophie facio-scapulo-humérale • Dystrophie musculaire d'Emery-Dreifuss • Dystrophie musculaire de Duchenne et Becker • Dystrophie myotonique • Exostose multiple • Fibrose kystique • Hémophilie A et B • Hypoglycémie hyperinsulinémique • Incontinentia pigmenti • Leucodystrophie métachromatique • Lymphohistiocytose hémophagocytaire • Maladie de Menkes • Maladie de Pompe • Mucopolysaccharides de type II (syndrome de Hunter) • Néoplasie endocrine multiple (NEM2) • Neurofibromatose de type I et II • Ostéogenèse imparfaite • Paralysie périodique hypokaliémique • Paraplégie spastique 4 • Polykystose rénale autosomique dominante • Polykystose rénale autosomique récessive • Polyneuropathie amyloïdotique familiale • Polypose adénomateuse familiale • Sclérose latérale amyotrophique • Sclérose tubéreuse • Surdité de perception non syndromique • Syndrome d'Alport • Syndrome de Crouzon • Syndrome de Holt-Oram • Syndrome de Lynch • Syndrome de Marfan • Syndrome de Norrie • Syndrome de Smith-Lemli-Opitz • Syndrome de Von Hippel-Lindau • Tay-Sachs • Treacher Collins

3. Les lois de bioéthique et réglementations relatives à l'utilisation des cellules embryonnaires humaines : Cadre législatif français

Le développement des techniques d'assistance médicale à la procréation a généré la création de milliers d'embryons dits surnuméraires, c'est-à-dire ne faisant plus l'objet d'un projet parental, soit parce que la grossesse espérée a abouti, soit parce que le couple a renoncé à toutes nouvelles tentatives d'implantation ou parce qu'il ne remplit plus les conditions exigées par la loi. Se pose alors la question du devenir de ces embryons surnuméraires.
La dérivation de lignée hESC à partir d'embryon entraine inéluctablement la destruction du dit embryon soulevant ainsi de nombreuses questions éthiques et a entrainé la mise en place de législations limitant voir interdisant l'exploitation en recherche de ces cellules dans de nombreux pays.
En France, la loi du 29 juillet 1994 est la première loi relative à l'encadrement de la biomédecine. Elle a autorisé la destruction des embryons surnuméraires à la demande du couple ou en dehors de toute demande lorsque le couple ne réitérait pas sa volonté de conservation. Cependant, toute recherche scientifique sur l'embryon est totalement interdite.

Dix ans plus tard, le 6 août 2004, la loi est révisée et la rigueur de cette interdiction est revue à la baisse en l'assortissant d'un principe dérogatoire. En effet, la recherche sur les embryons surnuméraires et les cellules souches est toujours interdite sauf dérogation aux deux conditions suivantes : permettre des progrès thérapeutiques majeurs et ne pouvoir être effectuée par une méthode alternative d'efficacité comparable en l'état des connaissances scientifiques. Lorsque ces conditions sont respectées, la recherche est autorisée sur une période de 5 ans.

Lors de la révision de la loi de 2004 par celle du 7 juillet 2011, le principe de loi s'inscrit dans la continuité en perdurant l'interdiction sauf dérogation mais cette fois ci sans limite de temps.

La loi du 6 mai 2013 autorise enfin la recherche sur l'embryon et les cellules souches sous contrôle strict. C'est une victoire dans le monde scientifique mais la législation reste très contraignante entravant les avancées thérapeutiques. Néanmoins, l'équipe du Dr.Baldeschi a pu obtenir cette autorisation pour la réalisation de travaux de recherche concernant une meilleure compréhension de la NF1. J'ai ainsi pu travailler avec une lignée d'hESC saine et une atteinte de

la NF1 pour réaliser une partie de mes travaux de thèse.

La loi de bioéthique encadrant la recherche sur l'embryon du 7 juillet 2011 va être révisée en 2018. La loi mentionne que «tout projet de réforme sur les problèmes éthiques et les questions de société soulevés par les progrès de la connaissance dans les domaines de la biologie, de la médecine et de la santé doit être précédé d'un débat public sous forme d'États généraux, organisés à l'initiative du CCNE». Ces États généraux ont eu lieu au premier semestre de 2018 et l'ensemble des travaux, arguments, opinions, ont été restitués dans un rapport de synthèse publié en juin 2018.
Les propositions suivantes ont été proposées :

- Le CCNE rappelle la pertinence éthique de l'interdiction de la création d'embryons à des fins de recherche.
- Le CCNE propose de ne plus soumettre la recherche sur l'embryon et celle sur les lignées de cellules souches embryonnaires au même régime juridique; les enjeux éthiques associés à ces deux types de recherche s'avérant différents
- Le CCNE considère qu'il apparait légitime de ne pas soumettre les cellules souches embryonnaires humaines (hESC) au régime juridique de l'embryon, mais à une simple déclaration. Il est toutefois nécessaire d'envisager un nouveau corpus juridique pour encadrer les recherches que la disponibilité de cellules souches pluripotentes (hESC et hiPS) rend possibles.
- Le CCNE souhaite que le nouvel encadrement législatif afférent à la recherche sur l'embryon soit précisé, clarifié sur les points suivants: la création d'embryons transgéniques, la création d'embryons chimériques, la limite temporelle au temps de culture de l'embryon.
- Le CCNE s'interroge par ailleurs sur la nécessaire inscription dans la loi des deux prérequis à la recherche sur l'embryon que sont la finalité médicale et l'absence d'alternative. Un cadre plus général pourrait garantir le principe du respect de l'embryon, sans brider la recherche, tout en s'assurant de la qualité scientifique de l'équipe de recherche, la solidité du protocole, et l'argumentation scientifique.
- Le CCNE souhaite que compte-tenu de la diversité des protocoles développant une recherche sur l'embryon ou les hESC, et des questions éthiques nouvelles liées à l'émergence des applications sensibles issues des hiPSC, une réflexion approfondie soit conduite sur les procédures d'information et de consentement dans ces nouvelles situations.

C. Cellules souches humaines induites à la pluripotence (hiPSC)

1. Origine des hiPSC

En plus des questions éthiques, les hESC portent le débat sur les aspects de réactions antigéniques lorsque des cellules hESC dérivées de cellules somatiques d'un individu sont transplantées chez un autre individu. Le système immunitaire du receveur peut potentiellement rejeter ces cellules.

Par conséquent, la nécessité de produire des cellules souches pluripotentes spécifiques au patient est devenue évidente en plus de pouvoir en apprendre plus sur le développement embryonnaire humain. Les scientifiques ont tenté de reprogrammer des cellules somatiques pour développer un nouveau type de cellules souches avec des propriétés d'auto-renouvellement et de pluripotence à travers de nombreuses méthodes, comme le transfert nucléaire (Wilmut et al., 1997; Chesné et al., 2002) ou la fusion cellulaire (Ying et al., 2002).

La naissance de la brebis Dolly en 1996 a prouvé qu'un mammifère pouvait être cloné avec succès à partir de cellules adultes (Wilmut et al., 1997), mais c'est en 2006 qu'un groupe japonais a fait une percée remarquable. Takahashi et Yamanaka ont réussi à générer des cellules souches induites à la pluripotence de souris en sur-exprimant certains facteurs de transcription (Fig. 10). Les vecteurs initialement utilisés pour la génération des iPSC étaient des vecteurs intégratifs, qu'il s'agisse de rétrovirus ou de lentivirus. Ces vecteurs compromettent une utilisation thérapeutique des iPSC, du fait d'une réactivation potentielle non désirée des transgènes et du risque de mutagenèse insertionnelle, bien que ces mêmes vecteurs soient utilises en thérapie génique. La réactivation de l'oncogène c-MYC pose notamment problème car elle peut conduire à la formation de tumeurs. Afin de s'affranchir des problèmes liés à l'intégration des rétrovirus et lentivirus, d'autres techniques ont été développées. Elles peuvent être divisées en trois catégories qui seront décrites dans le sous chapitre « Techniques de reprogrammation ».

Les iPSC ainsi générées présentent toutes les caractéristiques des ESC (elles sont capables d'auto-renouvellement et de pluripotence) tout en s'affranchissant des limitations éthiques. En 2007, ce même groupe a reproduit ses résultats sur des cellules humaines (Takahashi et al, 2007). En 2012, Gurdon et Yamanaka ont reçu le prix Nobel de physiologie/médecine pour leurs recherches, ce qui soulignait l'importance de cette découverte en biologie et en médicine.

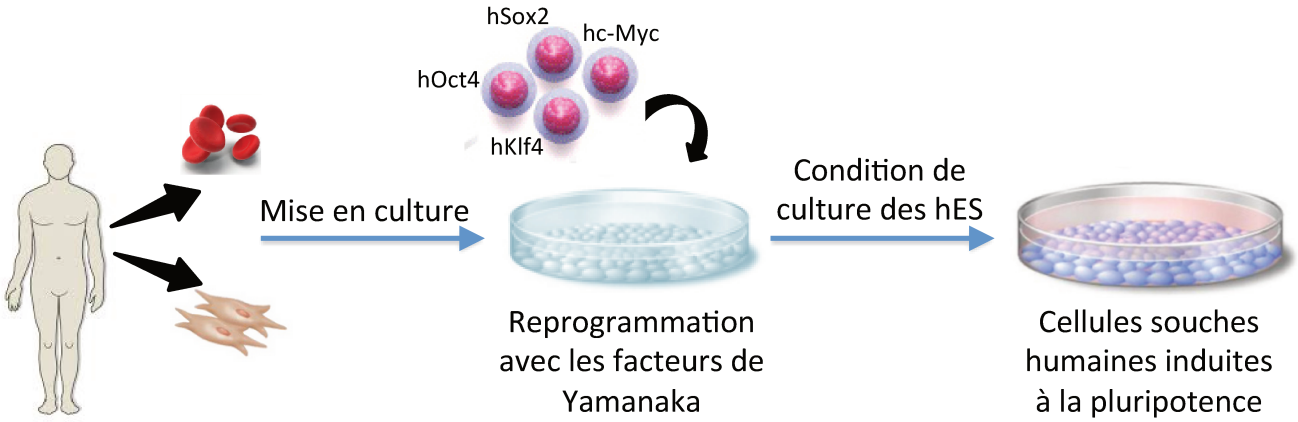


Figure 10 : Génération de cellules souches humaines induites à la pluripotence (hiPSC)

Des cellules sanguines adultes ou des fibroblastes adultes sont prélevés sur un donneur humain, puis les cellules sont mises en culture pour amplification avant d'être exposés à des vecteurs rétroviraux exprimant les 4 transgènes codant pour les facteurs humains OCT4, SOX2, KLF4 et c-MYC (Takahashi et al., 2007). Les cellules transduites sont ensuite cultivées dans les mêmes conditions que les cellules hES humaines et une trentaine de jours plus tard des colonies de cellules apparaissent, ce sont les cellules souches induites à la pluripotence.

2. Production des hiPSC

Pour identifier les régulateurs transcriptionnels capables de reprogrammer les cellules adultes en cellules pluripotentes, l'équipe du professeur Yamanaka a tout d'abord identifié un facteur de transcription, Fbx15 qui est fortement exprimé dans les cellules ES de souris indifférenciées (Tokuzawa et al., 2003), puis ont mis au point un criblage élégant regroupant 24 gènes candidats associés à la pluripotence. Ce criblage a permis de faire plusieurs combinaisons de gènes.

Ils ont constaté que lorsqu'ils sont co-exprimés dans les vecteurs rétroviraux utilisés pour transfecter des fibroblastes de souris, il y a une activation de Fbx15 qui est un des marqueur principal de l'état de pluripotence des ESC murines et, avec formation de colonies morphologiquement similaires aux cellules souches embryonnaires (Takahashi et Yamanaka 2006). Les étapes successives de criblage ont donc amené à l'identification de quatre gènes : Klf4, Sox2, c-Myc et Oct4 qui permettent l'activation de Fbx15. Les iPSC ainsi générées expriment les marqueurs de cellules souches pluripotentes tels que SSEA-1 et Nanog et produisent des tératomes (tumeurs qui se développes à partir des cellules souches embryonnaires) lorsqu'elles sont injectées par voie

sous-cutanée chez des souris immunodéprimées. Ces cellules présentent également la capacité de se différencier en différents tissus d'embryons (Takahashi et Yamanaka 2006).

Ces résultats prodigieux se heurtent cependant à différents obstacles, notamment au niveau de l'expression de plusieurs gènes de pluripotence qui sont inférieurs aux niveaux observés dans les ESC (Chin et al., 2009). Mais aussi une déméthylation incomplete des promoteurs des régulateurs de la pluripotence, comme Oct4 (Stadtfeld et al., 2010). De plus, ces iPSC ne parviennent pas à générer de chimères (organisme, animal en général, formé de deux (ou plus) populations de cellules génétiquement distinctes) comme le font les ESC (Takahashi et Yamanaka 2006). Tous ces inconvénients confirment que ces iPSC de « première génération » ne sont que partiellement reprogrammées.

Peu après cette étude, plusieurs laboratoires, y compris celui du Pr. Yamanaka (Okita et al., 2007), ont pu reproduire et améliorer ces résultats, générant ainsi des iPSC qui ressemblent plus étroitement aux ESC sur le plan moléculaire et fonctionnel (Maherali et al., 2007). Les années suivantes, des lignées rares d'iPSC ont été identifiées et sont même capables de générer des souris «all-iPSC» après injection dans des blastocystes tétraploïdes (Boland et al., 2009 ; Kang et al., 2009 ; Zhao et al., 2009 ; Stadtfeld et al., 2010), ce qui suggère qu'au moins certains clones iPSC ont une capacité développementale équivalente aux ESC. Les iPSC ont également été dérivées d'un certain nombre d'espèces différentes comme humains (Takahashi et al., 2007 ; Yu et al., 2007 ; Park et al., 2008), rats (Li et al., 2009) et macaques rhésus (Liu et al., 2008) - par l'expression des quatre facteurs dits « Yamanaka », démontrant que les caractéristiques fondamentales du réseau transcriptionnel qui régissent la pluripotence restent conservées durant l'évolution.

De même, les iPSC ont également pu être dérivées à partir de différentes populations de cellules somatiques ne se limitant plus aux fibroblastes dermiques, comme les kératinocytes (Aasen et al., 2008 ; Maherali et al., 2008), les cellules neurales (Eminli et al., 2008 ; JB Kim et al., 2008), les cellules épithéliales de l'estomac et les hépatocytes. (Aoi et al., 2008), les mélanocytes (Utikal et al., 2009), les cellules pancréatiques génétiquement marquées (Stadtfeld et al., 2008) mais également les cellules mononucléées du sang périphérique (Kim et al., 2016) soulignant davantage l'universalité de la pluripotence induite.

3. Techniques de reprogrammation

a) Reprogrammation non intégrative par utilisation d'un virus

Adénovirus

L'adénovirus est un excellent vecteur pour permettre la génération d'iPS parce qu'il s'agit d'un virus non-intégratif. Cependant son efficacité reste très limitée, ne correspondant qu'à 0,001 à 0,0001% chez la souris (Stadtfeld et al., 2008) et 0,0002% dans les cellules humaines (Zhou et al., 2009). Il reste donc de nombreuses améliorations à apporter à cette procédure pour augmenter considérablement l'efficacité de la reprogrammation.

Virus de Sendai

Ce virus présente deux avantages non négligeables pour permettre la reprogrammation. Tout d'abord, il s'agit d'un virus à ARN et donc ne pénètre pas dans le noyau des cellules infectées, le virus finira par disparaitre hors des cellules en environ 10 passages après infection. Ensuite, le virus permet la production d'une grande quantité de protéines permettant d'augmenter la probabilité de reprogrammation.

Le virus de Sendai a été utilisé pour reprogrammer des fibroblastes néonataux et adultes ainsi que les cellules sanguines (Fusaki et al., 2009, Seki et al., 2010 et Ban et al., 2011).

Les cellules sont reprogrammées en environ 25 jours avec une efficacité de 0,1% pour les cellules sanguines et de 1% pour les fibroblastes. Il existe des extraits viraux disponibles dans le commerce pour les facteurs dits de « Yamanaka » qui sont prêts à l'emploi. L'inconvénient de la reprogrammation basée sur Sendai est qu'il faut environ 10 passages pour que le virus soit éliminé des iPSC reprogrammés. De plus, les cellules doivent être cultivées à une température plus élevée (39 °C) pour permettre cette élimination.

b) Reprogrammation non virale

Plasmides épisomaux.

Le principal avantage de l'utilisation de plasmides épisomaux réside dans l'expression transitoire de facteurs de reprogrammation qui permettent la génération d'iPSC sans empreinte dans le génome. Cependant, la transfection avec un vecteur plasmidique standard ne permet pas l'expression des facteurs

pendant une durée suffisamment longue pour reprogrammer correctement les cellules. La solution serait de répéter quotidiennement les transfections, malheureusement l'efficacité resterait insuffisante (Okita et al., 2008).

Pour pallier le manque d'efficacité de ces plasmides standards, les chercheurs se sont tournés vers les plasmides OriP/EBNA-1 (Epstein-Barr Nuclear Antigen-1) (Yu et al., 2009) qui sont exprimés de manière stable pendant une plus longue période. Contrairement aux systèmes plasmidiques traditionnels, le système OriP/EBNA-1 se réplique en synchronisme avec le génome de l'hôte en s'ancrant dans la chromatine hôte et en se répliquant pendant les divisions du cycle cellulaire. Ils ont donc été utilisés pour la génération d'iPSC. Une seule transfection de trois plasmides oriP/EBNA contenant respectivement soit Oct4, Sox2, Nanog, Klf4 soit Oct4, Sox2, SV40 large T antigen et soit c-myc et Lin28 dans des fibroblastes de prépuce humain ont entraîné la reprogrammation de 0,0003-0,0006% de cellules environ 20 jours après la transfection (Yu et al., 2007). Une autre étude a révélé des niveaux de reprogrammation similaires dans des cellules du sang de cordon, bien que l'ajout de thiazovivine ait décuplé le processus (Hu et al., 2011).

La co-expression de l'ARNm d'EBNA-1 avec les vecteurs de reprogrammation et la reprogrammation dans des milieux définis (ex. : milieu E8 de ThermoFischer) dans des conditions hypoxiques ont significativement amélioré l'efficacité de reprogrammation des fibroblastes entre 0,006-0,1%. La reprogrammation épisomale semble être une stratégie efficace pour générer des iPSC sans empreinte.

D. Caractéristiques de cellules souches pluripotentes.

1. Maintien de la pluripotence

Le potentiel illimité d'auto-renouvellement et la pluripotence des cellules souches pluripotentes humaines (CSPh) sont conférés par une régulation transcriptionnelle et cellulaire unique (Jaenisch & Young 2008) (Fig. 1). Le facteur de transcription du domaine POU Oct4 est critique pour la pluripotence de la masse cellulaire interne in vivo et des cellules ES en culture (Nichols et al., 1998, Niwa et al., 2000). Le facteur de transcription Sox2 est également requis pour toutes les espèces dans le maintien de la pluripotence chez l'embryon et dans les cellules ES en culture (Avilion et al 2003, Masui et al., 2007). Sox2 coopère avec Oct4 pour activer l'expression d'un certain nombre de gènes régulant la pluripotence, y compris Oct4 et Nanog (Masui et al., 2007 et leurs références). La protéine homéodomaine Nanog est également requise pour le maintien de la pluripotence dans la masse cellulaire interne in vivo (Mitsui et al., 2003).

En effet, il y a tout un ensemble de facteurs de transcription principaux qui sont essentiels pour le maintien des CSPh. Boyer et ses collègues ont cartographié la liaison génomique d'OCT4, SOX2 et NANOG (collectivement OSN) par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) couplée à des puces à ADN (ChIP on Chip) et fait trois observations majeures: (1) OSN occupe les promoteurs d'une grande population de gènes ; (2) environ la moitié des gènes liés par OSN sont transcrits dans les hESC et (3) l'OSN collabore à un circuit de régulation impliquant de longues boucles autorégulatrices (Boyer et al., 2005). Les sites de liaisons entre OCT4 et NANOG sont mal conservés entre les hESC humaines et de souris (Loh et al., 2006). Cependant, ceci est partiellement expliqué par l'évolution de nouveaux sites de liaison de facteurs de transcription par des éléments transposables spécifiques à l'espèce (Kunarso et al., 2010). Ivanova et ses collègues ont effectué des études sur la perte et le gain de fonction de plusieurs lignées de hESC indépendantes et ont rapporté que l'OSN joue des rôles distincts dans la régulation négative de l'engagement vers un lignage cellulaire (Wang et al., 2012). Spécifiquement, OCT4 interagit avec la voie BMP4 pour spécifier quatre destins cellulaires distincts d'une manière dose dépendante. Des niveaux élevés d'OCT4 induisent le mésendoderme en présence de BMP4, mais maintiennent l'auto-renouvellement des hESC en l'absence de BMP4. En revanche, de faibles taux d'OCT4 induisent des gènes

extra-embryonnaires en présence de BMP4, mais stimulent les gènes neuroectodermiques en l'absence de BMP4. En outre, NANOG réprime la différenciation des neuroectodermes, alors que SOX2 réprime la différenciation des mésendoderme (Wang et al., 2012). D'autres facteurs de transcription qui coopèrent avec les facteurs de transcription de base dans le maintien de l'état pluripotent humain ont également été identifiés : plusieurs facteurs de transcription de Forkhead box (FOX) sont également impliqués dans le contrôle de la pluripotence humaine. FOXO1 se lie et régule les promoteurs d'OCT4 et de SOX2 (Zhang et al., 2011). En outre, un niveau spécifique de FOXD3 est requis pour l'auto-renouvellement des hESC: la surexpression de FOXD3 induit une différenciation en mésoderme paraxial (à l'origine des somites), alors que la diminution de FOXD3 génère des dérivés mésodermiques et endodermiques (Arduini et Brivanlou, 2012).

Les exigences de signalisation des hESC ont été défini depuis leur dérivation initiale sur des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) dans des milieux contenant du sérum (Thomson et al., 1998). Deux facteurs de croissance ont été identifiés et peuvent remplacer le besoin de MEF ou de milieu conditionné par MEF: la combinaison de facteurs de croissance TGFβ/Activin/Nodal dont la signalisation collabore au maintien de la puripotence à travers les effecteurs en aval SMAD2/3 (James et al., 2005) et le facteur de croissance des fibroblastes (FGF2) (Xu et al., 2005). L'apport exogène des protéines recombinantes activine et FGF2 permet de maintenir la pluripotence des hESC en l'absence à la fois de MEF et de sérum (Vallier et al., 2005).
La signalisation FGF/ERK induit l'expression de NANOG dans les hESC, mais le mécanisme sous-jacent reste flou (Greber et al., 2010, Yu et al., 2011). D'autre part, la liaison directe de SMAD2/3 au promoteur NANOG suggère que la voie TGFβ/Activin/Nodal régule directement l'expression de ce facteur de transcription central (Vallier et al., 2009; Xu et al., 2008; Greber et al. al., 2008).

L'expression de la protéine NANOG est diminuée chez les blastocystes humains traités avec un inhibiteur du TGFβ, mais ceci n'est pas observé chez les blastocystes de souris traités (Blakeley et al., 2015). Ainsi, la régulation induite par TGFβ de NANOG semble commune aux cellules pluripotentes humaines *in vitro* et *in vivo*. L'inhibition de la signalisation TGFβ/Activin/Nodal dans les hESC supprime rapidement l'expression de NANOG et induit une différenciation neuronale (Chambers et al., 2009). Ceci est cohérent avec le rôle susmentionné

de NANOG dans la répression des gènes associés au neuroectoderme.
La signalisation Wnt a également été impliquée dans la régulation des hESC, bien que son rôle ait été plus difficile à définir en raison de ses effets dose-dépendants. Il a été initialement rapporté que l'auto-renouvellement des hESC peut être maintenu en fournissant du Wnt3a recombinant ou en inhibant la glycogène synthase kinase 3 (GSK3), l'enzyme qui cible la β-caténine pour la dégradation (Sato et al., 2004). Cependant, Moon et ses collègues ont montré que le traitement à long terme des hESC par Wnt3a compromet leur auto-renouvellement (Davidson et al., 2012). Un phénotype similaire a été observé en augmentant la concentration de l'inhibiteur de GSK3, ce qui entraîne une induction plus robuste de l'activité transcriptionnelle de la β-caténine. Des niveaux variables d'activité de la voie Wnt endogène ont été liés à la tendance à la différenciation hétérogène des hESC: alors que les cellules Wnthigh forment principalement des mésendodermes, les cellules Wntlow vont former le neuroectoderme (Blauwkamp et al., 2012). Le modèle de Singh et al. insiste sur le rôle de la signalisation PI3K/AKT en tant que nœud central qui va permettre l'auto-renouvellement via la signalisation Activin A / SMAD2/3. Alors qu'en l'absence de la signalisation PI3K/AKT, le complexe SMAD2/3 va collaborer avec les effecteurs de la voie Wnt pour promouvoir la voie Wnt. L'activation de PI3K/AKT par des facteurs de croissance tels que FGF2, IGF1 ou héréguline (neuréguline 1) maintient les niveaux de SMAD2/3 phosphorylés dans une plage étroite qui permet l'activation des gènes de pluripotence, y compris NANOG. Inversement, l'arrêt de la stimulation de PI3K/AKT conduit à une activité SMAD2/3 élevée et à l'induction de gènes de mésendoderme. Selon ce modèle, PI3K/AKT inhibe également la signalisation MEK/ERK, qui à son tour bloque la stimulation des gènes du développement par la β-caténine (Singh et al., 2012) (Fig. 11).

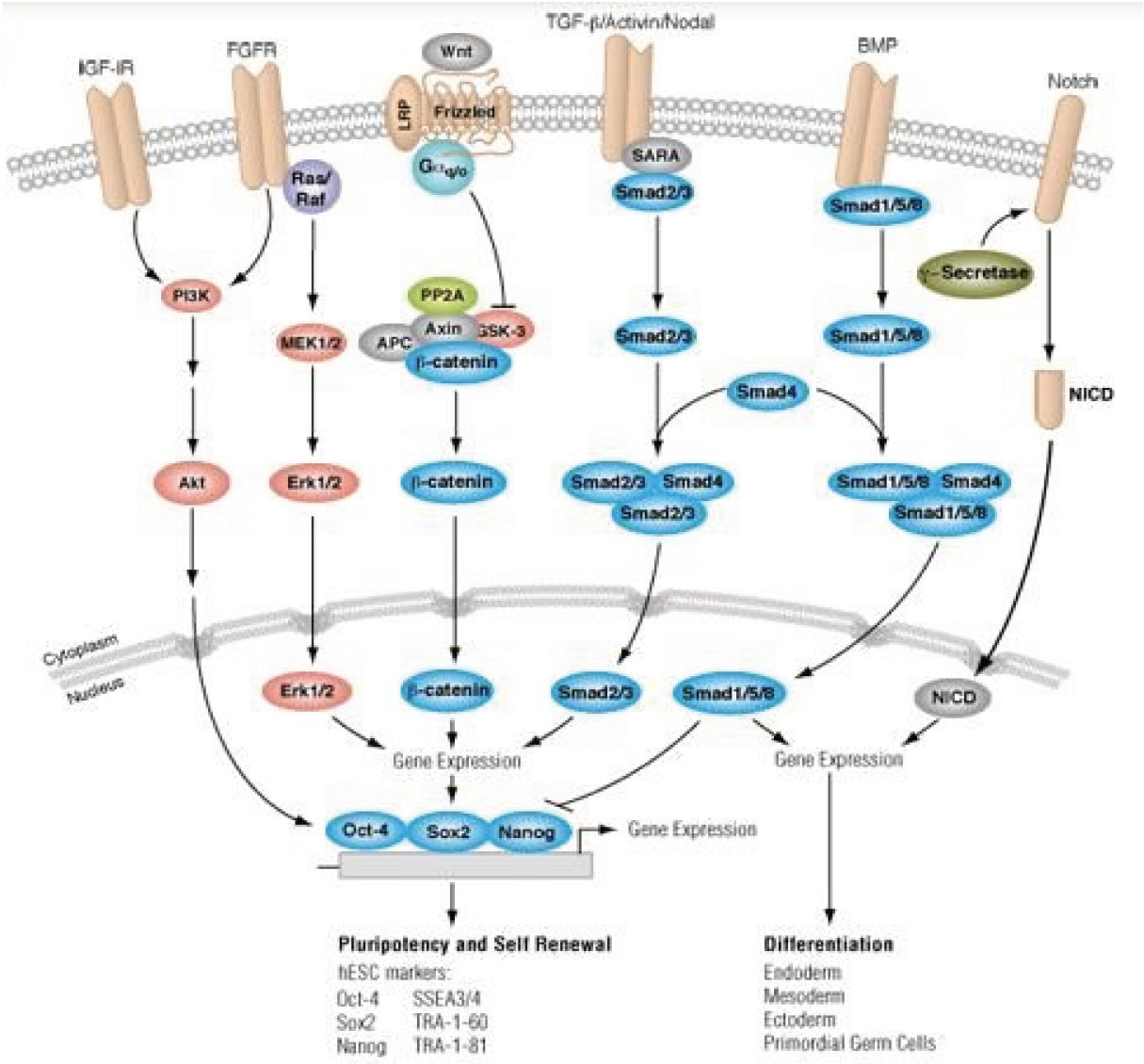


Figure 11 : Mécanisme du maintien de la pluripotence et de la différenciation des hCSP

2. Caractérisation des cellules souches pluripotentes

La première étape permettant la caractérisation des cellules souches pluripotentes est l'analyse morphologique. Les CSPh sont de petites cellules rondes de 2-3 µm de diamètre sans prolongement cytoplasmique. Elles se développent en colonies circulaires très compactes avec un rapport nucléaire à cytoplasmique beaucoup plus élevé que la plupart des cellules somatiques.

Comme expliqué dans le chapitre « maintien de la pluripotence », le maintien de la pluripotence se caractérise par l'expression de facteurs de transcription

essentiels tel que NANOG, OCT4, SOX2.

Ce sont donc des bons indicateurs de l'état de pluripotence des CSPh. En plus du contrôle des niveaux d'expression de ces facteurs, la confirmation de l'état pluripotent des cellules analysées s'effectue par la présence d'antigènes de surface parmi lesquels on retrouve SSEA3 (Stage Specific Embryonic Antigen 3), SSEA4 (Stage Specific Embryonic Antigen 4), Tra-1-60 (Tumor rejection antigen 1-60) et Tra-1-81 (Tumor rejection antigen 1-81) (Thomson et al. 1998). Pour valider l'état pluripotent des CSPh, les cellules doivent démontrer leur capacité à se différencier en cellules des trois feuillets embryonnaires. Pour ce faire, les cellules sont mises en culture pour permettre la formation spontanée de corps embryoïdes qui seront par la suite analysés par RT-qPCR pour vérifier l'expression des marqueurs caractéristiques des trois feuillets. Parallèlement, la pluripotence des cellules peut être vérifiée *in vivo*, en observant si après injection des cellules (environ $1x10^6$ cellules) à des animaux immunocompromis, il y a formation d'un tératome (tumeur composée de types cellulaires issus des trois feuillets embryonnaires). (Thomson et al. 1998, Prokhorova et al., 2009, Itskovitz-Eldor et al. 2000).

Le grand intérêt des CSPh est leur capacité d'auto-renouvellement. Malheureusement, à mesure des divisions, il peut y avoir apparition d'anomalies génomiques à l'échelle de quelques mégabases comme à celle d'un chromosome entier. Il est donc primordial d'inclure une analyse systématique des altérations génomiques détectables dans les CSPh après culture à long terme (Draper et al., 2004 ; Cowan et al., 2004 ; Baker et al., 2007). D'ailleurs, ces analyses ont permis de révéler que certaines altérations étaient récurrentes, comme la trisomie 12 (Draper et al., 2004). C'est également le cas pour la duplication de la région 20q11.21, détectable par microarray CGH (caryotype moléculaire) ou par puces à SNP (single nucleotide polymorphism) (Lefort et al., 2008). Toutes ces anomalies sont communes aux CSPh, mais il est vrai que certaines semblent être associées plus spécifiquement soit aux hESC, soit aux hiPSC. C'est le cas par exemple pour la trisomie 17 que l'on peut retrouver dans les hESC et beaucoup moins dans les hiPSC (Brimble et al., 2004; Draper et al., 2004; Hoffman and Carpenter, 2005; Lefort et al., 2008; Mayshar et al., 2010; Taapken et al., 2011). On peut imputer toutes ces instabilités génomiques à différentes étapes de la vie des CSPh. Tout d'abord, la reprogrammation (pour les hiPSC) ou à la dérivation en elle-même (pour les hESC) peuvent être source de défauts génomiques. Les étapes de

congélation/décongélation sont également source de stress pour les cellules et donc potentiellement dangereuses pour l'intégrité du génome.

Bien sûr, les techniques de culture et de passage de cellules peuvent être incriminées. Cependant, ce n'est pas parce que les CSPh ont validé tout le contrôle qualité qu'une anomalie chromosomique ne peut plus se produire. En effet, elles peuvent très bien apparaître dans les progéniteurs intermédiaires au cours de leur amplification (Varela et al., 2012). Il est donc essentiel de vérifier l'intégrité chromosomique des cellules tout au long des étapes de différenciation (Fig. 12).

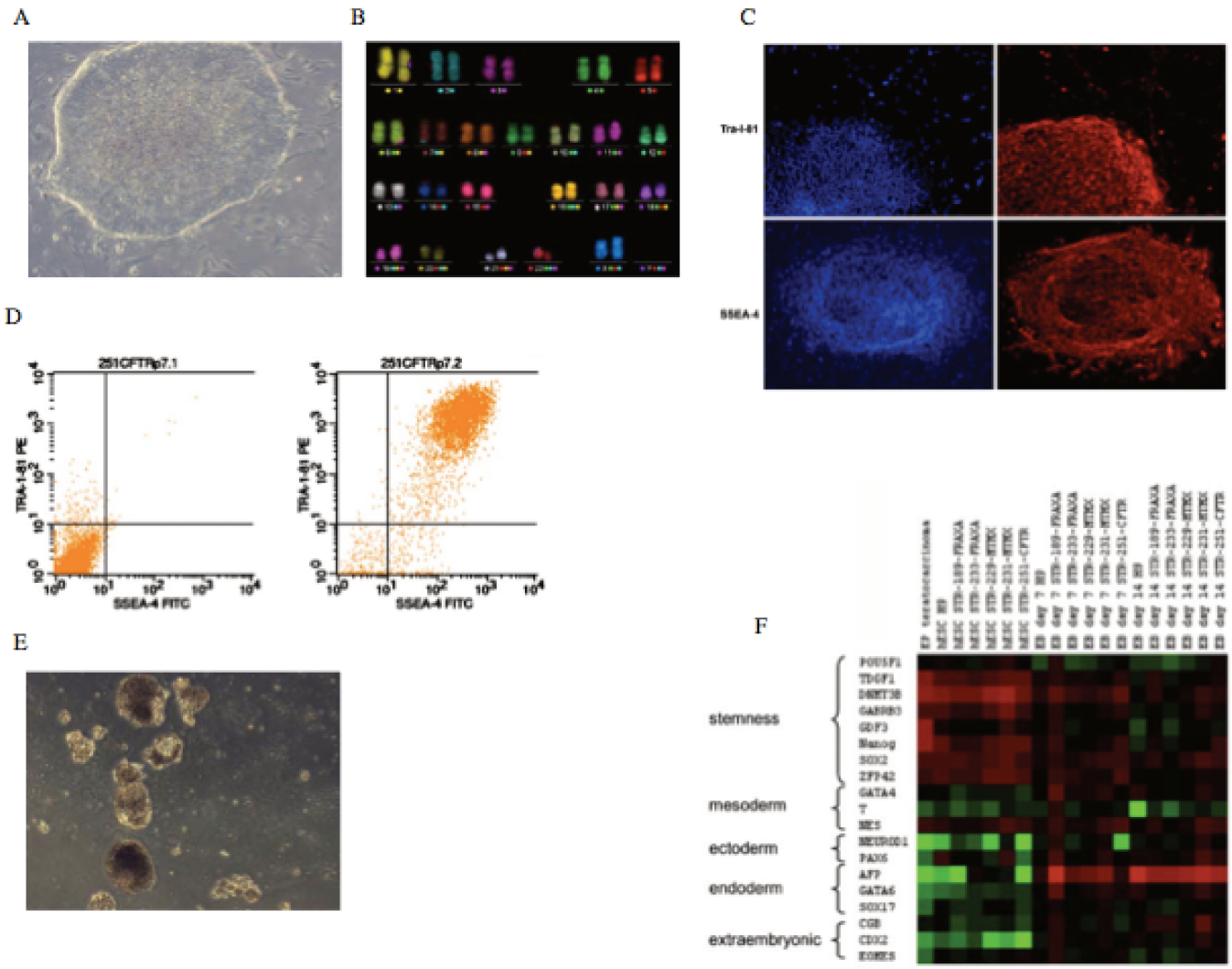


Figure 12 : Contrôle qualité des cellules souches pluripotentes

(A) Caractérisation morphologique d'une colonie de CSP (B) Analyse caryotypique (C) Immunomarquages de marqueurs spécifiques de la pluripotence (SSEA4/TRA-1-81) (D) Cytométrie en flux représentant le pourcentage de cellules doublement marqués SSEA4/TRA-1-81 (E) Formation de corps embryoides sur 10 jours. Adapté de (Tropel et al., 2010).

E. Modélisation pathologique à partir des cellules souches pluripotentes

En plus des études sur le développement embryonnaire, les CSPh offrent également la possibilité d'étudier la pathogénèse des maladies humaines. Certains type cellulaires ne sont pas facilement accessibles chez les patients et par conséquent les modèles animaux, et en particulier les modèles de souris, ont été largement utilisés pour comprendre la pathogenèse des maladies humaines.

En 2007, l'équipe de Roth et al., a mis au point un système *in vitro* de différenciation des cellules souches embryonnaires de souris (mESC) de type sauvage NF1 (+/+), hétérozygote (+/-) ou nul (-/-) en cellules de type Schwann pour étudier le rôle de la NF1 dans le développement des cellules de Schwann et la formation de neurofibromes (Zhu et al., 2002). Ces cellules de Schwann différenciées à partir des cellules mES, indépendamment de leur statut NF1, expriment des marqueurs de cellules de Schwann en corrélation avec leur stade de maturation. Ces cellules supportent et dirigent préférentiellement la croissance des neurites des neurones primaires. L'équipe à de plus constaté que les cellules de type crête neurales nulles et hétérozygotes prolifèrent à un rythme accéléré par rapport au type NF1 sauvage; cette prolifération anormale peut être rétabli à des niveaux de type sauvage en utilisant un inhibiteur de la MAP kinase kinase (Mek). Ce nouveau modèle fournit un paradigme idéal pour étudier le rôle de la NF1 dans des cellules présentant différents niveaux de neurofibromine et qui sont à l'origine des neurofibromes.

Cependant, les modèles de souris ne récapitulent pas toujours les phénotypes manifestés chez les humains. Les CSPh portant des modifications génétiques associées à une maladie peuvent permettre de surmonter ces obstacles en fournissant des réserves illimitées de tout type de cellules humaines pathologiques pour les études sur des pathologies particulières (van Dartel et al., 2010).

Comme expliqué précédemment, les CSPh pathologiques peuvent être générées en utilisant plusieurs approches. Des embryons humains présentant des défauts génétiques identifiés par le diagnostic génétique préimplantatoire peuvent être utilisés pour créer des hESC pour l'étude de maladies provoquées par des anomalies chromosomiques et des mutations connues associées à la maladie (Maury et al., 2012).

En plus d'offrir aux biologistes du développement un accès au développement embryonnaire humain, de telles études pourraient permettre de mieux comprendre les avortements spontanés au début de la grossesse, dont les causes sous-jacentes demeurent mal comprises (Macklon et al., 2002).

Cependant, les embryons issus de DPI ne sont disponibles que pour un nombre limité de maladies humaines. Il est maintenant possible de générer des hiPSC chez des personnes atteintes d'un large éventail de maladies, y compris des maladies monogéniques telles que l'amyotrophie spinale (AMS) ou des maladies d'étiologies complexes comme la maladie de Parkinson (Wu et Hochedlinger, 2011). Le développement de ces modèles de maladies basés sur les iPSC peut permettre aux chercheurs d'étudier les rôles d'un gène spécifique dans les mécanismes développementaux. Dans la première étude de preuve de concept, les hiPSC dérivées d'un individu avec une AMS ont été différenciées en motoneurones avec une efficacité similaire aux hiPSC de la mère non affectée de l'individu (Ebert et al., 2009). Cependant, des cultures prolongées ont révélé une réduction significative du nombre de motoneurones, phénomène compatible avec le phénotype de la maladie, une perte sélective de motoneurones (Ebert et al., 2009). Bien que cette étude prenne en compte l'énorme potentiel qu'offre l'utilisation des hiPSC pour modéliser un état pathologique spécifique associé à une maladie héréditaire, les variations entre les lignées de cellules hiPSC peuvent affecter leur utilisation lors de la modélisation de la maladie. Bien qu'il soit possible de contrôler les conditions de dérivation/culture, et les types de cellules utilisées pour générer des hiPSC, il est impossible d'éliminer complètement les variations génétiques dans les lignées hiPSC générées à partir de deux individus différents. Pour contourner ce problème, il faut générer des lignées isogéniques de hiPSC qui ne diffèrent que par la (les) modification(s) génétique(s) causant la maladie. Des lignées de hESC ont été générées pour créer la mutation HPRT pour la modélisation du syndrome de Lesch-Nyhan (Urbach et al., 2004, Zwaka et Thomson, 2003). Contrairement au modèle murin, les cellules humaines mutantes présentent une accumulation significative d'acide urique, ce qui confirme la possibilité d'utiliser des hPSC génétiquement modifiées pour la modélisation de la maladie.

Depuis quelques années, la technologie de CRISPR/Cas 9 s'est révélée comme une puissante technique de manipulation des gènes. En effet, CRISPR/Cas 9 permet de produire un large éventail de mutations: des mutations ponctuelles aux grands réarrangements chromosomiques tels que les délétions, les

duplications et les inversions. Dans le cas des modèles animaux, il est difficile de reproduire ce qui se passe au niveau humain en raison des différences entre les espèces. Les CSPh peuvent surmonter cette limitation à l'aide de CRISPR/Cas 9 qui va permettre d'introduire rapidement et facilement une mutation génétique pour modéliser une maladie humaine (Tableau 4) (Zhang et al., 2017).

Dans le cadre de cette thèse, je me suis intéressée à la modélisation de la NF1. Des travaux ont été précédemment réalisés dans l'équipe du Pr Baldeschi pour modéliser un symptôme particulier de la pathologie : les taches café-au-lait. L'étude a permis de comprendre les mécanismes d'actions impliqués dans les anomalies de pigmentation caractéristiques de la pathologie (Allouche et al., 2015) et ce, grâce aux cellules souches embryonnaires. Dans cette étude, le phénotype d'hyperpigmentation a été modélisé à partir de cellules souches embryonnaires (porteuses d'une mutation *NF1*) différenciées en mélanocytes. Ils ont ainsi pu faire le lien entre la perte d'hétérozygotie des cellules et les taches café-au-lait. Ils ont également pu étudier les mécanismes moléculaires associés au phénotype d'hyperpigmentation (activité accrue des voies de signalisation PKA et ERK1/2 médiées par l'AMPc, entraînant une surexpression du facteur de transcription MITF et des enzymes mélanogènes tyrosinase et dopachrome tautomerase, tous acteurs majeurs de la mélanogénèse).

Dans le cadre de mon projet, je me suis intéressée à deux autres symptômes présents dans la maladie : les lésions osseuses et les neurofibromes. En m'inspirant des travaux précédemment établis, j'ai tenté de comprendre les mécanismes d'actions impliqués en modélisant les cellules d'intérêts à partir de hESC, de hiPSC et du développement de cellules isogéniques par la technologie de CRISPR/Cas 9.

III. Le tissu osseux

Comme décrit dans le chapitre I, les lésions osseuses sont fréquemment retrouvées chez les patients atteints de Neurofibromatose de type 1

A. Généralités

L'os est un tissu conjonctif vasculaire minéralisé complexe et dynamique avec diverses fonctions mécaniques et métaboliques. Il permet la locomotion, le soutien ainsi que la protection des tissus mous comme le crâne qui protège le cerveau, les côtes qui protègent les poumons et le cœur. Le tissu osseux sert également de site d'attache pour les muscles et les tendons.

En plus de ces caractéristiques mécaniques, il permet le stockage du calcium et du phosphate permettant la bonne minéralisation de l'os. Le tissu osseux se trouve être le siège de la moelle osseuse et abrite un vaste réseau de vaisseaux sanguins (Marks et al., 2002). Outre le stockage du calcium, important pour le corps, la matrice extracellulaire (MEC) osseuse est également un riche réservoir de cytokines et de facteurs de croissance impliqués dans la signalisation autocrine, paracrine et endocrine (Schwetz et al., 2012).

Le tissu osseux est principalement composé de quatre types cellulaires : les ostéoblastes, les cellules bordantes de l'os (qui se trouvent à la surface des plages de tissu osseux), les ostéocytes et les ostéoclastes (Fig. 13).

Les ostéoclastes, en s'attachant à la surface osseuse pour isoler la zone à dégrader, sont responsable de la résorption osseuse. Ils vont entrainer la dissolution de la partie inorganique de la matrice extracellulaire par acidification de la zone ciblée alors que la partie organique sera dégradée par différentes protéases (enzymes lysosomiales telles que la cathepsine K et les métalloprotéinases matricielles libérées par exocytose) (Ross et al., 2006)

A l'inverse, ce sont les ostéoblastes qui sont responsables de la formation osseuse. Ces cellules, d'origine mésenchymateuse, vont permettre la synthèse de la matrice organique, appelée « ostéoide », et contribuer à sa minéralisation.

Une fois le tissu osseux généré, les ostéoblastes vont soit entrer en apoptose, soit rester piégés dans la matrice extracellulaire minéralisée sous forme

d'ostéoblaste mature aussi appelés ostéocytes ou recouvrir la surface de l'os sous forme de cellules bordantes de l'os (Franz-Odendaal et al., 2006).

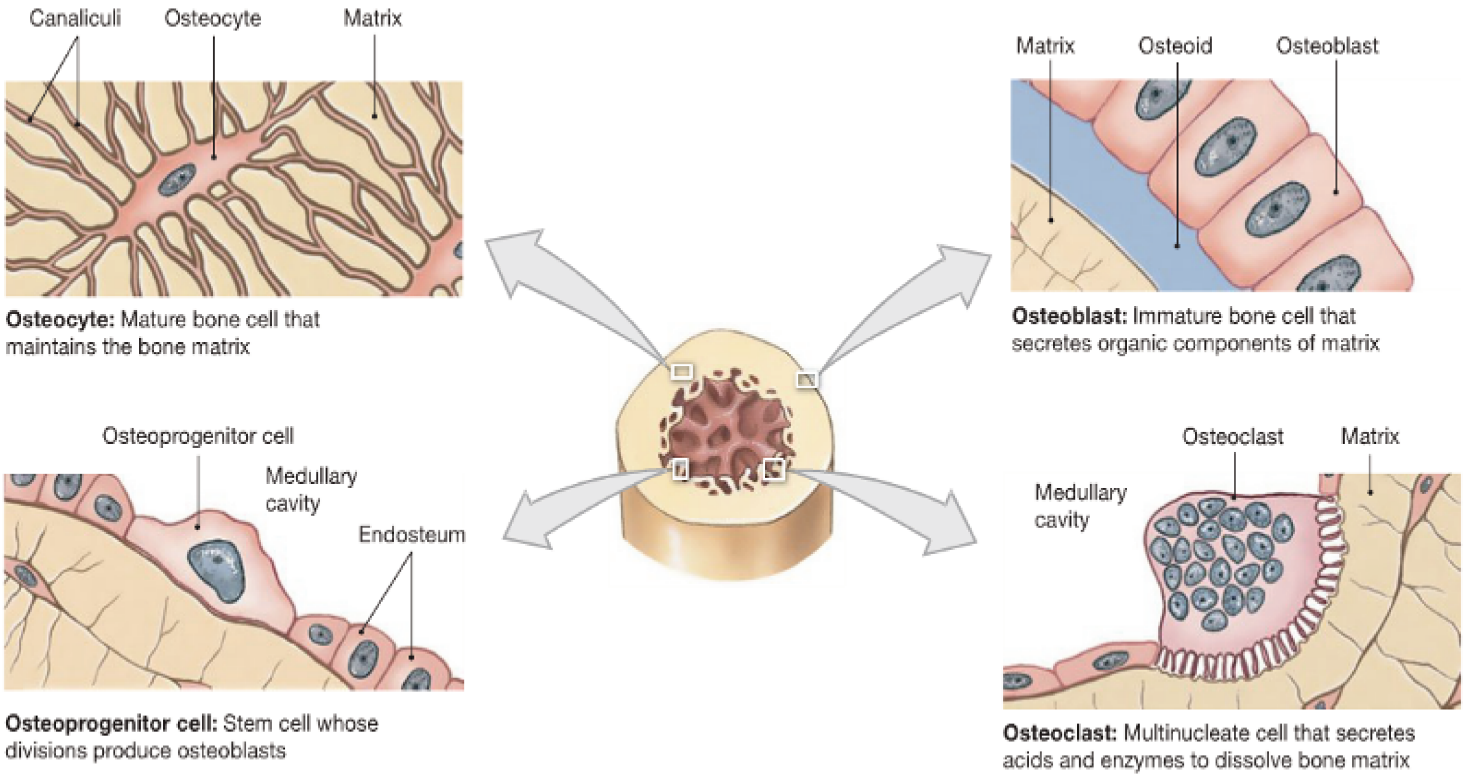


Figure 13 : Composition du tissus osseux

Il est constitué de quatre types cellulaires : les cellules progéniteurs des ostéoblastes qui par maturation vont devenir des ostéoblastes. Les ostéoblastes sont des cellules sécrétrices de MEC elles vont permettre la formation de l'ostéoïde et vont contribuer à sa minéralisation. Une fois totalement matures, certains ostéoblastes vont rester piégés dans l'ostéoïde sous forme d'ostéocytes. Les ostéoclastes sont les cellules responsables de la résorption osseuses (Copyright © 2009 Pearson Education, Inc., publishing as Pearson Benjamin Cummings).

B. Origine embryonnaire des ostéoblastes

Les ostéoblastes peuvent provenir de deux populations embryonnaires distinctes. Une grande partie des os qui constituent le crâne, le visage et la clavicule ont pour origine la crête neurale ectodermique. A l'inverse, les os qui composent le reste du squelette sont eux d'origine mésodermique.

Par ailleurs leurs origines embryonnaires vont définir le mode de formation du tissu osseux. En effet, dans le cas des os provenant de la crête neurale ectodermique le processus est appelé ossification intramembraneuse (caractérisée par l'absence de matière cartilagineuse. Ce processus n'est rencontré que pour les os de la voûte, du crâne, ou de la face. Tous les os ainsi produit sont plats) (Nishimura et al., 2012). La partie restante du squelette est construite par ossification endochondrale. L'ossification endochondrale implique la formation de tissu cartilagineux à partir de cellules mésenchymateuses agrégées et le remplacement subséquent du tissu cartilagineux par l'os (Horton 1990). Le processus d'ossification endochondrale peut être divisé en cinq étapes (Figure 14). Premièrement, les cellules mésenchymateuses sont engagées pour devenir des cellules cartilagineuses. Cet engagement est influencé par des facteurs paracrines qui induisent les cellules mésodermiques proches à exprimer deux facteurs de transcription, Pax1 et Scleraxis. On pense que ces facteurs de transcription activent des gènes spécifiques du cartilage (Cserjesi et al., 1995 ; Sosic et al., 1997). Pendant la deuxième phase de l'ossification endochondrale, les cellules mésenchymateuses engagées se condensent en nodules compacts et se différencient en chondrocytes (les cellules cartilagineuses). La N-cadhérine semble jouer un rôle important dans l'initiation de ces condensations, et la N-CAM semble être essentielle pour les maintenir (Oberlender et Tuan, 1994 ; Hall et Miyake, 1995). Chez l'homme, le gène SOX9, qui code pour une protéine liant l'ADN, s'exprime dans les condensations précartilagineuses. Les mutations du gène SOX9 provoquent une dysplasie camptomélique, une maladie rare du développement du squelette dans le corps. Principalement affecté par le cartilage (Wright et al., 1995).

Au cours de la troisième phase d'ossification endochondrale, les chondrocytes prolifèrent rapidement pour former le moule de l'os. En se divisant, les chondrocytes sécrètent une matrice extracellulaire spécifique du cartilage. Dans la quatrième phase, les chondrocytes cessent de se diviser et augmentent considérablement leur volume, devenant des chondrocytes hypertrophiques. Ces grands chondrocytes modifient la matrice qu'ils produisent (en ajoutant du collagène X et encore plus de fibronectine) pour lui permettre de se minéraliser par le carbonate de calcium.

La cinquième phase implique l'invasion du moule cartilagineux par les vaisseaux sanguins. Les chondrocytes hypertrophiques meurent par apoptose.

Cet espace deviendra la moelle osseuse. À mesure que les cellules cartilagineuses meurent, un groupe de cellules entourant le moule cartilagineux se différencie en ostéoblastes. Les ostoblastes commencent à former une matrice osseuse sur le cartilage partiellement dégradé (Bruder et Caplan 1989 ; Hatori et al., 1995). Finalement, tout le cartilage est remplacé par de l'os. Ainsi, le tissu cartilagineux sert de modèle pour l'os qui suit. Les composants squelettiques de la colonne vertébrale, du bassin et des membres sont d'abord formés de cartilage et deviennent ensuite des os.

Dans les deux types d'ostéogenèse, le type cellulaire précédant les ostéoblastes est un pré-ostéoblaste.

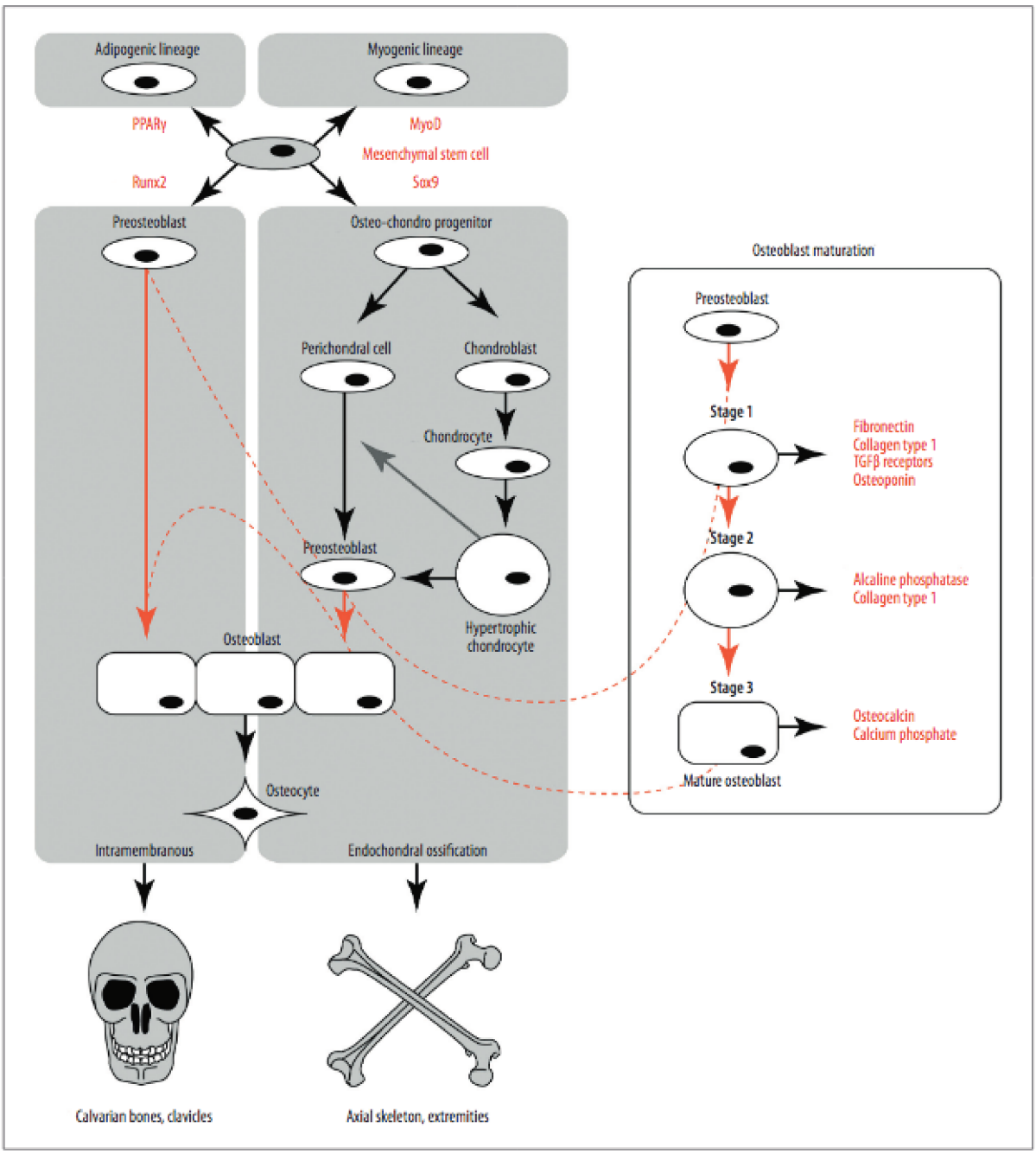


Figure 14 : Biogenèse des ostéoblastes.

Les cellules souches mésenchymateuses peuvent donner naissance à 4 lignées (en haut à gauche) en exprimant les régulateurs de transcription correspondants: PPARg pour les adipocytes, MyoD pour le lignage myogénique, Runx2 pour les ostéoblastes et Sox9 pour les lignées chondrocytaires. Dans l'ossification intramembraneuse (ostéogenèse du dos et les os claviculaires), les préosteoblastes proviennent directement des cellules souches mésenchymateuses, tandis que dans l'ossification endochondrale (ostéogenèse du squelette axial et des membres), un progéniteur ostéo-chondro commun donne naissance aux deux types cellulaires. Les chondrocytes hypertrophiques régulent d'une manière paracrine (flèche grise) la transformation des cellules périchondrales en pré-ostéoblastes, ou pourraient se transformer en un pré-ostéoblaste. Le processus de maturation des pré-ostéoblastes est illustré dans l'agrandissement à droite.

C. Différenciation ostéoblastique

Les ostéoblastes sont des cellules cuboïdes situées le long de la surface osseuse possédant une polarisation qui va permettre la sécrétion de l'ostéoïde vers la matrice osseuse (Damoulis et al., 1997).
Les cellules de la lignée ostéoblastique proviennent de cellules souches mésenchymateuses multipotentes (MSC). Les MSC sont des cellules stromales qui sont multipotentes (Jackson et al., 2012). En effet, ces cellules non hématopoïétiques ont la plasticité de s'engager dans différentes lignées cellulaires pour donner naissance à des ostéoblastes mais aussi à des chondrocytes, des adipocytes, des fibroblastes, des myocytes et des neurones (Aubin et al., 2002).

L'engagement des MSC vers la lignée ostéoprogénitrice nécessite l'expression de différents gènes spécifiques à des temps donnés. Et notamment la synthèse de protéines morphogénétiques osseuses (BMP) ainsi que des protéines des voies Wingless (Wnt). La différenciation ostéoblastique nécessite également l'expression de facteur de transcription indispensable tels que Runt2, Distal-less homeobox 5 (Dlx5) et osterix (Osx) (Fig. 15).

Il a été démontré que le gène clé de la différenciation est Runx2. En effet, lorsque le gène n'est plus exprimé chez la souris, les ostéoblastes ne sont plus générés (Ducy et al., 1997 et Komori et al., 1997).

Lorsque Runx2 est exprimé, il permet une augmentation de l'expression de gènes essentiels à la différenciation tels que le collagène de type 1 (ColIA1), la phosphatase alcaline (ALP), la sialoproteine osseuse (BSP) et l'osteocalcine (OCN) (Fakhry et al., 2013)(Fig. 15).

Une fois qu'un pool de progéniteurs d'ostéoblastes exprimant Runx2 et ColIA1 a été établi au cours de la différenciation des ostéoblastes, il y a une phase de prolifération. Dans cette phase proliférative, les progéniteurs des ostéoblastes montrent une activité phosphatase alcaline (ALP) et sont considérés comme des pré-ostéoblastes.

La transition des pré-ostéoblastes en ostéoblastes matures est caractérisée par une augmentation de l'expression d'Osx et de la sécrétion des protéines de la matrice osseuse telles que l'ostéocalcine, la sialoprotéine osseuse et le

collagène de type I.

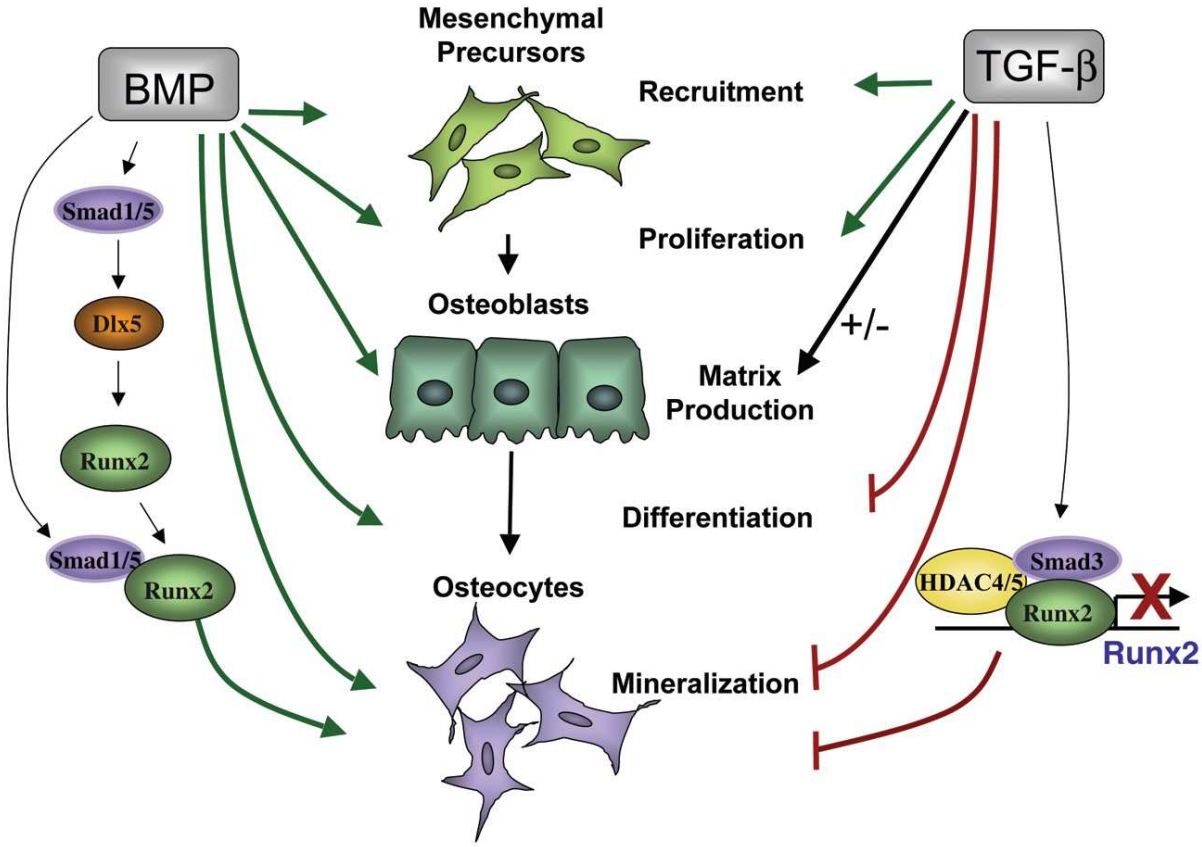


Figure 15 : Contrôle de la différenciation ostéoblastique par TGF- β et les BMP

Le TGF-β stimule le recrutement et la prolifération des cellules mésenchymateuses au cours de l'ostéogenèse, mais inhibe la différenciation terminale des ostéoblastes. Le TGF-β active Smad3 pour lier et réprimer la fonction de Runx2. Le complexe Smad3-Runx2 recrute des histones déacétylases de classe II (HDAC4/5) à des gènes cibles de Runx2, y compris Runx2 lui-même. BMP stimule la prolifération des cellules mésenchymateuses précurseurs et l'engagement à la lignée des ostéoblastes. La BMP induit l'expression de Dlx5, qui induit ensuite la transcription de Runx2 pour favoriser la progression de la différenciation des ostéoblastes. En réponse à BMP, Smad1 et Smad5 lient Runx2 pour améliorer son activité transcriptionnelle. (Derynck et al., 2007)

À ce stade, la MEC produite par les ostéoblastes est mature et la minéralisation est bientôt initiée dans des vésicules spécialisées selon un mécanisme complexe et loin d'être encore bien compris.
La synthèse de la matrice osseuse par les ostéoblastes se déroule en deux étapes principales: le dépôt de la matrice organique et sa minéralisation subséquente.
Dans la première étape, les ostéoblastes sécrètent des protéines de collagène, principalement du collagène de type I, des protéines non collagènes (OCN, ostéonectine, BSP et ostéopontine), et des protéoglycanes comprenant de la décorine et du biglycane, qui forment la matrice organique.

Ensuite l'étape de minéralisation se déroule en deux phases : une vésiculaire et une fibrillaire. Au cours de la phase vésiculaire, des cristaux d'hydroxyapatite se forment dans des vésicules extracellulaires fortement enrichies en activité ALP appelées vésicules matricielles (VM) (Anderson et al., 2005). Ces VM sont libérées du domaine membranaire apical des ostéoblastes dans la matrice osseuse nouvellement formée dans laquelle elles se lient aux protéoglycanes et autres composants organiques. En raison de leurs charges négatives, les protéoglycanes sulfatés immobilisent les ions calcium qui sont stockés dans les vésicules matricielles (Yoshiko et al., 2002 ; Arana-Chavez et al., 1995).

Lorsque les ostéoblastes sécrètent des enzymes qui dégradent les protéoglycanes, les ions calcium sont alors libérés des protéoglycanes et traversent les canaux calciques présentés dans la membrane des vésicules matricielles ou annexines (Anderson et al., 2005).

Les composés contenant du phosphate (esters phosphoriques inhibiteurs de la minéralisation) vont être dégradés par l'ALP sécrétée par les ostéoblastes, libérant des ions phosphate à l'intérieur des VM. Les cristaux d'hydroxyapatite se forment grâce à l'accumulation de phosphate et de calcium dans les vésicules (Glimcher et al., 1998).

Lorsque que les VM se retrouvent en sursaturation d'ions calcium et phosphate, la deuxième phase de la minéralisation prend place. La suraccumulation entraine la rupture des vésicules, libérant ainsi les cristaux d'hydroxyapatite dans la matrice environnante (Boivin et al., 2002 ; Boivin et al., 2008)
Les ostéoblastes ainsi devenus matures subissent des modifications morphologiques et deviennent de grandes cellules cuboïdes (Nakashima, et al.,

2002 ; Glass II et al., 2005 ; Hu et al., 2005).

Entre 10 et 30% des ostéoblastes se différencient en cellules ostéocytaires ou ostéocytes, alors que le reste des cellules rentrent en apoptose (Fig. 15) (Aubin et al., 2002). Lors de la différenciation en ostéocytes, les ostéoblastes s'incorporent dans l'ostéoïde. A ce stade, l'ostéoblaste grossit et dispose d'un appareil de Golgi bien développé pour le stockage du collagène. Lorsqu'elles sont entièrement intégrées dans la matrice, les cellules cessent leur activité de synthèse d'ostéoïde et deviennent plus petites en raison de la diminution de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique (Burr et al., 2015).

A la fin du processus de différenciation, les ostéoblastes peuvent donc soit demeurer inactifs, soit mourir par apoptose, soit devenir des ostéocytes, ou encore devenir des cellules bordantes de l'os (Fig. 16).

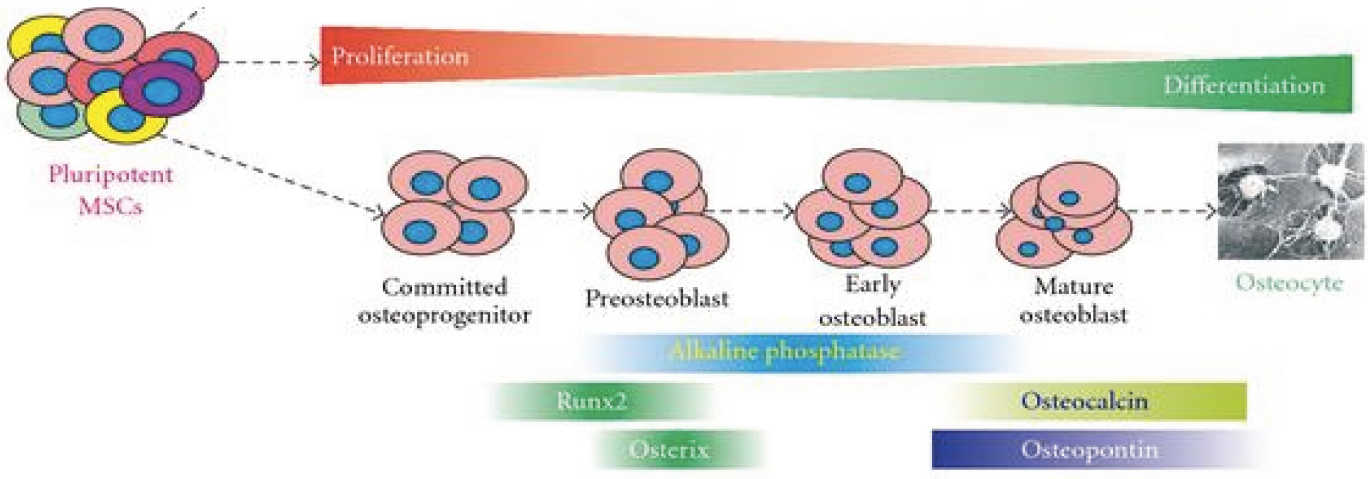


Figure 16 : Différenciation des ostéoblastes à partir des cellules souches mésenchymateuses

Les MSC sont des cellules progénitrices pluripotentes capables de se différencier en plusieurs lignées dont la lignée ostéogénique. La différenciation se fait en plusieurs étapes pour arriver à l'obtention d'ostéoblastes terminaux ou ostéocytes. Runx2 et Osterix sont les régulateurs principaux de l'ostéogénèse. La présence de phosphatase alcaline confirme le caractère ostéogénique des cellules en tant que marqueur précoce, par la suite l'expression de l'ostéocalcine et de l'osteopontine confirme la maturité des cellules en tant que marqueurs tardifs. Adapté de Wagner et al., 2010

D. Les cellules souches comme source de cellules ostéoblastiques

Les cellules souches multipotentes (MSC)

Bien que l'os présente une capacité de régénération remarquable, le vieillissement, les maladies ou les blessures entraînent souvent une perte osseuse importante, empêchant le remplacement naturel de ce tissu dans l'organisme. Bien que !'autogreffe osseuse fournisse les meilleurs résultats cliniques pour le traitement substitutif osseux (Damien et al., 1991), elle est associée à une douleur intense au niveau du site de prélèvement et à une morbidité élevée (Arrington et al., 1996). De même, les greffes allogéniques comportent non seulement un risque de rejet immunologique, mais également la possibilité de transmission de maladies du donneur au receveur (Keiner et al., 2004). Les cellules souches mésenchymateuses (MSC) autologues dérivées de la moelle osseuse constituent une source prometteuse de cellules pour la régénération musculo-squelettique en raison de leur potentiel de différenciation en ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes (Granero-Molto et al., 2008, Lian et al., 2010). Cependant, l'utilisation de MSC en thérapie de reconstruction orthopédique peut être limitée par leur potentiel prolifératif qui diminue de manière significative avec l'âge (Stenderup et al., 2003).

Les cellules souches pluripotentes qui peuvent s'auto-renouveler et se différencier en n'importe quel tissu représentent donc une source théoriquement illimitée d'ostéoblastes. Des études récentes rapportent que les ES et les iPSC peuvent donner lieu à des ostéoblastes *in vivo* en utilisant un modèle de complémentation squelettique : des souris déficientes en Runx2, un facteur de transcription principal pour l'ostéoblastogenèse, ne parviennent pas à former un squelette minéralisé et une moelle osseuse. Des cellules ES GFP+ et YFP+ de type sauvage ont été introduites dans le bastocyte d'embryons Runx2-null. Ils ont alors constaté que la proportion de CSP dans les embryons chimériques résultants était directement corrélée au degré de minéralisation du crâne. De plus, la contribution des CSP au développement des os longs a permis de rétablir avec succès l'hématopoïèse de la moelle osseuse (Chubb et al., 2017). Cependant, étant donné que la transplantation *in vivo* d'ES et d'iPSC comporte un risque de formation de tératome, les ostéoblastes dérivés de la différenciation d'ES et d'iPSC *in vitro* pourraient être préférés à des fins d'ingénierie du tissu osseux. Plusieurs études récentes ont porté sur la

différenciation des ES et des iPSC en ostéoblastes (Wu et al., 2015, Lou 2015 et Duplomb et al., 2006)

Pour accroître encore l'efficacité de la différenciation ostéogénique des cellules ES, plusieurs groupes ont examiné l'utilisation de structures 3D en culture. Jukes et al. a différencié des cellules ES dans une matrice cartilagineuse pour récapituler l'ossification endochondrale. Lorsque ces matrices ont été transplantées dans des lésions crâniennes chez le rat, ces dernières ont subi une hypertrophie, une calcification et finalement un remplacement osseux (Jukes et al., 2008). Parmi les autres matrices utilisées on retrouve : des matrices extracellulaires dérivées d'ostéoblastes décellularisés (Evans et al., 2010, Marolt et al., 2012), des matrices PLGA (Rutledge et al., 2014), des microporteurs (Alfred et al., 2011), du gel de collagène de type I (Taiani et al., 2013) et de l'hydroxyapatite / phosphate tricalcique (HA / TCP). (Xin et al., 2014, Kuznetsov et al., 2011).

La différenciation ostéogénique des cellules ES est fréquemment évaluée par des essais *in vitro* tels que la vérifiation de dépôt de minéraux et l'expression de marqueurs ostéoblastiques. Cependant, les essais *in vitro* ne permettent pas de prédire de manière fiable la formation osseuse *in vivo* (Kuznetsov et al., 2011). Les essais *in vivo* les plus courants de formation osseuse sont l'implantation sous-cutanée (généralement associée à un microporteur) chez des souris immunodéprimées (Bielby et al., 2004, Marolt et al., 2012, Alfred et al., 2011, Kuznetsov et al., 2011, Kim et al., 2014) ou la guérison d'une lésion de taille critique dans le crane (Xin et al., 2014, Jukes et al., 2008).

Soulignant le potentiel de la modélisation des cellules iPS pour étudier les maladies squelettiques, Matsumoto et al. a généré des cellules iPS à partir de fibroblastes cutanés de patients atteints de fibrodysplasie ossifiante progressive (FOP). Lorsqu'elles sont induites à subir un développement endochondral, les cellules FOP-iPS présentent un dépôt minéral et une chondrogenèse accrue *in vitro*. (Matsumoto et al., 2013). Les cellules iPS ont également été utilisées pour étudier les mécanismes moléculaires sous-jacents au développement de l'ostéosarcome chez les patients atteints du syndrome de cancer familial de Li Fraumeni et les auteurs ont identifié le dérèglement du gène H19 comme facteur clé lors de l'ostéogenèse (Lee et al., 2015). La dysplasie fibreuse, le syndrome de McCune Albright et l'ostéogenèse imparfaite sont d'autres maladies squelettiques potentielles susceptibles de conduire à la modélisation

par des cellules iPS. Pour les maladies monogéniques, les méthodes d'édition de gènes pourraient un jour constituer une source de cellules saines de remplacement.

E. La neurofibromatose de Type 1 et les anomalies osseuses

Les difficultés à comprendre la physiopathologie humaine des anomalies squelettiques de NF1 ont conduit au développement de modèles murins pour déterminer le rôle de *Nf1* dans les cellules osseuses et faciliter les études précliniques. L'ARNm et la neurofibromine Nf1 sont exprimés dans l'os et le cartilage de souris au cours du développement et à l'âge adulte (Kuorilehto et al., 2004), et plus particulièrement dans les cellules souches mésenchymateuses, les chondrocytes et les ostéoblastes (Elefteriou et al., 2006; Kolanczyk et al., 2007) et les ostéoclastes (Yang et al., 2006). Ce mode d'expression suggère que les anomalies squelettiques liées à *NF1* résultent en partie de défauts osseux primaires liés à une hétérozygotie généralisée de *NF1* et/ou à une perte de fonction de *NF1* dans des types de cellules osseuses spécifiques. La létalité embryonnaire précoce des embryons Nf1-/- ne permettait pas les analyses des défauts osseux (Brannan et al., 1994; Jacks et al., 1994; Lakkis et Epstein, 1998). La première étude sur les défauts osseux causés par NF1 présente des souris Nf1+/- dont les cellules ostéoprogénitrices et les ostéoblastes présentent des défauts de prolifération et de différenciation *in vitro* et une activation constitutive de la signalisation de la voie Ras et Erk, comme observé dans les cellules de Schwann Nf1+/- (Yu et al., 2005).

Yan et al., a également démontré que l'haploinsuffisance en *Nf1* affecte également la lignée monocytaire, sur la base de l'observation selon laquelle les précurseurs des ostéoclastes Nf1+/- subissent une différenciation *in vitro* plus rapide que leurs homologues de type sauvage (WT) et ce, en raison de l'activation de la voie Ras-AKT-PI3K (Yan et al., 2008).

Malgré les phénotypes cellulaires observés *in vitro* dans des ostéoblastes Nf1+/- (Yu et al., 2005) et des ostéoclastes Nf1+/- (Yang et al., 2006), aucun défauts de masse osseuse ni aucune dysplasie osseuse focale n'ont été observés dans ces souris Nf1+/-, ce qui suggère que l'hétérozygotie seule est insuffisante pour expliquer la dysplasie tibiale ou vertébrale chez les patients NF1. La théorie se porte alors sur la possibilité d'une inactivation somatique de

l'allèle NF1 normal dans un ensemble de cellules provenant des tissus affectés. Celle ci est confirmée par la démonstration de la double inactivation de *NF1* dans des tissus prélevés sur les sites de pseudarthrose chez certains patients atteints de NF1 (Stevenson et al., 2006; Sakamoto et al., 2007). L'effet du déficit bi-allélique en *Nf1* dans les ostéoblastes, généré à l'aide de souris transgéniques exprimant la Cre-recombinase sous le contrôle du promoteur de collagène de type 2 de 2,3 kb spécifique aux ostéoblastes (souris Nf1-/-ob), a été étudié par l'équipe d'Elefteriou et al., (2006). Les os des souris Nf1-/-ob présente une synthèse accrue de collagène et une minéralisation retardée, provoquant une augmentation importante des tissus ostéoïdes, similaire à celle observée dans les coupes histologiques osseuses NF1 humaines (Elefteriou et al., 2006; Brunetti-Pierri et al., 2008; Seitz et al., 2009). Les os des souris Nf1-/-ob présentent également une augmentation du nombre d'ostéoclastes et une résorption osseuse similaire à celle des cas NF1 humains (Stevenson et al., 2008).

Ces études in vivo indique que la neurofibromine dans les ostéoblastes inhibe la synthèse du collagène, favorise la minéralisation et régule également l'ostéoclastogenèse en limitant l'expression de l'activateur du récepteur du facteur nucléaire κB (RANKL), principale cytokine ostéoblastique favorisant la formation d'ostéoclastes matures. L'activation constitutive de Ras, Erk, Rsk2 et du facteur de transcription ATF4 a été identifiée comme régulateur majeur de la synthèse accrue de collagène et de l'ostéoclastogenèse en réponse à un déficit en *Nf1* (Elefteriou et al., 2006). Un autre modèle de souris, le modèle Nf1Prx-/-, supprime les deux allèles de *Nf1* dans les cellules mésenchymateuses et leurs dérivés (ostéoblastes, adipocytes, chondrocytes, cellules musculaires et cellules endothéliales de la calotte crânienne). Ces souris présentent un retard de croissance et des membres manifestement anormaux (Kolanczyk et al., 2007). En effet, une inclinaison du tibia similaire à celle présente chez les patients atteints de NF1 est observée. Une augmentation de la porosité des os et une diminution de la teneur en calcium ont été proposées comme cause de cette courbure. Dans le modèle de souris Nf1Prx-/- une différenciation retardée des ostéoblastes est observée, ce qui n'a pas été constaté chez la souris Nf1-/-ob.

Le modèle souris Nf1Prx-/- récapitule assez étroitement les anomalies osseuses liées à NF1 chez l'homme. Ces souris présentent également une réparation retardée des lésions osseuses corticales, ce qui en fait un bon modèle pour les

études précliniques liées à la cicatrisation osseuse (Kolanczyk et al., 2008). Ainsi donc, malgré des similitudes avec la condition humaine, aucun modèle de souris ne modélise entièrement les manifestations squelettiques humaines, en partie à cause des limites des manipulations génétiques. Dans les modèles murins Nf1-/-ob. et Nf1Prx-/-, pratiquement tous les ostéoblastes matures ne possèdent pas les deux copies de *Nf1*, alors que chez les patients NF1, la plupart des ostéoblastes sont hétérozygotes pour *NF1* et seule une fraction des ostéoblastes et des ostéoprogéniteurs, probablement limitée aux sites dysplasiques localisés, peuvent avoir une inactivation complète de *NF1*. Chez les souris Nf1-/-ob, les ostéoprogéniteurs ont les deux allèles *Nf1* normaux, et ce modèle ne tient donc pas compte du rôle de *Nf1* dans la différenciation précoce des ostéoblastes. Dans le cas des souris Nf1Prx-/-, les anomalies vertébrales observées chez les patients NF1 ne sont pas observées dans ce modèle car la recombinaison Cre-Lox est limitée au squelette appendiculaire (comprenant les 126 os qui composent les membres supérieurs et inférieurs ainsi que les ceintures osseuses).

Bien que ces modèles de souris aient amélioré notre compréhension des fonctions de *NF1* dans les cellules osseuses, des méthodes et des modèles plus sophistiqués sont nécessaires, notamment pour déclencher une perte de fonction de *NF1* dans certains types de cellules osseuses. Malgré ces limitations, les souris déficientes en *Nf1* sont très utiles dans les tests précliniques. En effet, les premières études précliniques utilisant ces souris ont rapporté une cicatrisation osseuse retardée sur une fracture distale du tibia dans les souris Nf1+/- (Schindeler et al., 2008a). Bien que ces souris Nf1+/- ne reproduisent pas les fractures spontanées observées chez les patients NF1 atteints de dysplasie tibiale, elles démontrent que l'haploinsuffisance en *Nf1* est suffisante pour modéliser le défaut de restauration osseuse dans NF1. Ce résultat suggère également que la guérison des fractures pourrait être altérée dans les os non dysplasiques chez les patients atteints de NF1 (Schindeler et al., 2008a).

Diverses études ont été entreprises sur des modèles précliniques de souris pour évaluer l'efficacité potentielle de certains médicaments sur la formation, la réparation et le remodelage osseux. Une étude récente a démontré que la combinaison des bisphosphonates et de la protéine morphogénétique osseuse 2 (BMP2, une protéine qui induit la formation osseuse et cartilagineuse) améliore la production osseuse dans les cellules Nf1+/- dans un modèle *in vivo* de

formation osseuse hétérotopique (formation d'os dans les tissus mous) (Schindeler et al., 2008b). Ce traitement n'a pas permis de corriger les défauts de signalisation spécifiques associés aux ostéoblastes Nf1-/- ou Nf1+/-, mais représente une approche initiale. Les bisphosphonates sont actuellement utilisés pour d'autres applications, de sorte qu'ils pourraient rapidement passer aux essais cliniques sur la NF1.

En 2011, l'équipe de Wang, a généré un nouveau model de souris pour la modélisation des défauts osseux dans NF1. Ils ont émis l'hypothèse que la perte de fonction *Nf1* dans un sous-ensemble de cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse ou de cellules ostéochondroprogénitrices était à l'origine des anomalies osseuses dystrophiques focales de NF1. Les transcripts de collagène de type II (Col2α1) sont détectés pour la première fois au cours du développement embryonnaire chez la souris, 9,5 jours après le coït, dans le sclérotome des somites différenciants et dans le mésenchyme crânien qui donne naissance aux chondrocytes et aux ostéoblastes (Cheah et Lau, 1991).

Sur la base de ce schéma d'expression, ils ont créé des souris transgéniques Col2α1-Cre qui stimulent l'expression de la Cre recombinase dans les cellules ostéochondroprogénitrices et dans les chondrocytes et ostéoblastes (Ovchinnikov et al., 2000, Terpstra et al., 2003, Maes et al., 2010) pour générer des souris dépourvues de *Nf1* dans le limbe et des cellules ostéochondroprogénitrices du squelette axial (appelées ici souris Nf1Col2-/-), en espérant qu'un tel modèle de souris, en raison de la recombinaison précoce de *Nf1* dans la lignée mésenchymateuse, devrait afficher un large spectre de lésions squelettiques observées chez les patients NF1.

Pour cela, ils ont croisé les souris Col2α1-Cre transgéniques avec les souris Nf1flox/flox pour déterminer si la Nf1 dans les ostéochondroprogénaires axiaux et appendiculaires récapitule ou non les anomalies squelettiques des patients atteints de NF1. Ils ont montré par microtomographie et radiographie, que les souris Nf1Col2-/- présentent une scoliose progressive, une courbure du tibia et des anomalies dans la formation du crâne et de la paroi thoracique antérieure. Ces anomalies sont accompagnées d'un phénotype de masse osseuse diminuée, d'une porosité corticale osseuse élevée, d'une ostéoïdose (défaut de calcification de l'ostéoïde), d'une augmentation de l'ostéoclastogenèse et d'une diminution du nombre d'ostéoblastes, quantifiés par histomorphométrie et

microtomographie 3D. La perte de *Nf1* dans les ostéochondroprogéniteurs à également causé une stature plus courte de l'animal et des défauts du disque intervertébral (Wang et al., 2011). Ce modèle de souris est à ce jour celui qui représente au mieux les défauts osseux présent chez l'homme.

IV. Les cellules de Schwann

A. Généralités

C'est en 1939 que le scientifique Théodore Schwann décrivit pour la première fois l'existence de certaines cellules capables de s'enrouler autour des axones du système nerveux périphérique. Elles porteront désormais son nom en tant que cellules de Schwann. Alors que les neurones forment la base du système nerveux, les cellules gliales telles que les cellules de Schwann sont essentielles à la survie et à la fonction des neurones. A l'instar des neurones, les cellules de Schwann peuvent se multiplier tout au long de la vie d'un individu. Elles font partie du système nerveux périphérique (SNP) et s'occupent de la myélinisation des axones des neurones. On retrouve leurs homologues dans le système nerveux central en tant qu'oligodendrocytes. Contrairement à ces derniers, les cellules de Schwann entrent rapidement en mitose après l'apparition d'une lésion, ce qui suggère qu'elles pourraient être de meilleurs candidats pour le traitement des troubles démyélinisants et des lésions de la moelle épinière.

B. Origine embryonnaire de la cellule de Schwann

Toutes les cellules gliales appartenant au système nerveux périphérique, des cellules satellites que l'on retrouve dans les ganglions périphériques aux cellules de Schwann myélinisantes et non myélinisantes, dérivent de la crête neurale.

La notochorde est la structure qui va permettre la formation de la colonne vertébrale et donc la détermination de l'axe primitif de l'embryon.

Chez l'Homme, au 18ème jour de gestation environ, la plaque neurale s'invagine le long de son axe central pour former le sillon neural avec des replis neuraux de chaque côté. A la fin de la troisième semaine, ces replis commencent à se refermer et à fusionner en suivant une direction cranio/caudale. C'est de cette manière que le tube neural se forme près de l'extrémité antérieure de la notochorde.

Pendant la formation du tube neural à partir de l'ectoderme sus-jacent, une population de cellules diverge de l'ectoderme de surface au sommet des plis neuraux pour former la crête neurale (Moore et Persaud, 1993, Rice et Barone, 2000) (Fig. 17).

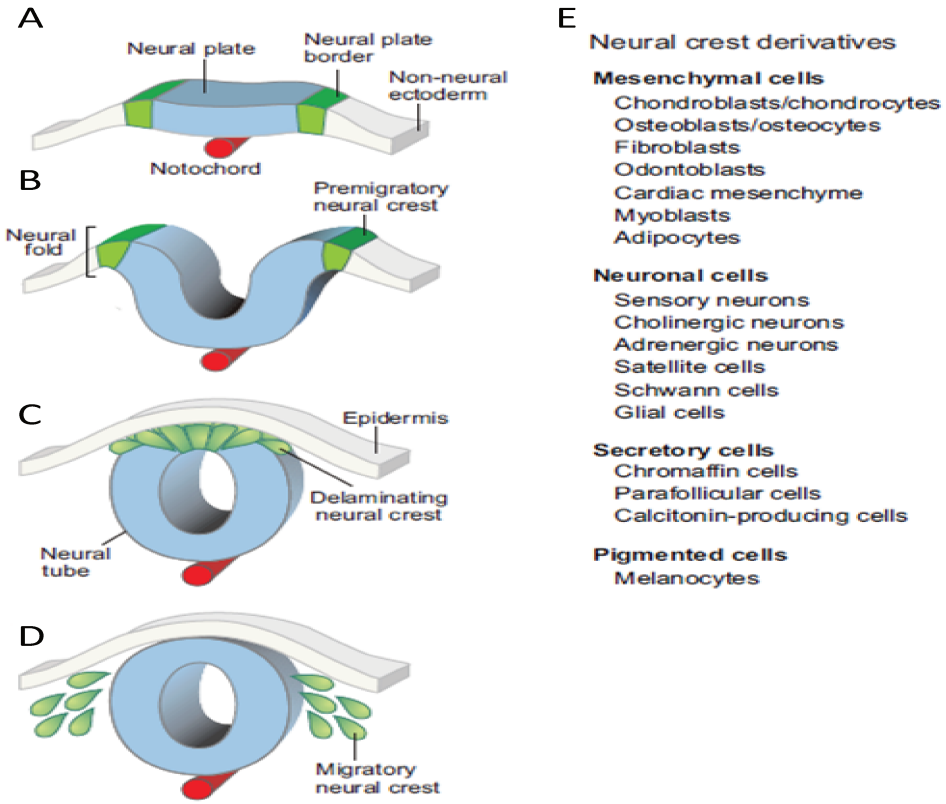


Figure 17 : Formation du tube neural et dérivation des cellules de la crête neurale

(A) Le développement de la crête neurale commence au stade de la gastrula. (B) Lorsque la plaque neurale se ferme pour former le tube neural, les progéniteurs de la crête neurale sont spécifiés dans la partie dorsale des plis neuronaux. (C) Après spécification, les cellules de la crête neurale se désolidarisent du tube neural. (D) Les cellules de la crête neurale migratrice suivent des voies stéréotypées vers diverses destinations, où elles donneront naissance à des dérivés distincts. (E) La crête neurale est multipotente et a la capacité de donner naissance à divers types de cellules, y compris des cellules d'identité mésenchymateuse, neuronale, sécrétoire et pigmentée. Adapté de Simões-Costa et al., 2015

1. Cellules de la crête neurale

La crête neurale correspond à une petite population transitoire de cellules qui se détache au niveau dorsal du tube neural lorsqu'il se ferme. Les cellules vont alors se disperser rapidement, migrer et proliférer afin de se différencier pour former une pléthore de types cellulaires, parmi lesquels des neurones, des cellules gliales, des cellules pigmentaires, du cartilage et des muscles lisses (Le Douarin et Smith, 1988 ; Weston, 1991).

En fonction de leur localisation au niveau du tube neural, les cellules de la crête

neurale se spécialisent progressivement pour générer un type cellulaire particulier. Bien que certaines cellules de la crête neurale puissent déjà être affectées à un lignage cellulaire particulier, de nombreuses cellules sont bi- ou multipotentes (c'est-à-dire qu'elles peuvent donner lieu à plus d'un type de cellule différenciée). En effet, ceci a été démontré *in vitro* par culture clonale et *in vivo* en injectant des cellules de la crête neurale marquées avec un traceur qui va permettre ensuite d'identifier quel lignage, les cellules marquées, ont choisi (Frank et Sanes, 1991 ; Fraser et Bronner-Fraser, 1991 ; Anderson, 1993). Cette découverte implique que les cellules différenciées à partir des cellules de la crête neurale ont fait des choix de lignage mais aussi que certaines cellules de la crête neurale ont des caractéristiques de cellules souches capables de s'auto-renouveler (Stemple et Anderson, 1992). On parlera alors de cellules souches de la crête neurale (NCSC) que l'on retrouve au niveau des diverses structures cibles de la crête neurale : crête neurale du crâne, du tronc, vagale et sacrée et enfin crête neurale cardiaque (Bixby et al., 2002 ; Fernandes et al., 2004 ; Sieber-Blum et Grim, 2004 ; Trentin et al., 2004 ; Delfino-Machin et al., 2007).

La capacité de multipotence et d'auto-renouvellement des NCSC est caractérisée par l'expression de marqueurs gliaux précoces, tel que la protéine myéline zero (P0), la protéine de la myéline périphérique 22 (PMP22) et la protéine desert hedgehog (Dhh). Dhh est exprimé dans la lignée gliale périphérique dès les premiers stades de développement, mais elle ne l'est pas dans les cellules migratoires de la crête neurale (Jaegle et al., 2003).

Malgré le rôle important des NCSC associées à la lignée gliale au cours du développement et à l'âge adulte, la spécification gliale et la différenciation ont déjà lieu aux stades précoces du développement embryonnaire. Dans les nerfs spinaux, la génération de cellules de Schwann est un processus qui implique deux stades embryonnaires transitoires : Le premier est la gliogenèse, dans lequel les cellules de la crête neurale sont spécifiées pour former les précurseurs de cellules de Schwann (SCPs), suivies par une évolution de ces cellules en cellules de Schwann immatures (Dong et al., 1995). Ces cellules se différencient ensuite pour former des cellules de Schwann myélinisantes et non myélinisantes (Fig. 18).

Chez le rat, les SCPs sont présentes dans les nerfs spinaux autour du 14/15 jours embryonnaire (E14/15) et ils donnent naissance à des cellules de

Schwann immatures autour de E17/18 (Jessen et al., 1994). Chez la souris, cependant, cette étape de maturation se déroule 2 jours plus tôt : les SCPs sont présentes dans les nerfs autour de E12/13, et ils donnent naissance à des cellules de Schwann immatures autour de E15/16 (Dong et al., 1999).

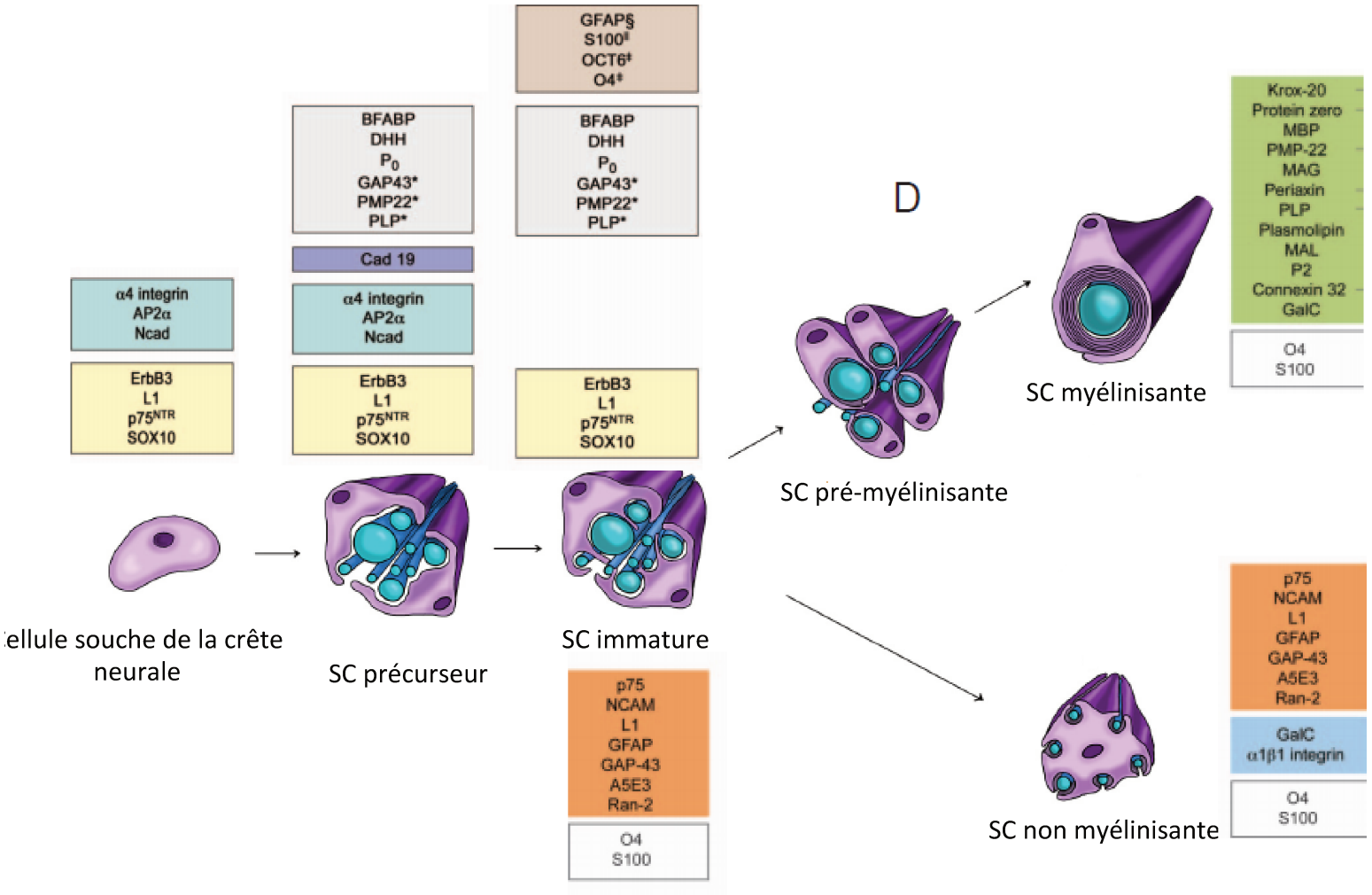


Figure 18 : Différenciation des cellules de Schwann

Les encadrés montrent le profil moléculaire de chaque étape. Notez que certains encadrés sont présents simultanément au cours de différentes étapes de différenciation. Excepté pour la cadhérine 19 (Cad 19) qui est exclusivement exprimée par les cellules précurseurs de Schwann (SCPs). Chaque stade de développement implique des relations caractéristiques avec les tissus environnants et des propriétés distinctives de signalisation cellulaire. Adapté de Castelnovo et al., 2017

2. Les précurseurs de cellules de Schwann

La différenciation et la survie des cellules de Schwann reposent sur les voies de signalisation Nrg1 et Notch. Les neurégulines sont fournies par les axones et se lient aux récepteurs à activité tyrosine kinases de la famille ErbB, qui sont situés sur les membranes plasmiques des cellules de Schwann.

Les mammifères possèdent quatre gènes codant des neurégulines (Ngr1 à 4). Dans les nerfs du SNP, les dimères ERBB2 et ERBB3 forment un complexe à la surface des cellules de Schwann. Le domaine extracellulaire de NRG1 de type III se lie et active ce complexe, permettant la communication glie-axone. Plus un axone va sécréter de NGR1, plus les cellules de Schwann vont produire de la gaine de myéline. En effet, lorsque des souris mutantes sont dépourvues d'un allèle de Nrg1 on retrouve moins de myéline associée à leurs axones et lorsqu'elles surexpriment Nrg1, plus de myéline est associée à leurs axones (Michailov et al., 2004).

Les SCPs sont clairement distincts des NCSC desquelles elles dérivent mais également de leurs progénies (les cellules de Schwann immatures) (Fig. 18). En effet, elles présentent de nombreuses différences en termes de caractéristiques phénotypiques comprenant notamment les marqueurs moléculaires spécifiques de ce lignage. Par exemple, les SCP se distinguent des NCSC par l'expression *in vivo* de BFABP, P0 et Cadherin-19, entre autres (revue dans Jessen et Mirsky, 2005). Les combinaisons de facteurs de croissance, dont le facteur de croissance fibroblastique (FGF), le facteur de croissance analogue à l'insuline (IGF), le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) et la neurotrophine 3 (NT3) permettent la différenciation des NCSC en SCP (Woodhoo et al., 2004).
Des analyses de l'expression génique de ces populations ont révélé un groupe important de gènes différentiellement exprimés dans les NCSC et les SCP, parmi lesquels de nombreux gènes codant des protéine-kinases et des phosphatases (Buchstaller et al., 2004). Ces résultats suggèrent qu'un programme génétique complexe est impliqué soit dans la promotion de la spécification gliale, soit dans la suppression du maintien des cellules souches, soit dans l'inhibition de la neurogenèse dans les cellules de la crête neurale au profit d'un destin glial.

3. Les cellules de Schwann immatures

Les cellules de Schwann immatures se développent à partir des cellules précurseurs de Schwann qui ont migré et s'associent à de nombreux axones au sein d'un même faisceau. Grâce à un processus appelé tri radial, les cellules de Schwann immatures trient progressivement les axones du faisceau principal. Des cellules de Schwann immatures associées à un seul grand segment axonal deviendront des cellules de Schwann myélinisantes. Celles qui s'associent à plusieurs axones de petit calibre deviendront des cellules de Schwann non myélinisantes, enveloppant l'axone dans une poche de son cytoplasme, formant un faisceau de Remak.

En effet c'est autour de E17 / E18 chez le rat (E15 / 16 chez la souris), que des groupes d'axones sont regroupés et enveloppés par des cellules de Schwann immatures (Webster et Favilla, 1984). Avant la mise en place de gaine de myléline autour des axons, les cellules de Schwann immatures effectuent ce tri radial des axones, processus physiologique qui débute au cours de la période périnatale et se poursuit jusqu'au 10e jour post-natal (P10) dans le système nerveux périphérique des rongeurs (SNP).

Au début du tri radial, les axones sont regroupés en faisceaux par une «famille» de 3 à 8 cellules de Schwann immatures qui organisent une lame basale commune autour d'elles (Jessen et Mirsky, 2005; Webster et al., 1973). Webster et al., a montré que ces familles de cellules de Schwann entourent des axones de calibre mixte et envoient des éléments cytoplasmiques, ressemblant à des lamellipodes, entre les axones pour choisir et séparer progressivement les plus gros axones situés à la périphérie du faisceau. Grâce à la prolifération progressive des cellules de Schwann et à la subdivision des faisceaux d'axones, ces gros axones acquièrent une relation 1:1 avec une cellule de Schwann (pro-myélinisante) et deviennent myélinisés à la suite du dépôt de la lame basale de la cellule de Schwann (défasciculation).

À mesure que la prolifération des cellules de Schwann et la ségrégation axonale progressent, les faisceaux d'axones deviennent plus petits jusqu'à ce qu'ils ne contiennent plus que des axones de petit calibre, qui se différencieront par la suite en faisceaux de Remak.

Ainsi, le tri radial est un processus morphogénétique qui peut être divisé en plusieurs étapes: la formation des familles de cellules de Schwann et le dépôt de la lame basale (stade 1), l'insertion des lamellipodes des cellules de Schwann dans des faisceaux axonaux (stade 2), reconnaissance des axones de gros calibre (stade 3), segregation radiale des grands axones vers la périphérie

(d'où le nom de «tri radial»; stade 4), adaptation du nombre de cellules de Schwann et d'axones (prolifération) et enfin défasciculation et établissement de la relation 1:1 entre l'axone et la cellule de Schwann pro-myelinisante (étape 5).

Suite au tri radial, les axones de grand diamètre seront alors sélectivement enveloppés par des cellules de Schwann immatures. Ceci est une condition préalable à la myélinisation. C'est au cours de cette étape du développement nerveux que le nombre d'axones et de cellules de Schwann doit être adapté. En effet, à ces stades embryonnaires tardifs, la différenciation neuronale est terminée et les cellules de Schwann doivent s'adapter en régulant leur survie ainsi que leur prolifération (Davies, 1996).

Il existe un certain nombre de signaux qui favorisent la survie de la cellule de Schwann. Parmi lesquels on retrouve des facteurs associés aux axones tels que les NRG1. La section transversale des nerfs sciatiques, qui provoque une dégénérescence axonale, conduit à une augmentation de l'apoptose des cellules de Schwann. Cela suggère donc un rôle dans la régulation de leur survie d'un facteur axonal. Ce facteur axonal pourrait être NRG1, en effet, lorsque l'on utilise NRG1 de manière exogène, il est capable d'empêcher la mort cellules de Schwann (Grinspan et al., 1996 ; Newbern et al., 2010 ; Furlan et al., 2018). *In vitro*, les cellules de Schwann possèdent également des mécanismes de survie autocrine.
Lorsqu'une section transversale des nerfs sciatiques est observée, s'accompagne alors des changements phénotypiques radicaux dans les cellules de Schwann. Ainsi, après lésion, les cellules de Schwann myélinisantes vont présenter une diminution d'expression des gènes nécessaires à la mise en place de la myéline (P0, Krox20 et MBP) entrainant une dé-différenciation en cellules de Schwann immatures. Mais également une activation, dans ces cellules de Schwann myélinisantes, de processus de réparation (Jessen et al., 2016). En effet, il a été montré une augmentation des facteurs neurotrophiques et des protéines de surface qui favorisent l'élongation axonale et la survie des neurones lésés, notamment le facteur neurotrophique dérivé de la lignée de cellules gliales (GDNF), l'artemin, le facteur neurotrophique dérivé du cerveau (BDNF), la neurotrophine-3 (NT3), le facteur de croissance nerveuse (NGF), facteur de croissance endothéliale vasculaire (VEGF), érythropoïétine, pléiotrophine, p75NTR et N-cadhérine (Fontana et al. 2012; Brushart et al. 2013; Boyd & Gordon, 2003; Chen et al. 2007; Scheib et Hoke, 2013; Wood et Mackinnon, 2015).

De plus, l'activation d'une réponse immunitaire innée est observée, comprenant la régulation à la hausse de certaines cytokines, notamment le facteur de nécrose tumorale α (TNFα), l'interleukine-1α (Il-1α), le facteur Il-1β, le facteur d'inhibition de la leucémie (LIF) et la protéine chimiotactique monocytaire 1 (MCP-1) par les cellules de Schwann dans la partie distale du nerf sectionné (Martini et al., 2008; Rotshenker, 2011). Les cellules de Schwann intactes (à proximité de la zone lésée) sont donc recrutées comme cellules de réparation possédant ces différentes qualités.

Ainsi, la reprogrammation des cellules de Schwann induite par une lésion implique une régulation à la baisse des gènes de la myéline, associée à l'activation d'un ensemble de fonctions de réparation, incluant la régulation à la hausse des facteurs trophiques, l'élévation des cytokines dans le cadre de la réponse immunitaire innée, la clairance de la myéline par activation de l'autophagie de la myéline dans les cellules de Schwann et du recrutement des macrophages (Ramaglia et al., 2008; Vargas et al., 2010; Hirata & Kawabuchi, 2002; Dubovy et al., 2013). Ce programme de réparation est contrôlé de manière transcriptionnelle par des mécanismes impliquant le facteur de transcription c-Jun, rapidement régulé positivement par les cellules de Schwann après une lésion. En l'absence de c-Jun, les dommages entraînent la formation d'une cellule de réparation dysfonctionnelle, la mort neuronale et l'échec de la récupération fonctionnelle (Arthur-Farraj et al. 2012).
Bien que cela ne soit pas nécessaire pour le développement des cellules de Schwann, le c-Jun est donc essentiel pour la reprogrammation des cellules de Schwann myélinisante et non-myélinisante (Remak) afin de réparer les cellules après une lésion.

Les laminines joueraient également un rôle essentiel dans la promotion de la survie des cellules de Schwann *in vivo*.
L'ablation génétique chez la souris de la sous-unité Y1 de la laminine 2 entraîne une augmentation significative de l'apoptose des cellules de Schwann dans les nerfs sciatiques à E17 (Yu et al., 2006). Une réduction de l'activité de la phosphatidyl-inositolinositol-3 kinase (PI3K) induit une augmentation de l'apoptose des cellules de Schwann chez ces souris mutantes.

4. Les cellules de Schwann matures

L'établissement de gaines de myéline autour des axones de grand diamètre est indispensable pour permettre la conduction saltatoire rapide des impulsions nerveuses le long des axones. Cependant, tous les axones ne sont pas myélinisés, en effet ceux de petit diamètre n'exigent pas de telles gaines de myéline, car la vitesse de transmission des impulsions dans ces axones n'est certainement pas améliorée (Sherman et Brophy, 2005).

a) Non myélinisantes

Le phénotype moléculaire des cellules de Schwann immatures et non myélinisantes est relativement similaire, au moins dans leur morphologie et l'expression de leurs marqueurs géniques, à l'exception des intégrines α1β1 et α7β1 et de GalC, qui sont exprimées uniquement dans les cellules de Schwann non myélinisantes (Jessen et al. Mirsky, 2005 ; Previtali et al., 2003; Stewart et al., 1997). En revanche, la génération de cellules de Schwann myélinisantes entraîne des changements moléculaires beaucoup plus profonds, car la plupart des protéines associés aux cellules de Schwann immatures sont dé-régulées et il existe une régulation positive d'un certain nombre de gènes associés au contrôle de la myélinisation (Jessen et Mirsky, 2005).

b) Myélinisantes

La myélinisation commence après que les cellules de Schwann soient sorties du cycle cellulaire. Au stade promyélinisant, plusieurs protéines liées à la myéline sont surexprimées dans les cellules de Schwann. Il s'agit de la glycoprotéine associée à la myéline (MAG) et de la protéine de la myéline zéro (P0). P0 est la protéine la plus abondante dans le système nerveux périphérique, et est responsable du maintien des différentes couches compactes de myéline. Le processus de myélinisation commence par une cellule de Schwann qui va venir englober plusieurs segments axonaux à la fois. Ensuite, ces axones vont subir le tri radial jusqu'à ce que la cellule de Schwann sélectionne seulement un segment d'axone à envelopper avec de la myéline (Feltri et al., 2016).

Chez les souris, lorsque le récepteur α6β1 de la laminine est absent, les cellules de Schwann ne parviennent pas à établir la relation un-à-un avec les axones (Feltri et al., 2002). Le dystroglycane, un autre récepteur de la laminine

dans les cellules de Schwann, est un acteur essentiel de la mise en place de la myélinisation. Il participe activement à l'organisation de leur structure cellulaire (Masaki et al., 2010).

Les facteurs initiant la myélinisation ne sont pas entièrement connus, et la raison pour laquelle les cellules de Schwann ne myélinisent que les axones de grand diamètre reste à éclaircir. Juste avant que les cellules de Schwann ne commencent à être myélinisées, le facteur nucléaire kappa B (NF-κB) est régulé positivement ce qui implique la transcription des gènes essentiels à la myélinisation. Un certain nombre de facteurs de transcription sont impliqués dans l'initiation de la myélinisation, y compris Krox20/EGR2, les protéines liant NGFI-1, Oct6 et BRN2 (Fields, 2009). De façon attendue, les molécules d'adhésion cellulaire jouent un rôle important dans l'interaction des cellules de Schwann et des axones et la myélinisation. Les molécules d'adhésion cellulaire L1 et NCAM sont exprimées sur les axones non myélinisés, et elles sont régulées négativement au cours de la myélinisation précoce (Fields, 2009). MAG, une molécule d'adhésion cellulaire qui favorise la liaison entre les axones et les cellules de Schwann myélinisantes, est régulée positivement immédiatement après que la première couche de myéline soit enroulée autour de l'axone (Fields, 2009).

La synthèse des protéines de la myéline augmente et les ARNm codant des protéines liées à la myéline, telles que la protéine basique de la myéline (MBP), se concentrent aux sites distaux dans les cellules de Schwann pour produire une synthèse locale de la myéline. L'enroulement des couches successives de myéline autour des axones et la compression du cytoplasme entre les feuillets nécessitent une extension cellulaire étendue et qui est régulée par la dynamique du cytosquelette d'actine-myosine (Fields, 2009).

Des voies de signalisation intracellulaires sont impliquées dans la mise en place de la myéline, notamment PI3K-AKT et AMPc. La myélinisation par les cellules de Schwann est bloquée par l'activation de Notch, la neurotrophine NT-3, ainsi que par l'ATP extracellulaire (Fields, 2009).

Les neurotrophines, telles que le facteur de croissance nerveuse (NGF) favorisent la survie neuronale, mais le NGF stimule également la myélinisation des cellules de Schwann par effet indirect sur les axones (Chan et al., 2004). En effet, le NGF stimule l'augmentation du diamètre des axones (Markus et al.,

2002) et il existe une corrélation étroite entre le diamètre des axones et le degré de myélinisation *in vivo* et *in vitro* (Windebank et al., 1985). Ce lien étroit a conduit à la spéculation selon laquelle une augmentation du diamètre des axones est le principal signal axonal induisant la myélinisation (Voyvodic, 1989). Cette interprétation, bien que plausible, n'est pas la seule explication potentielle de cette corrélation. Premièrement, la myélinisation elle-même provoque une augmentation du diamètre des axones (de Waegh et al., 1992, Garcia et al., 2003). Deuxièmement, le NGF peut augmenter simultanément le diamètre de l'axone et envoyer d'autres signaux axonaux qui favorisent la myélinisation périphérique (Colello et Pott, 1997; Fraher et Dockery, 1998). L'épaisseur de la couche de myéline est proportionnellement régulée par rapport au diamètre de l'axone. Les axones de plus gros calibre ont une myéline plus épaisse, mais le rapport entre le diamètre des axones et le diamètre total des axones, y compris la gaine de myéline, se situe entre 0,6 et 0,7 (g-ratio), quel que soit le diamètre d'un axone myélinisé. Le BDNF, le récepteur des neurotrophines p75 (P75NTR) ou la surexpression des neurégulines entraînent une myéline anormalement épaisse. Inversement, si les récepteurs ErbB dans les cellules de Schwann sont enlevés après le début de la myélinisation, la gaine ne se développe pas avec un g-ratio d'épaisseur normale (Garratt et al., 2000 et Michailov et al., 2004).

Les cellules de Schwann font preuve d'une très grande plasticité et régulent également leur propre survie. Les cellules de Schwann myélinisantes et non myélinisantes peuvent se dé-différencier en cellules de Schwann immatures après destruction de l'interaction axonale. Une fois le contact avec l'axone rétabli, ces cellules (redevenues immatures) vont évoluer en cellules myélinisantes ou non myélinisantes en fonction du signal axonal reçu (Jessen and Mirsky, 2016). Alors que les cellules de Schwann précurseurs et immatures dépendent des signaux axonaux, les cellules de Schwann matures peuvent survivre en l'absence de neurones (Jessen & Mirsky, 2005). Les cellules de Schwann matures sont également capables de bloquer leur propre apoptose en participant à une boucle autocrine libérant des facteurs de croissance comme des facteurs de croissance analogues à l'insuline (IGF), des facteurs de croissance dérivés des plaquettes BB (PDGF-BB) et la neurotrophine-3 (NT-3).

C. Les pathologies liées aux cellules de Schwann

1. Schwannomatose

La schwannomatose est une forme rare de neurofibromatose qui se caractérise principalement par des schwannomes multiples (tumeurs bénignes du système nerveux). Les signes et les symptômes de la maladie varient en fonction de la taille, de l'emplacement et du nombre de schwannomes. Les formes héréditaires de la pathologie ne représentent que 15% de tous les cas. Dans certaines familles, la schwannomatose est causée par des mutations des gènes SMARCB1 ou LZTR1 (Smith et al., 2015); dans d'autres cas, la cause sous-jacente exacte est inconnue. Lorsqu'elle est héritée, la condition est transmise de manière autosomique dominante avec une expressivité très variable et une pénétrance réduite. Le traitement peut inclure des médicaments et/ou une chirurgie.

2. Les neurofibromes dans NF1

Les neurofibromes sont des symptômes caractéristiques de la neurofibromatose de type 1. Il en existe deux formes principales : les neurofibromes sous-cutanés et les neurofibromes plexiformes. Il s'agit de tumeurs hétérogènes que l'on retrouve sur les nerfs périphériques. Tous les types cellulaires présents dans les nerfs périphériques sont impliqués dans la formation de ces tumeurs. On y retrouve des axones, des cellules endothéliales, des mastocytes, des fibroblastes et des cellules de Schwann (Le and Parada, 2007 ; Yang et al., 2008) .

Au cours du développement, les cellules de Schwann précurseurs dérivent des cellules de la crête neurale qui ont migré dans les nerfs périphériques (Figure 18 du sous chapitre « Cellules de la crête neurale »). Après la naissance, ces cellules précurseurs devenues immatures se développent en formant deux groupes de cellules de Schwann : les cellules myélinisantes et les cellules non myélinisantes (Morrison et al., 1999).

La mutation au hasard de *NF1* peut atteindre les diverses cellules des nerfs périphériques dérivés des crêtes neurales à différentes étapes de leur différenciation, et ainsi donc conduire à des symptômes différents.

Ainsi donc, Le neurofibrome plexiforme dériverait probablement de la lignée embryonnaire des cellules de Schwann, tandis que le neurofibrome sous-cutané aurait pour origine des cellules de Schwann plus matures et atteintes avec des mutations mono-alléliques et bi-alléliques.

D. La neurofibromatose de type 1 et les cellules de Schwann

Environ un tiers des patients atteints de NF1 développent des neurofibromes plexiformes. Ces tumeurs peuvent former de grandes masses défigurantes impliquant les troncs nerveux et s'infiltrant dans les tissus environnants (Jouhilahti et al., 2011). Les neurofibromes plexiformes sont considérés comme des lésions congénitales et le risque de leur transformation maligne souligne leur importance clinique. L'inactivation bi-allélique conduisant au développement de neurofibromes plexiformes a apparemment lieu dans des cellules embryonnaires qui ont la capacité de générer de grandes populations de cellules porteuses d'une seconde mutation *NF1* (Zhu et al., 2002, Wu et al., 2008). La croissance des neurofibromes plexiformes au cours de la petite enfance distingue ces tumeurs des neurofibromes cutanés, indétectables avant la puberté (Ferner 2010). Des études chez la souris ont démontré que les cellules de Schwann Nf1-/- sont nécessaires, mais pas suffisantes pour générer la formation de tumeurs. Parada et ses collègues (Zhu et al., 2002) ont démontré que les souris Nf1flox/- ;Krox20cre, dans lesquelles 5 à 10% des cellules de Schwann sont nullizygotes pour *Nf1* dans un contexte hétérozygote *Nf1*, ont développé des neurofibromes plexiformes. En revanche, les souris Nf1flox/-;Krox20cre, avec les deux allèles *Nf1* inactivés uniquement dans les cellules de Schwann (les autres cellules sont de type sauvage) n'ont pas développé de neurofibromes.

Ainsi, la progression tumorale nécessite apparemment des interactions entre les cellules de Schwann Nf1-/- et des lignées cellulaires Nf1+/- dans le microenvironnement tumoral. Pour exemple, les neurofibromes plexiformes de souris ne se développent pas si les cellules Nf1+/- de la moelle osseuse sont remplacées par des cellules de la moelle osseuse d'un animal Nf1+/+, suggérant que la croissance et le maintien des neurofibromes dépendent en partie de la présence de mastocytes Nf1+/- (Yang et al., 2008).
Les cellules de Schwann avec génotype un Nf1-/- sécrètent un ligand kit soluble, chimiotactique pour les mastocytes, favorisant la migration, la

prolifération et la survie des mastocytes (Feng-Chun et al., 2003).

Les mastocytes sont depuis longtemps reconnus comme un composant majeur des neurofibromes plexiformes (Brasfield et al., 1972). Les mastocytes immatures sont présent dans le neurofibrome au stade précoce et les mastocytes matures dans le neurofibrome au stade avancé, et il existe certaines preuves que les stabilisateurs des mastocytes peuvent bloquer la formation de neurofibrome (Riccardi 2015). Une étude de patients NF1 a révélé une augmentation des IgE sériques dans un sous-ensemble de patients examinés. Les patients atteints de neurofibromes plexiformes présentaient une incidence d'IgE plus élevée que d'autres patients atteints de NF1 ne présentant pas de neurofibromes (Geller et al., 2006), ce qui suggère une altération du compartiment des cellules B et une interaction potentielle avec les mastocytes (Palm et al., 2016). Des macrophages ont également été trouvés à des niveaux substantiels dans les neurofibromes et les MPNST, avec des niveaux plus élevés dans les MPNST (Prada et al., 2013)

Les mastocytes de souris Nf1-/+ forment plus de colonies en culture, ce qui suggère que le rôle de l'haplo-suffisance de *Nf1* est autonome des cellules.

La prolifération accrue des mastocytes Nf1-/+ dépend de la signalisation RAS / MEK / RAC2 / PAK1 (Ingram et al., 2001, McDaniel et al., 2008) compatible avec l'hyperactivation de la signalisation RAS lorsque les niveaux de neurofibromine sont réduits. Les mastocytes Nf1-/+ sont également hypersensibles aux stimulus migratoires et aux signaux de dégranulation sécrétés par les cellules de Schwann (Yang et al., 2003, Chen et al., 2010). Des expériences sur des modèles murins de neurofibromes comparant la tumorigenèse sur des fonds génétiques de type hétérozygote *Nf1* par rapport à un type sauvage suggèrent que l'hétérozygotie *Nf1* dans le stroma tumoral, en particulier dans la moelle osseuse, est essentielle au développement de la tumorigenèse (Zhu et al., 2002, Yang et al., 2008). Cependant, la dépendance vis-à-vis du stroma hétérozygote *Nf1* peut varier avec le stade de développement auquel le neurofibrome est initié, car les tumeurs initiant une perte de *Nf1* dans les cellules Krox20+ nécessitent une moelle osseuse hétérozygote *Nf1*, tandis que la perte de *Nf1* dans les cellules Dhh+ ou dans les cellules postnatales Plp+ induit des neurofibromes sur un stroma de type sauvage (Wu et al., 2008, Mayes et al., 2012). Alternativement, des différences dans les antécédents génétiques ou le statut pathogène des souris dans ces

différentes expériences pourraient expliquer la variation de la nécessité d'un stroma hétérozygote *Nf1*.

La preuve que le stroma hétérozygote *Nf1* contribue à la formation de neurofibrome a conduit à l'hypothèse selon laquelle les mastocytes sont un facteur critique de la croissance du neurofibrome. Que les mastocytes Nf1-/+ soient ou non nécessaires à la formation du neurofibrome, ils favorisent probablement la tumorigenèse chez les patients atteints de NF1. Les mastocytes Nf1-/+ ont des fonctions pouvant contribuer à la tumorigenèse, notamment une migration et une sécrétion accrue des facteurs de croissance modifiant le comportement des fibroblastes, la sécrétion de collagène et le remodelage du microenvironnement tumoral (Yang et al., 2008, Yang et al., 2006).

Le mésylate d'imatinib (Gleevec/Glivec; Novartis, East Hanover, NJ), un inhibiteur potentiel de c-kit, a été utilisé pour traiter les souris Nf1flox/-;Krox20cre (Yang et al., 2008). L'analyse volumétrique effectuée avec la tomographie par émission de positons au 18Fluoro-deoxy-glucose (18FDG-TEP) a montré que le mésylate d'imatinib réduisait le volume de la tumeur et l'activité métabolique d'environ 50% chez les souris traitées. Cela a conduit au premier essai clinique dans le cadre duquel une fille de 3 ans présentant un neurofibrome hautement vascularisé, non résécable et à croissance progressive a été traitée avec du mésylate d'imatinib. Après 3 mois de traitement, l'imagerie par résonance magnétique a montré une réduction de 70% du volume tumoral (Yang et al., 2008). Cependant, on ne sait toujours pas si ces résultats peuvent être reproduits dans une population plus large de patients atteints de NF1 d'âges et de tumeurs variés.

Environ 2% à 5% des neurofibromes plexiformes progressent en MPNSTs (Evans et al., 2004). Cependant, étant donné que l'inactivation bi-allélique du gène *NF1* se produit dans les neurofibromes bénins, les mutations du gène *NF1* seul ne suffisent pas pour la progression d'un neurofibrome plexiforme vers un MPNST. Des mutations supplémentaires dans d'autres gènes régulateurs ont été décrites dans les MPNSTs, y compris la délétion homozygote de CDKN2A, qui code pour p16INK4A et la perte de p14ARF et TP53 (Jouhilahti et al., 2011). De plus, les caryotypes de nombreux MPNST sont complexes. Il reste à élucider si les MPNST liés à *NF1* sont toujours dérivés de neurofibromes plexiformes ou s'ils peuvent provenir directement des nerfs périphériques.

Pour répondre à cette question, l'équipe de Hirbe et al., a utilisé la technologie du "Whole-exome sequencing" permettant d'identifier (en théorie) la quasi totalité des variations de séquences qui existent au niveau des séquences codantes entre des sujets atteints et des sujets indemnes (Hirbe et al., 2015). Le séquençage a été effectué sur des échantillons de tumeurs et sur du sang normal d'un seul individu atteint de NF1, suivi pendant plus de 14 ans depuis son enfance. À l'âge de 12 ans, on lui a initialement diagnostiqué un neurofibrome plexiforme grossissant dans son hémipelvis gauche, qui a été biopsié et qui a démontré des zones de pléomorphisme nucléaire inquiétantes, ce qui a incité l'ablation chirurgicale pour des raisons diagnostiques. Son neurofibrome plexiforme est réapparu à trois reprises: la même année (à 12 ans), à 14 ans et à 18 ans. Le neurofibrome plexiforme récidivant contenait quelques foyers suspects de MPNST de bas grade (prolifération accrue, pléomorphisme nucléaire…) À 25 ans, on lui a diagnostiqué une MPNST de haut grade survenant au même endroit, qui a été retirée chirurgicalement. Un an plus tard, à 26 ans, elle développa une maladie largement métastatique, avec des métastases au poumon et une atteinte rétropéritonéale. La formation de MPNST nécessite l'acquisition de mutations génétiques supplémentaires qui coopèrent avec la perte de la fonction du gène *NF1* pour favoriser la transformation maligne. Dans les tumeurs murines et humaines, des altérations des gènes TP53, CDKN2A et EGFR contribuent à la pathogenèse de MPNST (Watson et al., 2006; Riddle et al., 2010). De même, des études antérieures avaient utilisé diverses plateformes de découverte pour identifier d'autres gènes essentiels à la progression maligne du neurofibrome plexiforme humain (Watson et al., 2006; Yu et al., 2011; Miller et al., 2009; Upadhyaya et al., 2012; Fang et al., 2009). Malheureusement, peu de ces gènes sont communs à toutes les études et aucun n'est devenu un prédicteur précis de la pathogenèse de la maladie.

Dans son etude, Hirbe et al., a établi la séquence d'événements génétiques associés à la transformation maligne et à la progression (métastases) des neurofibromes de la patiente. Un de ces gènes mutés (SPTN2 codant pour la βIII-spectrine) s'est avéré surexprimé dans la majorité des MPNST et son inhibition a considérablement ralenti la croissance de MPNST murine in vivo (Hirbe et al., 2015). Cette étude représente la première utilisation du séquençage d'exome complet pour définir les événements moléculaires qui accompagnent la progression d'un neurofibrome plexiforme bénin vers une tumeur maligne et des métastases chez un seul individu. Bien que la séquence et la nature des altérations génétiques puissent être spécifiques à un individu donné, la découverte de la βIII-spectrine en tant que gène fréquemment muté et

protéine surexprimée dans d'autres MPNST souligne l'intérêt de cette approche pour identifier de nouvelles cibles.

Afin de mieux comprendre les contributions génétiques (non associé à *NF1*) à la pathogenèse de la formation des neurofibromes plexiformes, l'équipe de Pemov et al., a effectué le séquençage de l'exome entier, le profilage RNASeq et la détermination du nombre de copies pour 23 cultures de cellules de Schwann à faible passage établies à partir d'échantillons de neurofibromes (provenant de résections chirurgicale) (Pemov et al., 2017). Leurs résultats ont montré que l'initiation des neurofibromes associée à la NF1, est provoquée par l'inactivation somatique de la NF1. Ils ont observé trois mutations *NF1* somatiques indépendantes dans trois neurofibromes du même individu, cohérentes avec une origine clonale.

En 2018, l'équipe de Ferrer et al., a établi le profil pharmacologique et génomique (SNP Array, RNAseq et Whole Exome-Sequencing) de cellules de Schwann dérivées de neurofibromes plexiformes dans le cadre de la NF1. Ils ont ensuite réalisé un criblage quantitatif à haut débit basé sur la relation dose-réponse (qHTS) avec une collection de 1 912 composés oncologiques utilisés dans des essais de prolifération cellulaire sur microplaques de 1536 puits. Le criblage d'une telle bibliothèque avec des cellules de Schwann dérivées de patients humains pourrait fournir des informations importantes, notamment : (1) l'identification de médicaments approuvés pouvant être réutilisés pour un traitement des neurofibromes, (2) la découverte de nouvelles cibles non envisagées auparavant pour le traitement de ces tumeurs et , (3) l'étude des combinaisons de médicaments en mettant l'accent sur la réponse différentielle entre les cellules NF1-/- et les cellules hétérozygotes ou normales (de type sauvage).

E. Les cellules souches comme source de cellules de Schwann

1. Les cellules souches multipotentes

Il existe différents types de cellules souches adultes multipotentes qui peuvent générer des cellules de Schwann. Bien que la plupart de ces cellules souches puissent être isolées selon des protocoles peu invasifs, le rendement final est généralement faible.

Un type cellulaire présente cependant une accessibilité plus importante, il s'agit des cellules souches mésenchymateuses multipotentes (MSC). Elles sont une source évidente de cellules souches adultes pour les applications cliniques (Dezawa et al., 2001 ; Shimizu et al., 2007 ; Mimura et al., 2004 ; Caddick et al., 2006). On retrouve dans la littérature de nombreux protocoles de différenciations en cellules de Schwann à partir du tissu adipeux. En effet, ce tissu a été identifié comme une source très riche de MSC qui permet la génération *in vitro* de cellules de Schwann fonctionnelles *in vivo* (myélinisation des axones de la moelle épinière) (Kingham et al., 2007 ; Xu et al., 2008 ; Jiang et al., 2008).

Les cellules souches dérivées de la peau (SKP) et les cellules souches de la crête neurale des follicules pileux (Epi-NSCS) sont deux autres sources accessibles de cellules souches adultes multipotentes avec un potentiel de différenciation en cellules de Schwann mais il s'agit de cellules difficiles à mettre en culture (Fernandes et al., 2004 ; Toma et al., 2005 ; McKenzie et al., 2006 ; Sieber-Blum et al., 2004 ; Krause et al., 2014).

En 2005, l'équipe de Amoh et collègues ont démontré qu'il était possible de différencier *in vivo* des cellules de follicules pileux humain en cellules de Schwann après transplantation *in vivo* (Amoh et al., 2005). Les souris présentaient des lésions du nerf sciatique et après transplantation ils ont constaté une récupération des axones abimés grâce aux cellules injectées qui sont venu coloniser la zone blessée.

D'autres équipes ont isolé des sphères SKP, les ont différenciées en cellules de Schwann et les ont ensuite transplantées dans la moelle épinière d'un rat blessé afin d'induire une remyélinisation (Biernaskie et al., 2007). Cependant, ces cellules ont une pertinence clinique limitée pour les thérapies humaines.

2. Les cellules souches pluripotentes

Les cellules souches pluripotentes, ESC et iPSC, ont le potentiel de générer des cellules de Schwann (Voir chapitre cellules souches). Contrairement aux cellules souches adultes, les cellules souches pluripotentes peuvent être considérées comme une source potentiellement infinie de cellules de Schwann. Les iPSC sont plus prometteuses pour l'application clinique que les ESC, car elles peuvent être dérivées du patient et permettent un greffe autologue, tandis que pour le cas des ESC, un traitement immunosuppresseur est nécessaire.

Idéalement, les cellules de Schwann peuvent être différenciées *in vitro* à partir des ESC et des iPSC en récapitulant avec précision leur ontogenèse, la formation de NCSC étant une étape intermédiaire cruciale. De nombreux protocoles ont été développés pour la génération de cellules de Schwann à partir des ESC ou iPSC chez le rongeur principalement. Cependant, chez l'homme, la différenciation des cellules pluripotentes en cellules de Schwann semble un peu plus compliquée donnant des résultats intéressants mais encore incomplets.

Un certain nombre de chercheurs ont publié sur la différenciation des NCSC de souris et humaines (Tableau 5). Ces NCSC ont été différenciées en dérivées de la crête neurale tels que les neurones sensoriels et sympathiques (Pomp et al., 2005), les cellules musculaires lisses, les mélanocytes (Motohashi et al., 2007) et les cellules de Schwann (Kawaguchi et al., 2010, Mizuseki et al., 2003, Rathjen et al., 2002). Des cellules de Schwann exprimant des marqueurs tels que GFAP, p75NTR, S100β et la protéine basique de la myéline (MBP) ont également été dérivés d'hES (Lee et al., 2007, Zhou et al., 2008 , Jiang et al., 2009). Lee et al. a mis au point un protocole d'induction de crête neurale à partir d'hES, récapitulant la formation de neuroectoderme à l'aide de cellules nourricières MS-5 et une induction en crête neurale. Pour cela, ils ont utilisé des morphogènes SHH, FGF8, BDNF et AA (Lee et al., 2007,Lee et al., 2010). La co-culture d'hES avec des cellules du stroma (SDIA) et la formation de rosettes neurales ont été utilisées pour différencier et enrichir les NCSC dérivées des hES et qui sont p75NTR+.

La différenciation finale vers les cellules de Schwann a été réalisée en les cultivant dans un milieu avec le facteur neurotrophique ciliaire (CNTF), la forskoline (FSK) et NRG1. D'autres protocoles pour la différenciation d'hES en

cellules de Schwann ont été développés en utilisant des combinaisons : cellules stromales et formation de neurosphères en combinaison avec FGF2 (Pomp et al., 2005, Ziegler et al., 2011). Un groupe a également décrit la réparation de nerfs périphériques juste en utilisant des cellules de Schwann dérivées de corps embryoïdes d'hES sans autre différenciation *in vitro* (Cui et al., 2008). À ce jour, seules quelques études ont montré une différenciation en NCSC et une différenciation en cellules de Schwann subséquentes à partir des CSPh (tableau 5). Liu et al. a différencié des NCSC à partir de CSPh en utilisant la formation d'EB et un milieu conditionné par la lignée de cellules stromales PA6 auquel était ajouté du FGF2, un inhibiteur de la voie ROCK et de l'acide ascorbique (Liu et al., 2012). Menendez et al. a publié un protocole pour la différenciation des CSPh en NCSC sans utilisation de cellules stromales, bien qu'aucune génération de cellules de Schwann n'ait été montrée (Menedez et al., 2013). Des cellules de Schwann dérivées d'iPS ont été utilisées pour la régénération nerveuse dans des modèles animaux. Wang et al. a différencié des hES et hiPSC en NCSC en utilisant à la fois des EB et la formation de rosettes neurales, et un milieu sans sérum contenant du FGF2 et de l'EGF (Wang et al., 2011). Les NCSC ont été triés par FACS pour l'expression de p75NTR et différenciés *in vitro* vers le lignage des cellules de Schwann en utilisant du CNTF, de la NRG1 et un analogue de l'AMPc : le dibutyryl cyclique-AMP (dbcAMP). Cependant, les auteurs ont rapporté que ces cellules de Schwann étaient impropres à la transplantation et que les NCSC seraient plutôt utilisées pour l'implantation. Les NCSC ont été ensemencées dans des conduits nerveux, implantés dans un modèle de lésion du nerf sciatique du rat et, après un mois, ont généré des cellules exprimant S100β, indiquant une différenciation gliale *in vivo*. Okawa et al. a utilisé les cellules stromales (PA6) et du BMP4 pour différencier les cellules iPSC de souris GFP-positives en cellules de type crête neurale. Ces cellules ont ensuite été triées par FACS pour l'expression de p75NTR et implantées par voie intramusculaire dans un modèle murin de neuropathie diabétique (Okawa er al., 2013). Certains groupes utilisent la formation de neurosphères comme méthode de culture pour la formation de cellules de la crête neurale à la fois à partir des hES et hiPS (Ziegler et al., 2011, Wang et al., 2011, Uemura et al., 2012, Ikeda et al., 2014 et Pomp et al., 2008).

Cependant, de telles approches souffrent toujours d'un faible rendement, d'un manque de pureté des cellules de Schwann différenciées, d'un processus de différenciation complexe et chronophage et d'un manque de fonctionnalité.

Tableau 5 : Liste des publications qui décrivent la différenciation en cellules de la crête neurale et en cellules de Schwann à partir de cellules souches pluripotentes

Les cases grises indiquent que les conditions non pas été définies ou rapportées.

Auteur	Source	Conditions de culture	Purification	Cytokine induction Schwann	Marqueurs	Schwann fonctionnalité	Schwann marqueurs	tératome
Kawaguchi 2010	Mouse ES cells	EB formation + N2 + B27 + RA + Lif + FGF8b Forced Sox10 expression	Sox10	FGF2 BMP4 GNDF	GFAP			
Mizuseki 2003	Mouse/primate ES cells	SDIA (P6) + BMP4						
Motohashi 2007	Mouse ES cells	ST2 + dexamethason + FGF2 + Cholera toxin + ET3 + ATRA	C-kit+/CD45-	BMP2 NRG1	GFAP			
Rathjen 2002	Mouse ES cells	1) Neuroectoderm culture +MEDII 2) Staurosporine + FGF2		FGF2 EGF Laminin PDGF	GFAP			
Cui 2008	Mouse ES cells	EB formation				Nerve injury model (rat)	S100β	None
Lee 2007	Human ES cells	1) SDIA (MS-5) + SHH + FGF8 + BDNF 2) FGF2 + AA + BDNF	P75+/HNK1+	CNTF NRG1 dbcAMP	S100β GFAP (8%) MBP			
Pomp 2005	Human ES cells	SDIA (P6)						
Pomp 2008	Human ES cells	SDIA (P6) Neurosphère FGF2			GFAP			
Zhou 2008	Human ES cells	EB formation	Frizzled3+/ Cad11+	IGF1 NRG1	GFAP			
Jiang 2009	Human ES cells	SDIA (P6)	P75+		GFAP (10%) MBP			
Ziegler 2011	Human ES cells	SDIA (P6) Neurosphère FGF2		NRG1 FSK FGF2 AA	GFAP S100β (60%) P75 P0 PMP22 MBP PLP	DRG co-culture	GFAP	
Uemura 2012	Mouse iPS cells	EB formation + homone mix (MHM) + FGF2 Neurosphère				Conduit, nerve injury model (mouse)	S100β GFAP	None
Ikeda 2013	Mouse iPS cells	EB formation + homone mix (MHM) + FGF2 Neurosphère				Conduit, nerve injury model (mouse)	S100β	
Okawa 2013	Mouse iPS cells	SDIA (P6) FGF2	P75+			Intramuscular transplantation (mouse)	S100β	None
Ma 2014 (Unpublished)	Mouse iPS cells	EB formation + SHH + FGF8 + BDNF Neural crest induction : FGF2 + AA + BDNF		NRG1 FSK FGF2	CNPase Oct6 (50%)			
Wang 2011	Human iPS cells	EB formation, EGF + FGF2, neural rosettes, neurosphères	P75+	CNTF NRG1 dbcAMP	GFAP S100β	Conduit, nerve injury model (rat)	S100β	None
Liu 2012	Human iPS/ES cells	EB formation + B27, FGF2 + Rock inhibitor + AA + PA6 conditioned medium	P75+	NRG1	GFAP (75%) S100β (85%) P75 Sox9 ErbB3 PLP1 PMP22	DRG co-culture	MBP	
Kreitzer 2013	Human iPS cells	SB435142 + LDN193189 Matrigel, EGF + FGF2			GFAP			
Menendez 2013	Human iPS/ES cells	SB435142 + GSK3 inhibitor FGF2 + IGF1 + NRG1						

V. Objectifs

A. Modélisation pathologique de la neurofibromatose de type 1

La neurofibromatose 1 (NF1) est la plus fréquente des maladies génétiques autosomiques dominantes. Parmi la pléthore de symptômes, les plus pathognomoniques restent les manifestations cutanées que sont les tâches café-au-lait, les neurofibromes et les lésions osseuses. De manière générale, les symptômes associés à la pathologie ne sont pas fatal mais imputent grandement le patient dans sa vie quotidienne, d'un point vu aussi bien esthétique que pratique.

L'équipe a montré en 2015, qu'il était possible de de phénocopier le phénotype hyperpigmentaire à partir des cellules souches pluripotentes portant la mutation causale *NF1*. Ce qui leur a également permis de mettre en évidence les mécanismes moléculaires associés. Ces résultats ont démontré que les cellules souches pluripotentes NF1 pouvaient permettre la modélisation pathologique de la NF1. C'est la raison pour laquelle je me suis intéressée aux autres phénotypes associés à la pathologie. L'objectif principal de cette thèse a été de modéliser les défauts osseux associés à NF1 à partir des cellules souches pluripotentes et plus particulièrement à partir des hiPSC. Afin de mettre en place un modèle humain in vitro du phénotype osseux, j'ai utilisé la capacité des cellules souches pluripotentes humaines à se différencier théoriquement en tous les types cellulaires de l'organisme dont les cellules du tissu osseux et plus spécifiquement en ostéoblastes.

Notre stratégie scientifique a consisté à utiliser les cellules mésenchymateuses dérivées d'hiPSC saines et pathologiques afin d'obtenir des ostéoblastes et d'observer une différence phénotypique. Les lignées hiPSC NF1 ont été obtenues à partir de fibroblastes de neurofibromes de patients présentant des mutations différentes. Puis différenciées en cellules souches mésenchymateuses avant d'être dérivées en ostéoblastes. J'ai également fait le choix d'établir des lignées CRISPR isogéniques afin d'isoler le phénotype. Cette méthode a permis de mettre en évidence une anomalie de différentiation des cellules souches mésenchymateuses NF1 en ostéoblastes. Je me suis ensuite intéressée aux mécanismes moléculaires impliqués et associés à ce phénotype et j'ai testé des molécules (statines) utilisées dans certaines pathologies osseuses pour tenter de réverser le phénotype. Les résultats préliminaires étant prometteurs à la fois sur les lignées isogéniques obtenues par CRISPR et sur les lignées dérivées de patients NF1, un criblage thérapeutique sera mis en place à la suite de cette thèse.

B. Mise au point d'un protocole de différenciation des CSP en cellules de Schwann

On retrouve dans la littérature de nombreux protocoles de différenciation des CSP en cellules de Schwann animales ou humaines. Cependant la validation de la fonctionnalité des cellules différenciées, à savoir leur capacité à former de la gaine de myéline autour des axones des neurones est très souvent difficile à atteindre.

En se basant sur les différents protocoles existants, j'ai tenté de développer un nouveau protocole qui réponde aux différents critères de caractérisation des cellules de Schwann. Le temps de différenciation des CSP en cellules de Schwann se limite à une trentaine de jours avant de pouvoir les mettre en contact avec des cellules neuronales afin d'établir une interaction Schwann-neurone. Etant donné que j'ai utilisé les cellules souches pour la différenciation des cellules de Schwann, il était intéressant de valider leur capacité à interagir avec des motoneurones également issus de CSP.

En effet, je disposais des forces nécessaires au sein du laboratoire pour différencier des hiPSC en motoneurones. Dans un souci de développer un modèle le plus proche possible de la physiologie humaine, j'ai différencié des motoneurones et des cellules de Schwann à partir de lignées d'hiPSC. Les cellules de Schwann et les motoneurones ont été mis en co-culture afin de vérifier si les cellules de Schwann différenciées à partir d'hiPSC pouvaient interagir avec les motoneurones et si elles pouvaient s'enrouler autour des axones de ces derniers. Les résultats préliminaires obtenus sont prometteurs et permettent d'envisager à plus long terme la possibilité de médecine personnalisée concernant les pathologies liées aux cellules de Schwann.

VI. Matériel et Méthodes

Génération et culture des hiPSC

Quatre lignées humaines de cellules hiPSC ont été dérivées par transfection de fibroblastes cutanés adultes en utilisant les gènes hOCT4, hSOX2, hKLF4, hL-MYC et hLIN28 (Addgene, Ca, USA, plasmides 27 076, 27 077, 27 078 et 27 080; Okita et al., 2011).:

- deux fibroblastes primaires de type sauvage (Phenocell, Grasse, France)
- deux provenant de neurofibromes plexiformes (Unité de recherche EA7331, Institut Cochin, Paris)

Les lignées hiPSC ont été amplifiées jusqu'au 10ème passage avant différenciation. Le contrôle qualité a été validé par caryotypage, immunofluorescence, cytométrie en flux et RT-qPCR.
Les deux lignées hiPSC distinctes Str-PC063 (XY) et Str-PC064 (XX), respectivement NF1-1 et NF1-2, portent une mutation hétérozygote NF1 (c.1721 + 3A> G et c.2412delT) conduisant à l'apparition d'un codon stop dans le gène NF1. Les lignées cellulaires témoins PCi1432 (XY; Phenocell), renommée WT1 et PC069 (XX; Phenocell), renommée WT2. Les hiPSC sont cultivées sur une matrice xéno-free CellAdhere ™ Laminin-521 de mTeSR™ 1 (technologie StemCell) et incubées à +37 °C, 5% de CO2 jusqu'à confluence (pendant environ 2 à 7 jours) en changeant le milieu tous les 2 jours.

Différenciation en cellules mésenchymateuses

Pour la différenciation, les cellules hiPSC ont été ensemencées sur de la gélatine à 0,1% (Sigma) dans un milieu MSC composé de KO-DMEM (Invitrogen), 20% (vol/vol) de FBS (Sigma), 1% d'acides aminés non essentiels (Invitrogen), 1% Glutamax (Invitrogen), 0,1% de β-mercaptoéthanol (Invitrogen), 0,1% de pénicilline/streptomycine (Invitrogen) additionné de 1mM d'acide ascorbique 2-phosphate (Aa2-P) (Sigma) et 10ng/ml de FGF2. La différenciation, l'expansion et la maintenance ont été effectuées par le CompacT SelecT (Sartorius Stedim Biotech). A la confluence, les cellules sont passées dans le même milieu jusqu'à présenter une morphologie MSC classique. Toutes les caractérisations moléculaires de hiPS-MSC WT et hiPS-MSC NF1 ont été effectuées systématiquement après 4 semaines de différenciation soit après 4 passages cellulaires au robot.

Différenciation en ostéoblastes

Pour induire la différenciation ostéoblastique, les cellules hiPS-MSC WT et hiPS-MSC NF1 ont été ensemencées à 3000 cellules/cm2 dans un milieu de différenciation ostéogénique (kit StemMACS ™ OsteoDiff, Miltenyi) dans une plaque 12 puits. Le milieu de culture est changé tous les deux jours.

Coloration à la phosphatase alcaline (ALP) :

Après 10 jours de différenciation des hiPS-MSC dans le milieu ostéoblastique, la présence d'ALP dans les cultures a été analysée. La coloration de l'ALP a été effectuée en fixant les cellules dans de l'éthanol à 95% pendant 20 minutes, puis les cellules on été lavées avec du PBS et enfin les cellules ont été colorées avec une solution de substrat BCIP/NBT (SIGMA) pendant 10 min à +37°C, 5% de CO2. Les cellules ont ensuite été analysées au microscope.

Dosage de l'activité de la phosphatase alcaline :

Les cellules ont été cultivées pendant 1 semaine. Le milieu a été changé deux fois par semaine. L'activité de l'ALP est détectée à l'aide d'un test colorimétrique effectué avec le 1-Step™ PNPP Substrate Solution (ThermoFisher Scientific). Le PNPP (sel disodique de phosphate de p-nitrophényle) est un substrat largement utilisé pour la détection de la phosphatase alcaline dans les applications à base d'ELISA. La solution de PNPP combinée avec l'ALP présente dans les cultures provoque une réaction enzymatique qui colore en jaune la solution qui absorbe la lumière à 405 nm. Le dosage est effectué à l'aide du CLARIOstar® (BMG LABTECH).

Coloration au rouge alizarine :

La minéralisation des cellules a été observée par coloration au rouge d'alizarine; après deux semaines de culture, les cellules ont été fixées 20 minutes avec de l'éthanol à 70%, puis lavées avec du PBS. Une solution de rouge d'alizarine (Millipore) a ensuite été ajoutée dans la plaque pendant 20 minutes supplémentaires. Les cellules ont ensuite été analysées au microscope.

Différenciation en adipocytes

Pour induire la différenciation en adipocytes, les cellules hiPS-MSC WT et hiPS-MSC NF1 ont été ensemencées à 3000 cellules/cm2 dans un milieu de différenciation pour adipocytes (kit StemMACS™ AdipoDiff, Miltenyi) dans une plaque 12 puits. La coloration Bodipy a été

réalisée après une semaine de culture en fixant les cellules avec du tampon de perméabilisation FCM (Santa Cruz Biotechnology) pendant 5-10 min, puis les cellules ont été lavées dans du PBS. Enfin les cellules ont été colorées avec une solution de Bodipy (1/100) et Hoescht (1/3000) pendant 20min à température ambiante. Les images ont été prises à l'aide de la plate-forme HCS (High Content Screening) CellInsight™ CX5 (ThermoFisher Scientific). Le logiciel détecte le nombre de cellules totales grâce au marquage Hoescht puis analyse le nombre de cellules positives au Bodipy permettant de quantifier le nombre de cellules différenciées en adipocyte.

Extraction ARN et RT-qPCR

L'ARN total a été extrait en utilisant le kit RNeasy Mini (Qiagen) selon le protocole du fabricant, et transcrit de manière inverse en utilisant le kit de transcription inverse SuperScriptIII (Invitrogen).
La RT-qPCR a été réalisée en utilisant le système de PCR numérique QuantStudio (LifeTechnologies). Les analyses ont été effectuées sur 3 triplicats techniques pour chaque expérience.
La quantification de l'expression génique est basée sur la méthode du Δ-cycle threshold (ΔCt) et a été normalisée à l'expression de CREBBP, SRP72 et 18S. Les amorces de PCR sont listées dans le Tableau 6.

Western Blot

Les cellules ont été lysées dans du tampon de lyse RIPA (Sigma-Aldrich) additionné d'anti-protéases (Sigma-Aldrich) et d'anti-phosphatase (Roche). L'électrophorèse SDS/PAGE a été réalisée en utilisant un gel électrophorèse acrylamide pré coulé BIO RAD 4-15% Criterion TGX (BIORAD).
Les protéines ont été transférées sur des membranes de nitrocellulose en utilisant le système de transfert Trans-Blot® Turbo™ (BIORAD). Après incubation avec des anticorps primaires spécifiques (Tableau 7), les membranes ont été lavées au PBS. Les membranes ont été incubées avec des anticorps secondaires couplés HRP. La révélation a été effectuées en utilisant les réactifs de détection de transfert Western Amersham ECL Plus (GE Healthcare). La quantification a été effectuée à l'aide du logiciel ImageJ.

Cytométrie en flux

Les cellules ont été détachées des plaques de culture, fixées et perméabilisées avant marquage avec des anticorps spécifiques aux MSC et aux ostéoblastes (Tableau 7). Des contrôles spécifiques à l'isotype ont été effectués sans anticorps primaire. Les cellules ont été analysées avec l'analyseur MACSQuant® (Myltenyi Biotec ©). 30 000 événements ont été analysés pour chaque expérience.

Tests de prolifération

IncuCyte® :

Les hiPS-MSC WT et NF1 sont ensemencées dans des plaques de cultures 12 puits à 4000 cellules/cm2, puis incubées à +37 °C, 5% de CO2 dans l'appareil IncuCyte® qui permet l'analyse en temps réel de cultures cellulaires. Le milieu de cellules est changé tous les deux jours. L'IncuCyte® permet l'acquisition d'images 24h sur 24h des cellules vivantes. Des photos ont été prises toutes les 2h pendant 10 jours puis analysées par l'appareil afin de pouvoir établir une cinétique de confluence de chaque lignée au cours de ces 10 jours de culture.

Marquage nucléaire des cellules au DAPI

Les cellules sont ensemencées dans des plaques de cultures 12 puits à 4000 cellules/cm2 pour chaque lignée. Le milieu de culture est changé tous les deux jours pendant une semaine. Une heure après ensemencement (D0), les cellules de la première plaque sont fixées à la PFA 4% pendant 10 min puis colorées avec une solution PBS/DAPI (1/3000e) pendant 5 min pour marquer les noyaux. Après lavage au PBS, les cellules sont analysées à l'aide d'un imageur CellInsight CX7 de Thermofischer. Tous les deux jours, une plaque de cellules de chaque lignée est fixée à la PFA 4%, marquée au DAPI puis analysée à l'imageur.

Pré-criblage moléculaire

AZD8055 a été fourni par Selleckchem. PD0325901 et Simvastatin ont été achetés chez Calbiochem. L'atorvastatine provient de chez TOCRIS. Les molécules ont été dissoutes dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) et ont été ajoutées aux milieux de culture ostéoblastiques à des concentrations finales ne contenant pas plus de 0,1% de DMSO afin de ne pas induire une cytotoxicité. Les gammes de concentrations ont été choisies en

fonction de la littérature : la simvastatine et l'atorvastatine ont été testées à 10 µM – 1 µM – 0,1 µM – 0,01 µM – 0,001 µM – 0,0001 µM. L'AZD8055 a été testé à 0,16 µM – 0,08 µM – 0,04 µM – 0,02 µM – 0,01 µM – 0,005 µM. Pour finir, le PD0325901 a été testé à 2 µM – 1 µM – 0,5 µM – 0,25 µM – 0,125 µM – 0,0625 µM. Les quatre lignées hiPS-MSC ont été ensemencées à 3000 cellules/cm2 en triplicat pour chaque concentration sur des plaques 96 puits et les cellules ont été lancées en différenciation ostéoblastique. Les cellules ont été traitées avec la molécule ou avec 0,1% de DMSO en tant que contrôle négatif. Tous les deux jours, à chaque changement de milieu osteoblastique, la molécule testée était ajoutée extemporanément au milieu.

Co-culture hiPS-Schwann et hiPS-Motoneurone

Les motoneurones ont été différenciés à partir des hiPS-PC069 et fournis par la société Phenocell. Les cellules de Schwann ont été différenciées à partir des hiPS-PCi1432. Les hiPS-Schwann sont ensemencées sur des Lab-Tek® 2 puits à 25 000 cellules/cm2. Le milieu de culture est changé tous les deux jours et lorsque les cellules sont arrivées à confluence, les hiPS-Schwann sont ensuite marquées au CFSE. Le CFSE est capable de diffuser passivement dans les cellules. Il peut être conservé dans la cellule pendant une période extrêmement longue. De plus, une fois que le colorant a été incorporé dans la cellule, il n'est pas transféré aux cellules adjacentes. Les cellules sont donc incubées pendant 20 min à température ambiante et à l'abri de la lumière puis lavées au PBS. Un jour après l'incorporation du CFSE dans les cellules hiPS-Schwann, les hiPS-Motoneurones sont ensemencées sur le tapis des cellules hiPS-Schwann à 50 000 cellules/cm2 dans un milieu spécifique aux motoneurones. La co-culture est entretenue pendant 7 jours avec un changement de milieu tous les deux jours. A l'issue des 7 jours, la co-culture est fixée à la PFA 4% pendant 5 min puis marquée avec Tuj1 (1/1000e). Les cellules sont ensuite analysées en microscopie confocale (ZEISS LSM 880). Les images en 3D ont été obtenues par le principe de z-stack qui consiste à l'empilement de prise de vues successives de la même image à des profondeurs de l'axe « z » différentes. Les images obtenues ont ensuite été traitées à l'aide du logiciel Carl Zeiss ZEN.

Immunofluorescence

Pour les analyses d'immunofluorescences, les cellules ont été fixées à la PFA 4% pendant 5 min puis lavées trois fois au PBS. Une étape de perméabilisation est effectuée avec une solution de PBS/Triton10X pendant 15 min suivie d'une étape de saturation avec une

solution de PBS/BSA5% pendant 1h. Les cellules sont ensuite incubées avec les anticorps d'intérêts (Tableau 7) pendant 1h à température ambiante. Les anticorps secondaires sont ensuite incubés pendant 1h à température ambiante. Les images sont prises par microscopie à épifluorescence.

Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées en one-way ANOVA d'un test de comparaison multiple de Dunnett. Les valeurs de p <0,05 ont été considérées comme significatives. Les résultats sont exprimés mean±SD, normalisés à l'expression dans le contrôle MSC dérivé de la lignée WT.

Tableau 6 : Séquences des primers utilisés pour la RT-qPCR

Gene	**Sequence**	
	Forward	Reverse
GATA6	AAAGACTTGCTCTGGTAATAGC	GGCTGTAGGTTGTGTTGTGG
PAX6	AGTGAATCAGCTCGGTGGTGTCTT	TGCAGAATTCGGGAAATGTCGCAC
T (Brach)	TAGCGAGAAATATGCCGAGGAG	GAGCTGCGTGATCCGATGG
HAND1	TCAAGGCTGAACTCAAGAAGG	CGGCTCACTGGTTTAACTCC
NODAL	AGAAGATGTGGCAGTGGATGG	GCTCTGTGTCGGGCTTTGG
NF1	GCACTGTACGGTCCTTGCAA	ATGGAGTGCATGAGACCACTGT

RUNX2		
COL1A1	CCCCTGGAAAGAATGGAGAT	CCATCCAAACCACTGAAACC
ALP	CCACGTCTTCACATTTGGTG	AGACTGCGCCTGGTAGTTGT
SOX10	CTTGGGACACGGTTTTCCACT	AACGCCCACCTCCTCGG
MBP	GCAGAGCGTCCGACTATAAAT	ACTACTCTTCCTCCCAGCTTA
MPZ	ACTGGATGCGCTCTTTGAA	TGCCATTTCGATCTTCCACTAT
ERBB3	CTGGTATTGGTTTCTCAGCATCG	GGTGCTGGGCTTGCTTT
KROX20	AGCAAAGCTGCTGGGATATG	CTTTGACCAGATGAACGGAGTG
GFAP	CCAGCGCCTCCTGATAAC	CAGTTGCAGTCCTTGACCT
S100	TGTCCAGTGTTTCCATGACTT	GCTCATCAACAATGAGCTTTCC
CAD19	GAGATGTCTCCAGAAGGAACATTAG	CTGGCCTTGAAGTAAGCTGTAG
PAX3	AGTTCCATCAGCCGCATC	TTCTTCTCGCTTTCCTCTGC

PAX7	CAAGATTCTTTGCCGCTACC	TTCAGTGGGAGGTCAGGTTC
CD56	TCCTCCACCCTCACCATCTA	CACACAATCACGGCATCTTC
MYP5	AACCCTCAAGAGGTGTACCAC	AGGACTGTTACATTCGGGCAT
MYOD	GGGGCTAGGTTCAGCTTTCT	CTACATTTGGGACCGGAGTG
MYOG	TAAGGTGTGTAAGAGGAAGTCG	CCACAGACACATCTTCCACTGT
MRF4	GGAGCGCCATCAGCTATATTG	ATCCGCACCCTCAAGATTTTC
DESMINE	TACATTTGGGACCGGAGTG	TCACCGTCTTCTTGGTATGGA
DYSTROPHINE	GTGGGAAGAAGTAGAGGACTGT	TCCTGTAGGTCACTGAAGAGGT
TITINE	TTCTGCTGGCCTAAGCTCAC	ATGGTTTCCCGGGTGACATC
CREBBP	GAGAGCAAGCAAACGGAGAG	AAGGGAGGCAAACAGGACA
SRP72	TCTGCCTCTACAAGTAACATCAT	CTCATCACCAGCCACCTT
18S	GAGGATGAGGTGGAACGTGT	TCTTCAGTCGCTCCAGGTCT

Tableau 7 : Liste des anticorps utilisés

Name	Species	Reference
NF1	Rabbit	sc-67 (Santa Cruz Biotechnology)
TRA-1-81	Mouse	330706 (Biolegend)
SSEA4	Mouse	330406 (Biolegend)
NANOG	Rabbit	ab9220 (Abcam)
SOX2	Rabbit	651902 (Biolegend)
OCT4	Rabbit	ABD116 (Millipore)
mTOR (7C10)	Rabbit	2983 (Cell Signaling Technology)
Phospho-mTOR (Ser2448) (D9C2)	Rabbit	5536 (Cell Signaling Technology)
P44/42 MAPK (Erk1/2)	Rabbit	9102 (Cell Signaling Technology)
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	Rabbit	9101 (Cell Signaling Technology)
	Rabbit	4691 (Cell Signaling Technology)

Akt (pan) (C67E7)		
Phospho-Akt (Ser473) (D9E)	Rabbit	4060 (Cell Signaling Technology)
MEK1/2	Rabbit	9122 (Cell Signaling Technology)
Phospho-MEK 1/2 (Ser217/221)	Rabbit	9121 (Cell Signaling Technology)
β-actine, HRP conjugate (AC-15)	Mouse	A3854 (Sigma)
Polyclonal Rabbit Anti-Goat Immunoglobulins/HRP	Rabbit	P0449 (DAKO)
CAD19	Rabbit	11473-1-AP (Proteintech)
Tuj1	Mouse	MAB1195 (R&Dsystem)
MBP smi94	Mouse	836502 (Biolegend)
ALP-PE	Mouse	FAB1448P (R&Dsystem)
S100	Rabbit	Z0311 (DAKO)
CD29 (TS2/16)	Mouse	303016 (Biolegend)

CD44	Mouse	550989 (BD Pharmingen)
CD73 (AD2)	Mouse	344006 (Biolegend)
CD166	Mouse	343904 (Biolegend)
α-actinine	Mouse	A5060 (Sigma)
Desmine	Mouse	NCL-L-Des-DerII (Novocastra)

VII. Résultats

A. Modélisation pathologique de la neurofibromatose de type 1

1. Contexte de l'étude

Dans la neurofibromatose de type 1, les anomalies osseuses se caractérisent par une ostéoporose généralisée, une dysplasie de l'aile sphénoïdale, une dysplasie des os longs et des scolioses.
Dans le cas des dysplasies osseuses sur les os longs, le tibia est le site préférentiellement touché dans NF1. En effet, les patients atteints présentent une courbure anormale du tibia qui augmente le risque de fractures et qui conduit à une pseudarthrose non cicatrisante (Alwan et al., 2007; Elefteriou et al., 2009).

Aujourd'hui la pathogénie de ces symptômes handicapants est encore incertaine. Cependant, certaines études animales suggèrent que les problèmes osseux seraient dus à une diminution de la formation osseuse (Yu et al., 2005; Li et al., 2009) et à une augmentation de la résorption osseuse (Yang et al., 2006; Li et al., 2009).

De nombreux modèles murins ont été établis pour NF1 mais, comme souvent, ils ne récapitulent pas de façon complète les phénotypes humains (Jacks et al., 1994 ; Lakkis et al., 1998).

Pour surmonter ces problèmes, certaines approches permettant la création de plusieurs modèles de souris NF1 conditionnelles «knock-out» qui reproduisent de nombreux symptômes (Reilly et al. 2000 ; Zhu et al., 2005 ; Parada et al., 2005 ; Kolanczyk et al., 2008 ; Lee et al., 2010 ; Wang et al., 2011) ont été développées .
Seul le modèle de souris NF1 (*Nf1col2* -/-) présente un spectre étendu des lésions osseuses observées chez les patients NF1 (Wang et al., 2011).

Dans cette partie d'étude, j'ai avancé l'hypothèse que le développement d'ostéoprogéniteurs dérivés d'hiPS pourrait constituer un outil performant pour la compréhension des symptômes et l'analyse des mécanismes moléculaires de cette pathologie. La première étape a été de modéliser le phénotype osseux dans NF1 à partir de CSPh. La neurofibromine joue un rôle essentiel dans la modulation de la différenciation des ostéoblastes à partir des cellules souches mésenchymateuses (MSC). En effet, Wu et al., montre que les MSC *Nf1*+/- provenant de souris *Nf1*+/- ont une prolifération accrue par rapport aux MSC de types sauvages (WT) (Wu et al., 2006). Ils ont aussi constaté que les MSC *Nf1*+/- ont une capacité altérée de différenciation en ostéoblastes par coloration à la

phosphatase alcaline. La différenciation en ostéoblastes des MSC *Nf1*+/- est en adéquation avec la réduction de l'expression de marqueurs ostéoblastiques tels que l'ostéocalcine et l'ostéonectine. Leurs résultats suggèrent donc que la neurofibromine joue un rôle crucial dans la modulation de la différenciation des MSC en ostéoblastes et que le défaut de différenciation des ostéoblastes pourrait contribuer au moins en partie aux anomalies osseuses observées chez les personnes atteintes de NF1 (Li et al., 2017 ; Wu et al., 2006).

L'objectif de cette partie de thèse était donc de vérifier si les résultats observés chez les souris *Nf1*+/- étaient reproductibles avec des MSC dérivées d'hiPS-NF1.

Dans cette étude, j'ai utilisé des lignées d'hiPS dérivées de fibroblastes de deux patients NF1 porteurs de deux mutations différentes pour les différencier en ostéoblastes afin d'établir un nouveau modèle du déficit d'ostéogenèse NF1.

La mutation de la première lignée d'hiPS NF1 (hiPS-NF1-1) est une délétion dans l'exon 15 (c.1721+3A>G (NM_000258.1) qui modifie le site d'épissage de l'intron, ce qui se traduit par un codon stop prématuré 13 acides aminés en aval de cet exon.
La seconde lignée d'hiPS NF1 (hiPS-NF1-2) présente une délétion du 3ème nucléotide (T) de l'exon 21 (c.2412del, (NM_000258.1), qui conduit à un codon stop prématuré 16 acides aminés en aval de cet exon (Tableau 8). J'ai également utilisé deux lignées d'hiPS sauvages dérivées de fibroblastes. Toutes les lignées d'hiPS ont été établies au sein de la société Phenocell (Fig. 19).

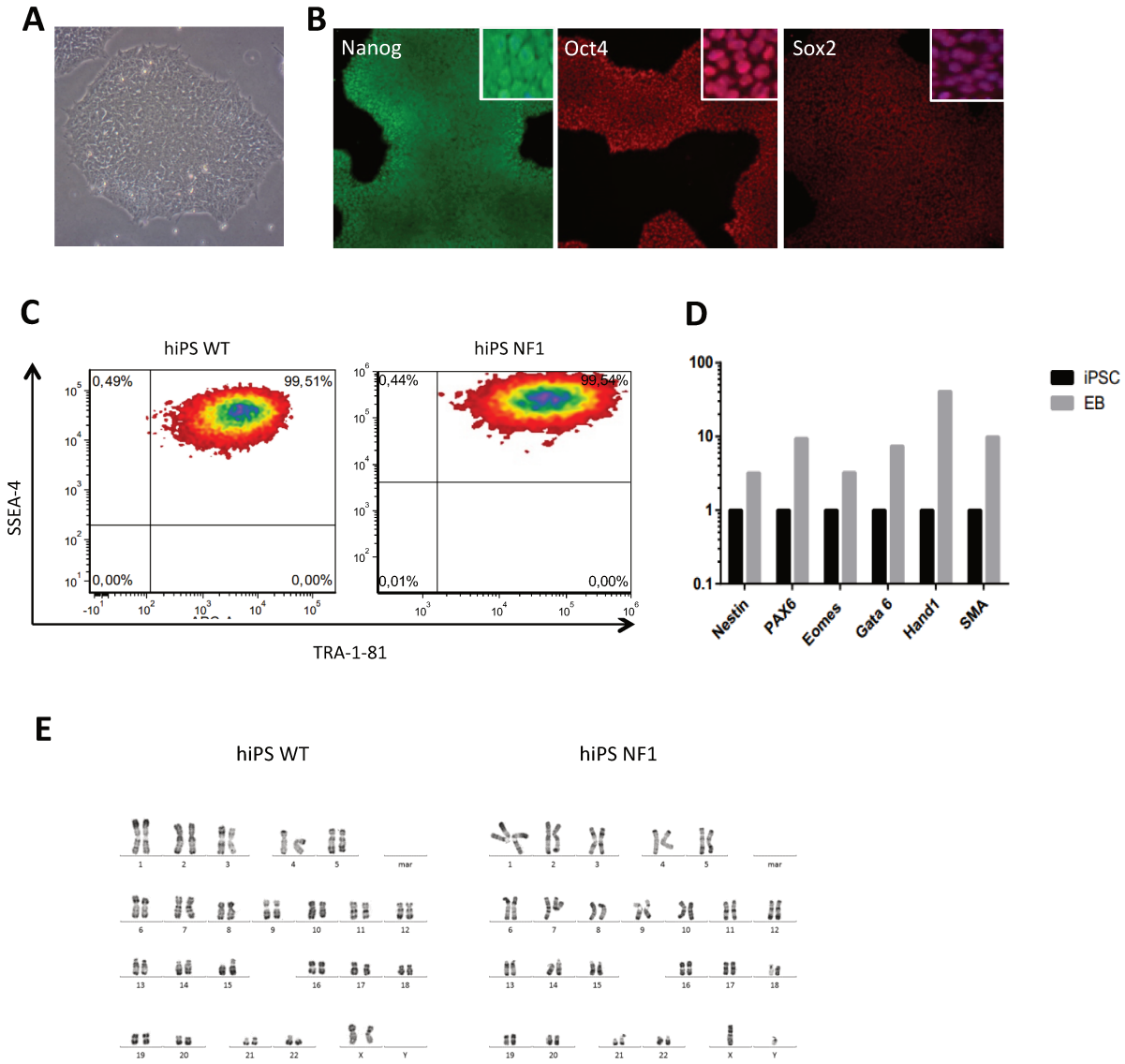


Figure 19 : Caractérisation des hiPS dérivées de fibroblastes

(A) Morphologie d'une colonie d'hiPS. (B) Immunofluorescence des colonies d'hiPS pour les marqueurs de pluripotence NANOG, OCT4 et SOX2. (C) Cytométrie en flux des hiPS pour les marqueurs de pluripotence SSEA-4 et TRA-1-81. (D) Caractérisation des corps embryoïdes. (E) Caryotype des lignées d'hiPS générées.

Tableau 8 : Caractéristiques des mutations des lignées NF1

Patients	Sexe	Mutation	Resultat	Tableau clinique
NF1-1	Homme	Exon 15 c.1721 + 3A>G	p.Ala548Leufs*13 Apparition d'un codon stop	• Multiples neurofibromes cutanés • Neurofibrome plexiforme du sein gauche avec pigmentation en regard • Suspicion de dysplasie de la grande aile du sphénoïde • Scoliose modérée • Possibilité de développement de pseudarthrose tibiale
NF1-2	Femme	Exon 21 c.2412delT	p.Ala805Leufs*16 Apparition d'un codon stop	• Neurofibrome plexiforme de l'hémiface • Scoliose modérée • Dysplasie de la grande aile du sphénoïde

2. Induction des CSPh en cellules souches mésenchymateuses in vitro.

a) Différenciation au robot des CSPh en MSC.

Les cellules souches mésenchymateuses (MSC) sont impliquées dans la régénération osseuse après une blessure. Ce sont des cellules pluripotentes qui ont le potentiel de se différencier en un nombre limité de types cellulaires comprenant les adipocytes, les ostéoblastes et les chondrocytes. Dans le but d'étudier les conséquences de la perte d'expression de la neurofibromine sur l'ostéogénèse, j'ai différencié des CSPh en MSC.

Afin d'établir des lignées de cellules MSC les plus homogènes possible, j'ai décidé de standardiser le processus de différenciation des hiPS en MSC en utilisant l'automate de culture cellulaire CompacT SelecT™ de Sartorius pour la différenciation et l'amplification des cellules.

Deux lignées saines hiPS qui serviront de contrôles cellulaires et deux lignées NF1 d'hiPS sont différenciées dans l'automate. Pour cela, les cellules hiPS sont ensemencées à deux densités différentes (25 000 cellules/cm2 et 45 000 cellules/cm2) dans des flacons de culture préalablement gélatinés pour optimiser le départ en différenciation de cellules mésenchymateuses. Les cellules sont dès lors cultivées avec un milieu de culture spécifique à la différenciation mésenchymateuse contenant du FGF2 et de l'AA2P (acide ascorbique 2-phosphate). Lorsque les cellules atteignent la confluence, au bout d'une dizaine de jours, le premier passage au robot est effectué (Fig. 20).

Les cellules sont dissociées à la Trypsine-EDTA (0,05%) et réensemencées à 4000 cellules/cm2 dans de nouveaux flacons. Pendant les trois passages suivant, les cellules seront à chaque fois réensemencées à 4000 cellules/ cm2. Après quatre passages au robot, les cellules sont cryoconservées à 1 million de cellules par tube de congélation. Pour chaque lignée, environ 90 tubes de cellules ont été congelés. Au cours de la différenciation des cellules au robot, la morphologie et la prolifération des cellules sont suivies grâce à la présence d'un module IncuCyte© (Sartorius), qui permet l'analyse de la confluence cellulaire.
Les cellules différenciées sont homogènes et présentent une morphologie de type fibroblastique (Fig. 21 et données non montrées). L'analyse de la prolifération des cellules sur une semaine (à l'aide de l'IncuCyte© qui enregistre la confluence cellulaire) montre que les hiPS-MSC NF1 semblent atteindre la confluence plus rapidement que les hiPS-MSC WT (Fig. 22).

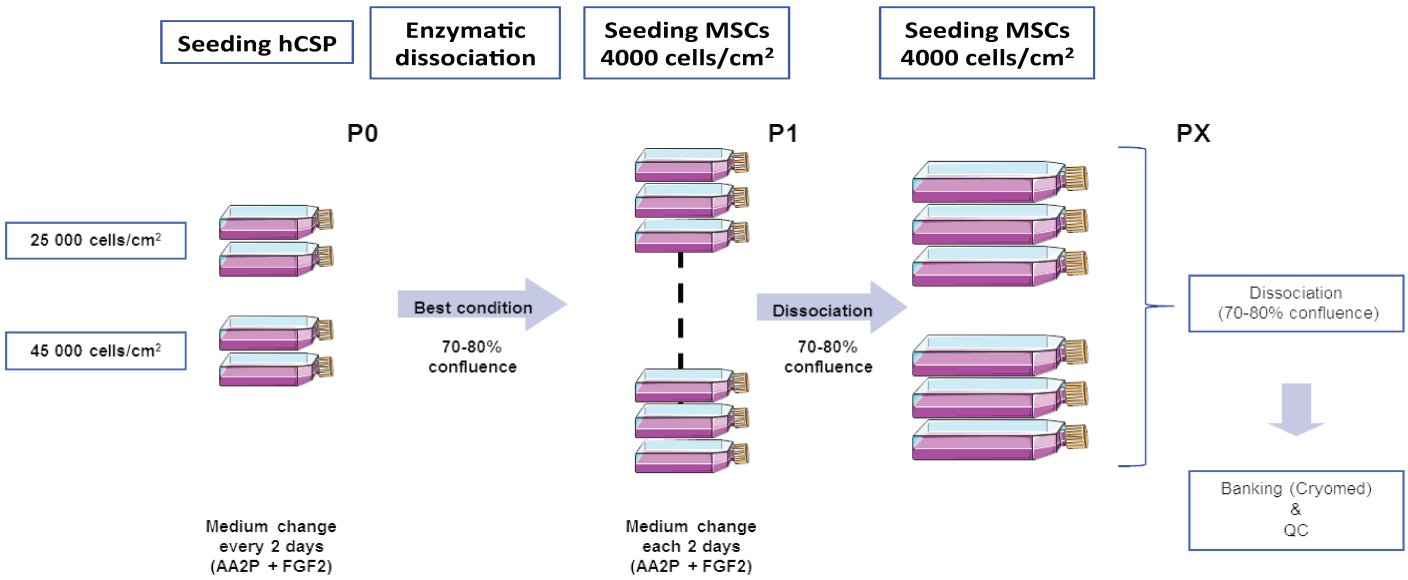


Figure 20 : Schéma du protocole de différenciation au robot TAP Biosystem des hCSP en cellules mésenchymateuses utilisées pour la modélisation pathologiques de la NF1.

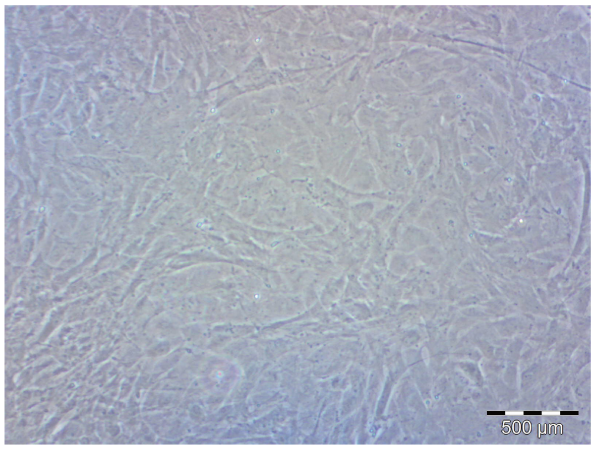


Figure 21 : Morphologie des cellules hiPS WT-1 différenciées en MSC à l'aide du robot CompacT SelecT

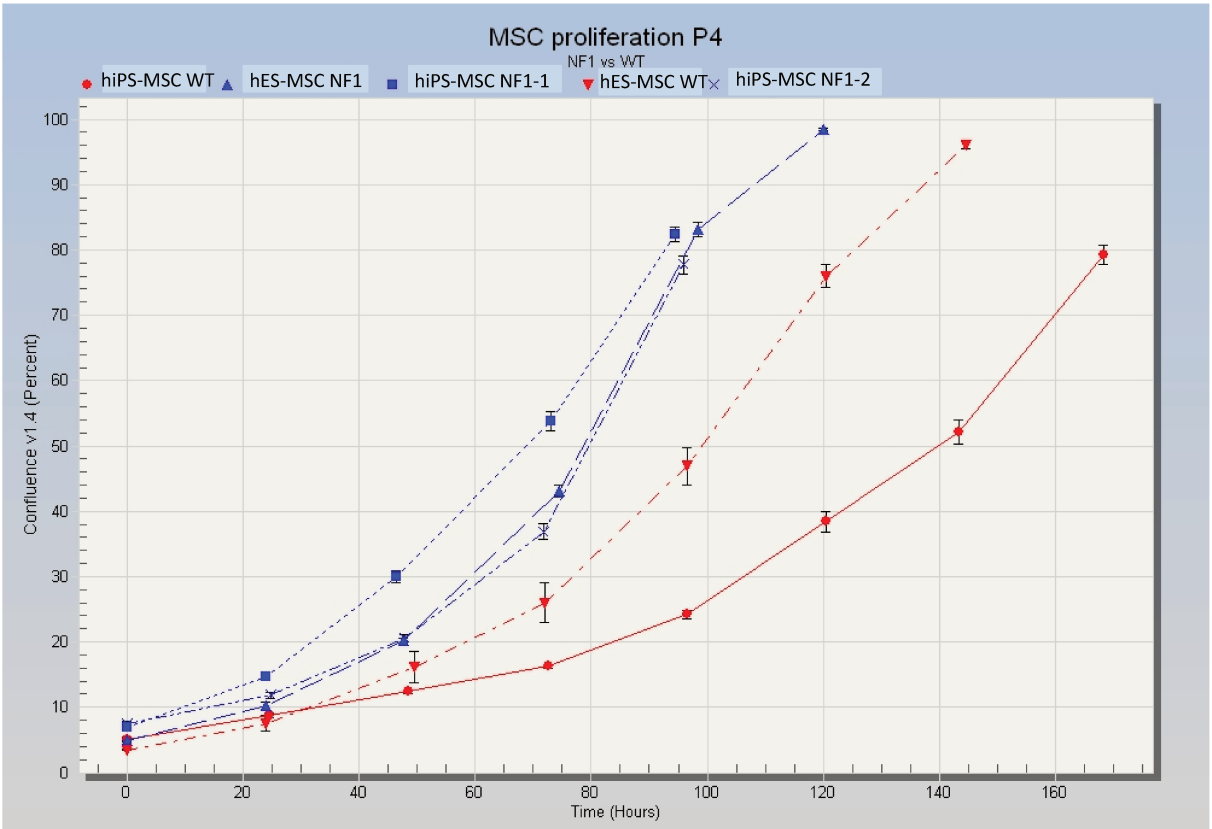


Figure 22 : Analyse de la prolifération de cellules hiPS-MSC après le dernier passage au CompacT SelecT

La confluence des cellules hiPS-MSC sauvage (hiPS-MSC WT), de cellules ES-MSC sauvages (hES-MSC WT), de cellules ES-MSC NF1 (hES-MSC NF1) et deux lignées hiPS- MSC NF1 (hiPS-MSC NF1-1 et hiPS-MSC NF1-2) est enregistrée à l'aide de l'IncuCyte@ intégré dans le robot.

b) Contrôle Qualité des hiPS-MSC

Pour caractériser les MSC selon une norme commune, le comité des cellules souches mésenchymateuses et tissulaires de la Société internationale de thérapie cellulaire (ISCT) a défini les critères requis pour définir les MSC humaines (Dominici et al., 2006).

1. Les MSC doivent adhérer au plastique lorsqu'elles sont maintenues dans des conditions de culture standard.
2. Les MSC doivent exprimer les molécules de surfaces suivantes : CD29 (Integrin beta-1 }, CD44 (ce/1-surface glycoprotein}, CD73 (ecto-5'-nucleotidase}, et CD166 (type I transmembrane glycoprotein).
3. Les MSC doivent se différencier in vitro en ostéoblastes, adipocytes et chondroblastes. Nos quatre lignées ont donc été analysées pour ces différents critères.

- Analyse morphologique

Après décongélation d'un tube des banques de hiPS-MSC obtenues précédemment, les cellules (hiPS-MSC WT et hiPS-MSC NF1) sont remises en culture. Après une dizaine de jours on constate que les cellules différenciées sont homogènes et présentent une morphologie de cellules mésenchymateuses (cellules d'apparences fibroblastiques) (Fig. 23).

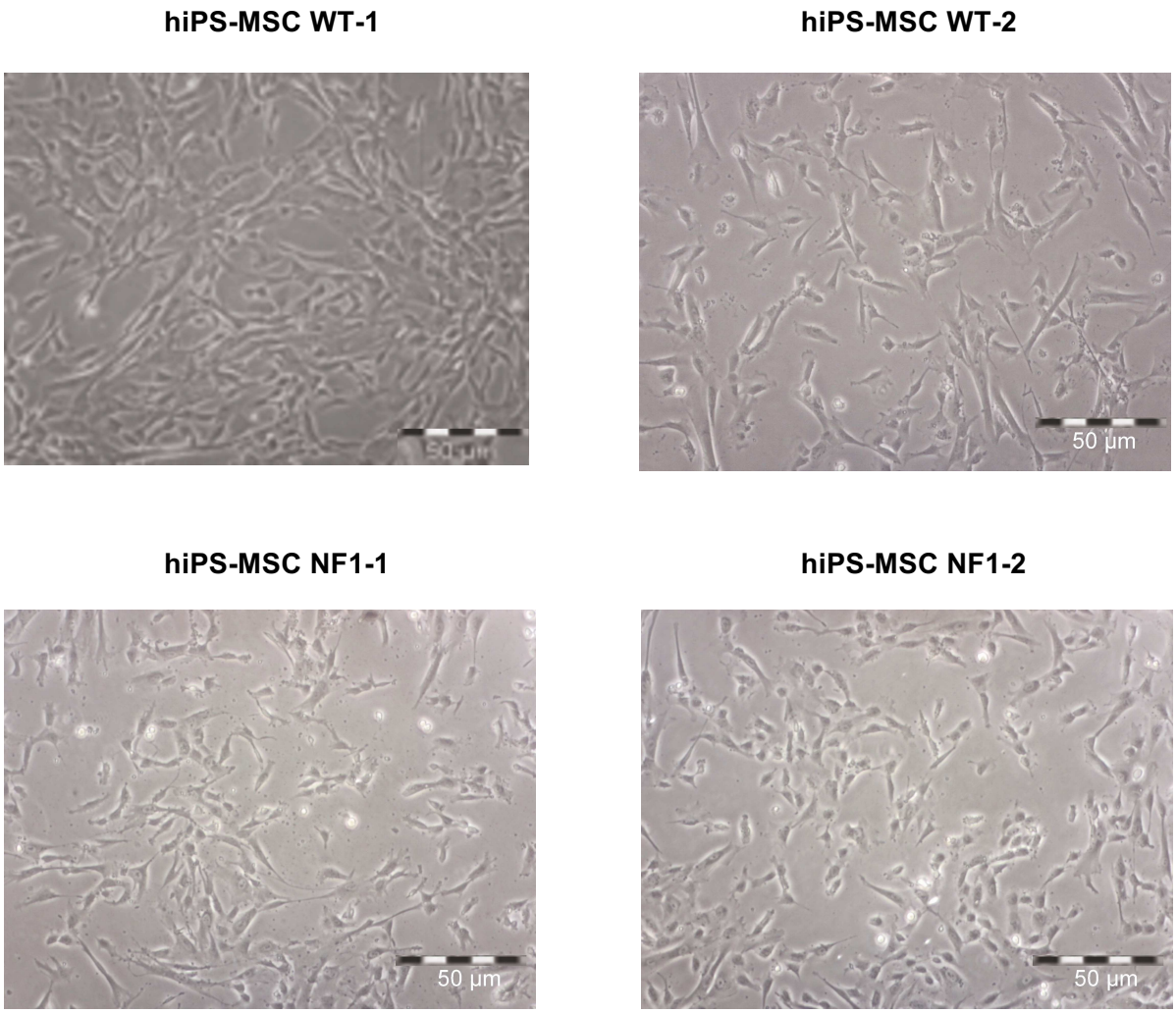


Figure 23 : Morphologie des cellules hiPS-MSC WT et hiPS-MSC NF1 après la décongélation par microscopie optique

- Analyse par cytométrie en flux

Les cellules sont décongelées et cultivées pendant un passage puis analysées en cytométrie en flux pour vérifier l'expression des marqueurs de surface CD29, CD44, CD73 et CD166.

On constate que les cellules hiPS-MSC WT-1 présentent 99,4% de marquage positif pour CD29, 94,6% pour CD44, 98,4% pour CD73 et 98,6% pour CD166 (Fig. 24). Des résultats équivalents ont été observés pour les trois autres lignées (hiPS-MSC WT-2, hiPS-MSC NF1- 1 et hiPS-MSC NF1-2) (voir Tableau 9). Nos 4 lignées d'IPS se sont bien engagées dans le lignage mésenchymateux.

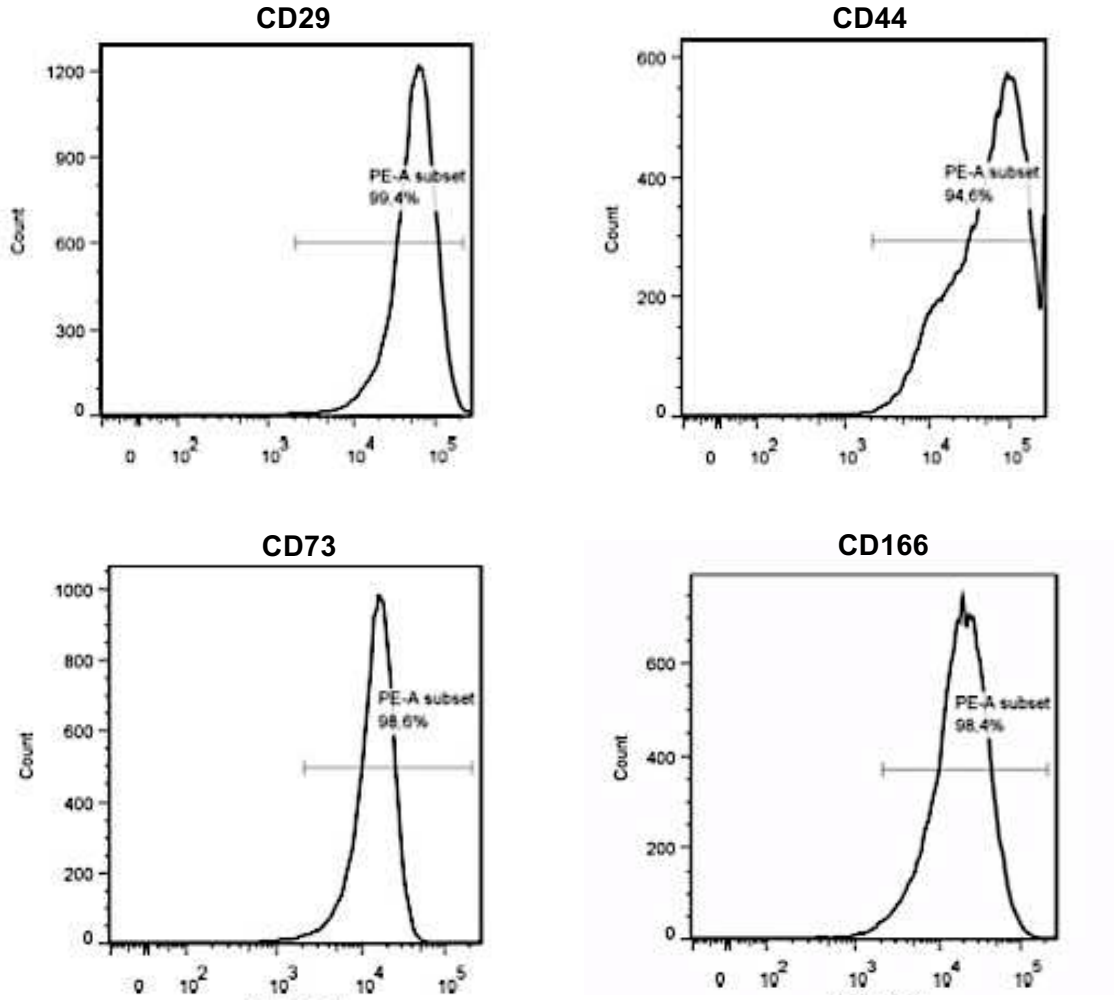


Figure 24 : Caractérisation des cellules souches mésenchymateuses différenciées à partir des hiPS-MSC WT-1

Analyse par cytométrie en flux des marqueurs CD29 (99,4%), CD44 (94,6%), CD73 (98,4%) et CD166 (98,6%) après un passage post-décongélation.

Tableau 9 : Quantification des marqueurs mésenchymateux pour les hiPS-MSC

	CD29	CD44	CD73	CD166
hiPS-MSC WT-1	99,4%	94,9%	99,2%	98,7%
hiPS-MSC WT-2	99,8%	98,8%	99,6%	97,9%
hiPS-MSC NF1-1	99,4%	94,6%	98,4%	98,6%
hiPS-MSC NF1-2	99,9%	99,8%	97,2%	90%

- Différenciation des hiPS-MSC en adipocytes

Selon les critères établit par l'ISCT, les MSC humaines doivent avoir la capacité de se différencier in vitro en adipocytes. Les cellules hiPS-MSC WT et NF1 ont donc été cultivées pendant une semaine dans un milieu spécifique aux adipocytes (StemMACS™ AdipoDiff Media, Miltenyi).

Les hiPS-MSC WT et NF1 ont été différenciées en adipocytes et au bout d'une dizaine de jours les cellules ont été marquées au 4,4-Difluoro-1,3,5,7,8-Pentamethyl-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacene 493-503 (Bodipy), qui réagit avec les gouttelettes lipidiques présentent dans les adipocytes. Les cellules ont été analysées à l'aide d'un imageur pour quantifier le nombre de cellules présentant des gouttelettes (Fig. 25). On constate que 97% des hiPS-MSC WT-1, 90% des hiPS-MSC WT-2, 97% des hiPS-MSC NF1-1 et plus de 98% des hiPS- MSC NF1-2 (Tableau 10) présentent des gouttelettes lipidiques, ce qui confirme leur caractère adipocytaire.

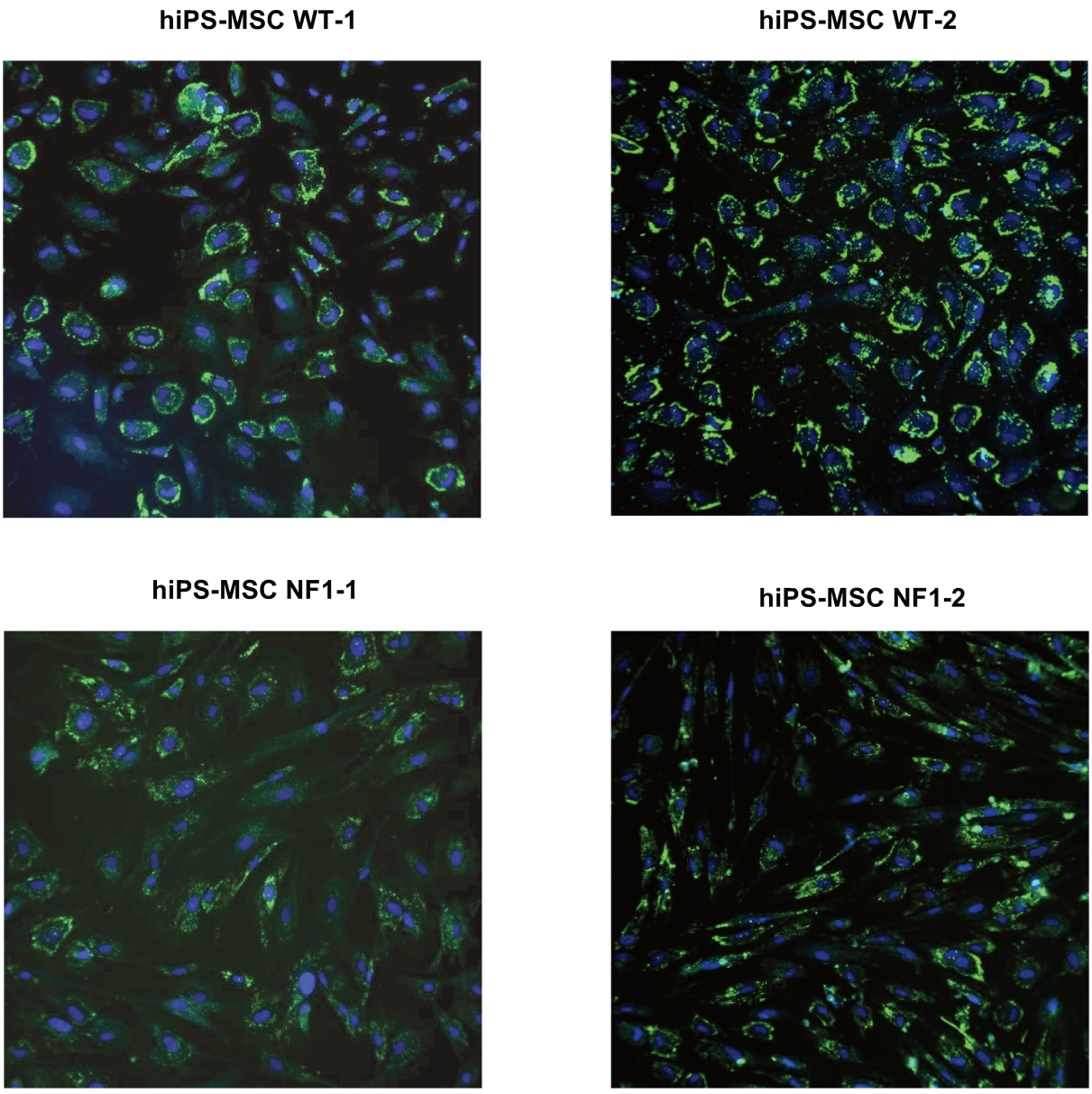


Figure 25 : Différenciation adipocytaire des hiPS-MSC WT et NF1

Le noyau des cellules hiPS WT-1, hiPS WT-2, hiPS NF1-1 et hiPS NF1-2 est marqué au DAPI (bleu) et les gouttelettes lipidiques sont marquées au Bodipy (vert).

Tableau 10: Quantification des adipocytes différenciés à partir des hiPS-MSC

hiPS-MSC WT-1	hiPS-MSC WT-2	hiPS-MSC NF1-1	hiPS-MSC NF1-2
97,6%	90,3%	97,4%	98,9%

3. Effet de la perte d'expression de la neurofibromine sur les hiPS-MSC

La neurofibromine étant normalement exprimée dans les MSC, j'ai commencé par vérifier le niveau d'expression de son gène dans les différentes lignées d'hiPS-MSC.

- Profil d'expression génique de la neurofibromine dans les hiPS-MSC

Chez l'homme, l'équipe de Leskelä a démontré que suite à la perte d'expression de *NF1* dans des MSC de moelle osseuse de tibia de patient, les cellules présentaient des taux réduits d'ARNm et de protéine NF1 (Leskelä et al., 2009). J'ai en premier lieu réalisé des analyses par RT-qPCR et western blot afin de déterminer si la mutation entraîne une perte d'expression génique de la neurofibromine dans nos cellules. L'analyse du niveau d'expression du transcrit *NF1* ne montre pas de différence significative entre les hiPS-MSC WT et les hiPS-MSC NF1 (Fig. 26). Par contre, au niveau protéique, on observe un niveau d'expression de la neurofibromine diminué dans les hiPS-MSC NF1 (Fig. 27). Ces résultats sont cohérents avec le type de mutation qui ne modifie pas la transcription de l'ARN.

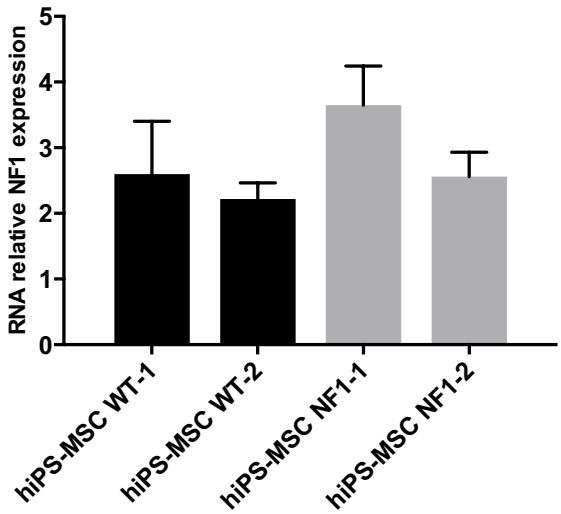


Figure 26 : Expression du transcrit *NF1* dans les cellules MSC au passage 6

Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SD (n = 3).

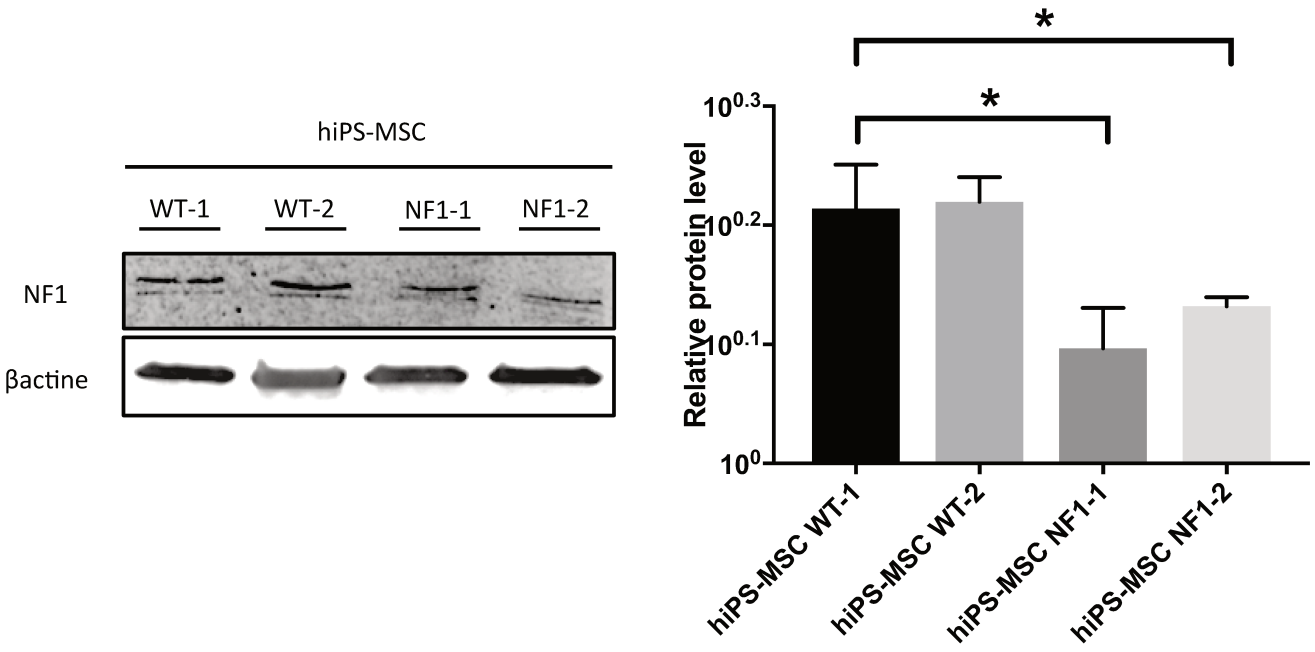


Figure 27 : Analyse par Western Blot de l'expression de la neurofibromine dans les cellules hiPS-MSC WT et hiPS-MSC NF1

La β-actine a été utilisée comme témoin de charge. Les données sont présentées sous forme de moyenne± SD (n = 3). * P <0,01 déterminé par une one-way ANOVA suivi du test de comparaison de Tukey.

- Analyse de la prolifération des hiPS-MSC suite à la perte de la neurofibromine.

La perte d'expression de le neurofibromine entraine une prolifération des MSC chez les souris *Nf1*+/- (Wu et al., 2006). J'ai donc voulu vérifier si les cellules hiPS-MSC NF1 présentaient également une augmentation de prolifération par rapport aux hiPS-MSC WT. Pour cela j'ai utilisé deux méthodes, une permettant de surveiller la confluence des cellules sur une semaine (Fig. 28A) et la deuxième permettant de compter le nombres de cellules à différents temps pendant une semaine également (Fig. 28B).

L'état de confluence des cellules a été analysé à l'aide du lecteur IncuCyte® qui permet d'enregistrer ce paramètre pendant une dizaine de jours (Fig. 28A). On constate que les cellules hiPS-MSC WT-1 atteignent la confluence au bout de 7 jours (environ 175 heures). Il n'y aucune différence significative entre les hiPS-MSC WT-2 et les hiPS-MSC NF1-1, qui atteignent la confluence à 6 jours (environ 150 heures). Cependant, la différence entre l' hiPS-MSC NF1-1 et l'hiPS-MSC NF1-2, qui atteint la confluence plus rapidement (environ 125 heures), ne permet pas de conclure sur une prolifération plus importante des hiPS-MSC NF1. Cette expérience étant basée sur la confluence cellulaire et non sur le nombre de cellules, un deuxième test a été réalisé par comptage cellulaire. Pour cela, les cellules ont été ensemencées sur plaque de culture et marquées au DAPI à différents temps (tous les deux jours) afin d'identifier les noyaux des cellules et finalement analysées par un imageur qui a permis un comptage cellulaire (Fig. 28B). Le nombre de cellules a été rapporté au nombre de cellules à l'ensemencement (D0) et l'on peut constater qu'il n'y a pas de différence de prolifération significative entre les hiPS-MSC WT et les hiPS-MSC NF1.

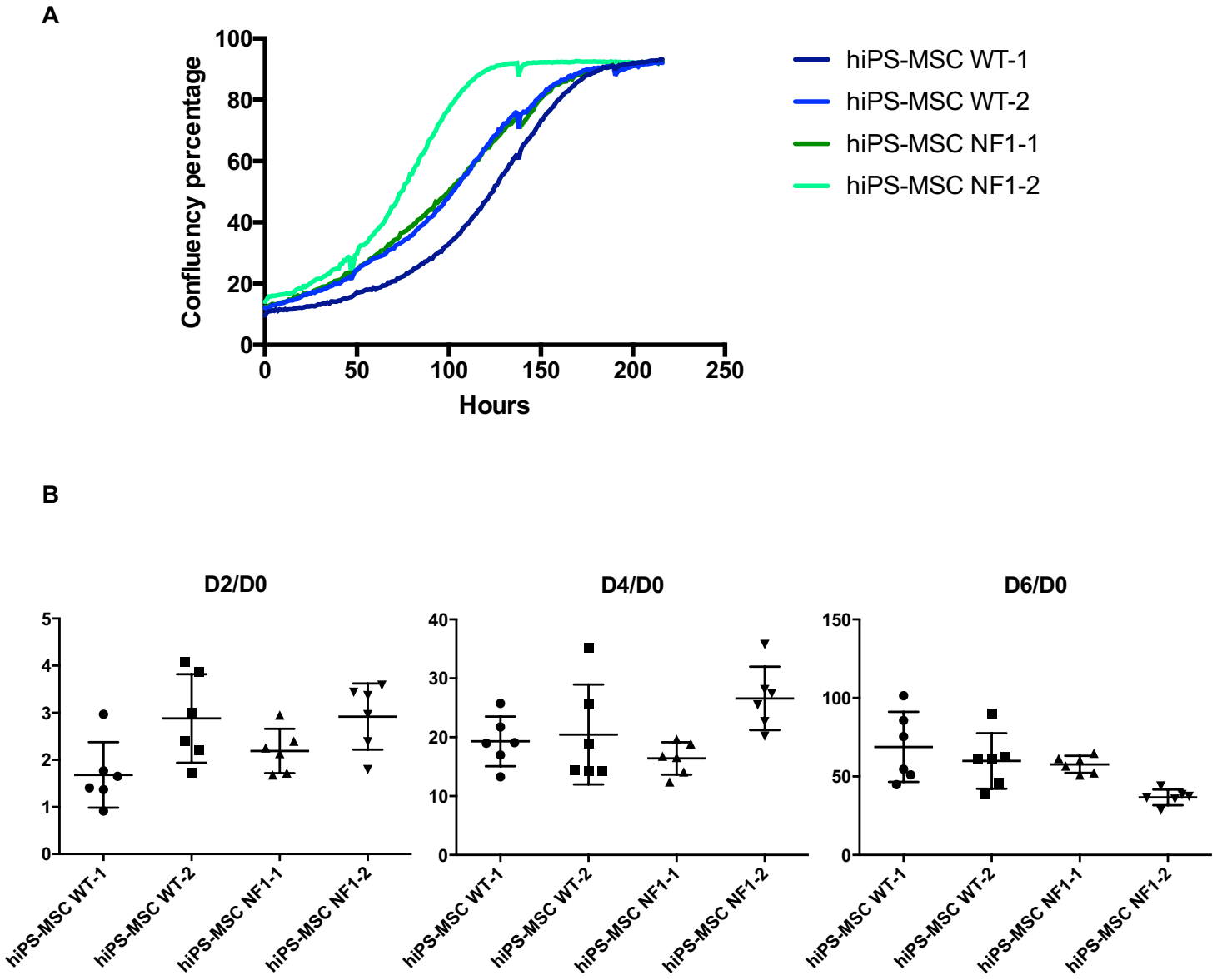


Figure 28 : Analyse de la prolifération des hiPS-MSC

(A) Analyse du pourcentage de confluence obtenue au bout de 10 jours de culture des hiPS-MSC (B) les cellules ont été marqués au DAPI et le comptage a été effectué à différents jours après l'étalement des cellules (D0). Les résultats ont été rapportés au Jour 0 pour normalisation. Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (n = 3). *** P <0,001 déterminé par une two-way ANOVA suivi du test de comparaison de Dunnett

Les tests mis en place pour analyser si la perte de l'expression de la neurofibromine affectait la prolifération des MSC montrent que ce paramètre n'est pas altéré dans les hiPS-MSC NF1.

- Analyse de l'impact sur les voies RAS/MAPK et AKT/mTOR dans les hiPS-MSC NF1

Une sur-activation de la voie RAS a été rapportée dans des MSC humaines issues de moelle osseuse de tibia de patients NF1 souffrant de pseudoarthrose tibiale. Notamment, des niveaux plus élevés de phosphorylation des voies de p44/42 MAPK ont été constaté. Li et al. ont également montré que le gène NF1 module la différenciation ostéogénique et la prolifération cellulaire de BMSC humaines via la voie mTOR (Li et al., 2017). Les protéines des lignées hiPS- MSC WT et NF1 ont été extraites puis analysées par Western blot pour les voies ERK et AKT/mTOR (Fig. 29).

On constate que les niveaux d'expression de P-ERK/ERK des hiPS-MSC WT ne sont pas significativement différents des niveaux d'expression des hiPS-MSC NF1. De la même manière, on n'observe pas de différence entre les hiPS-MSC WT et NF1 concernant les niveaux d'expression P-mTOR/mTOR. Cependant, on constate une discrète sur-activation de la voie AKT des hiPS-MSC NF1-2 (x1,5) par rapport aux hiPS-MSC WT-1. Mais aucune différence n'est observée entre les hiPS-MSC NF1-2 et les hiPS-MSC WT-2. Tout comme pour les hiPS-MSC NF1-1 par rapport aux hiPS-MSC WT-1 et WT-2 (Fig. 29)

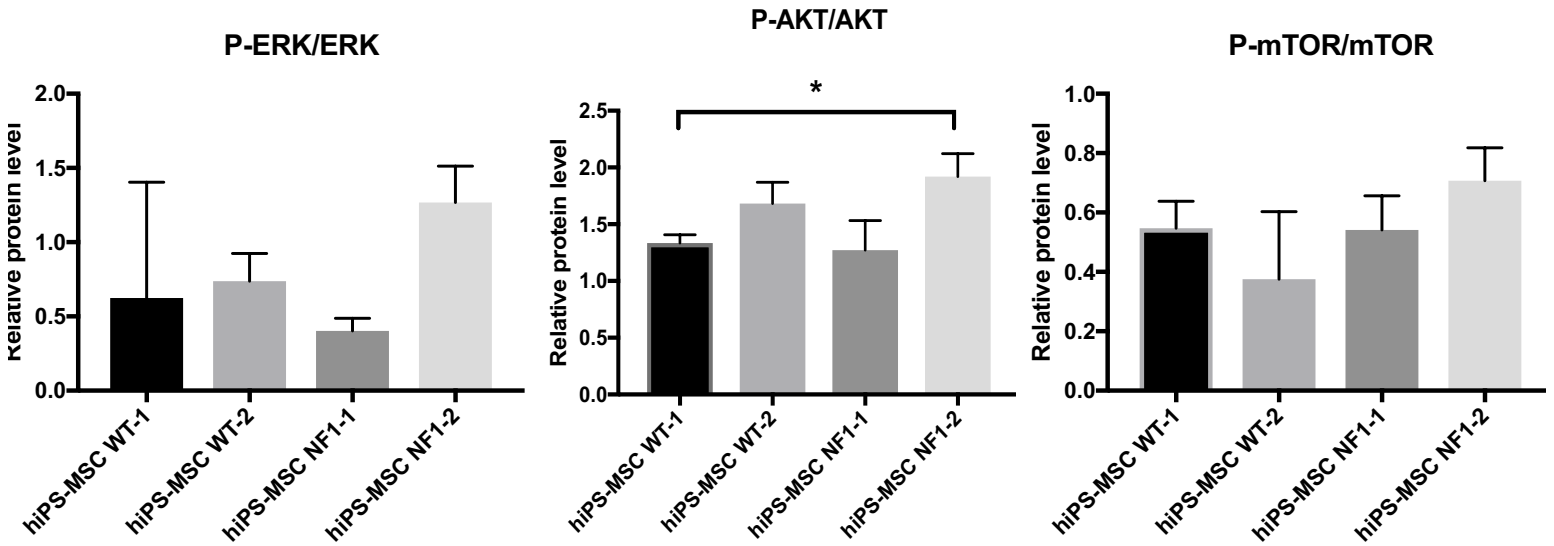


Figure 29 : Analyse des voies de signalisation régulées par la neurofibromine

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (n = 3) et normalisés par rapport à l'expression de la β-actine. * P <0,01 déterminé par une one-way ANOVA suivi du test de comparaison de Tukey.

Après différenciation des cellules hiPS WT et NF1 en MSC, nous avons montré que les cellules valident les caractéristiques morphologiques attendues, présentent les marqueurs de surfaces de MSC et se différencient en adipocytes. Ces hiPS-MSC NF1 présentent bien une perte de l'expression de la neurofibromine par rapport aux hiPS-MSC WT. Cependant l'ensemble de résultats semble montrer que les deux lignées NF1 ne se comportent pas de la même manière, ce qui pourrait s'expliquer par la nature de leur mutation.

4. Capacité de différenciation des hiPS-MSC dans le lignage ostéoblastique

Les MSC humaines doivent avoir la capacité de se différencier in vitro en adipocytes mais également en ostéoblastes. Pour vérifier cette capacité, les hiPS-MSC ont été cultivées en milieu StemMACS™ OsteoDiff Media (Miltenyi) pendant 10 jours (Fig. 30).

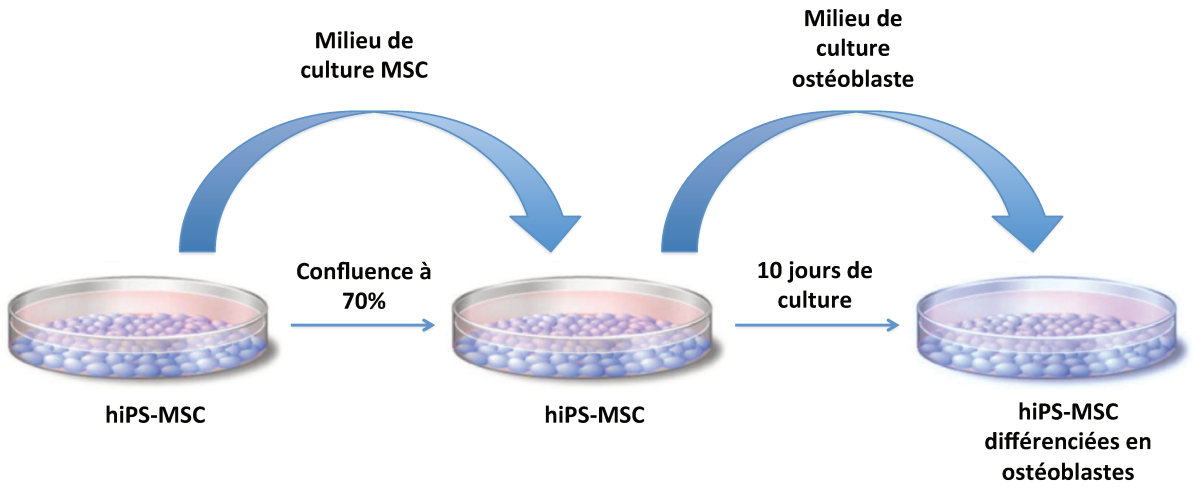


Figure 30 : Schéma de la différenciation des hiPS-MSC en osteoblasts

- Différenciation et caractérisation des hiPS-MSC WT et NF1 en ostéoblastes

Pour valider la différenciation ostéoblastique des hiPS-MSC WT, on réalise classiquement un marquage à la phosphatase alcaline (ALP), enzyme qui à la fois augmente la concentration locale de phosphate inorganique, un promoteur de minéralisation, et diminue la concentration de pyrophosphate extracellulaire, un inhibiteur de la formation de minéraux (Golub et al., 2007). On constate que les hiPS-MSC WT-1 et WT-2 présentent des zones de

colorations bleutées qui indiquent la présence de phosphatase alcaline (Fig. 31A). Par contre, les cellules hiPS-MSC NF1-1 et NF1-2 ne présentent que peu de marquage à l'ALP après 10 jours de différenciation (Fig. 31B).

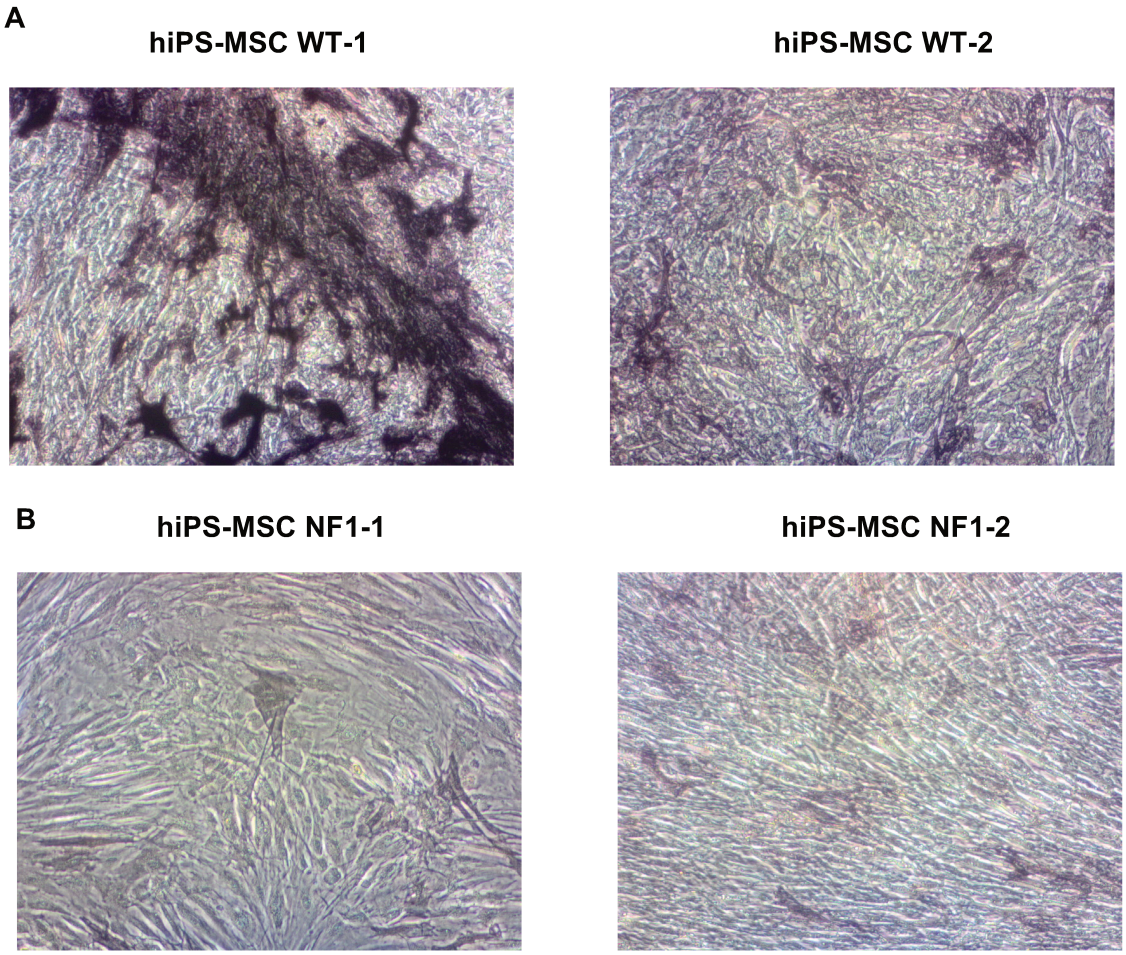


Figure 31 : Marquage à la phosphotase alcaline des hiPS-MSC différenciées en ostéoblastes

(A) hiPS-MSC WT-1 et hiPS-MSC WT-2 après 10 jours de différenciation. (B) hiPS-MSC NF1-1 et hiPS-MSC NF1-2 après 10 jours de différenciation. (n=3).

Un marquage au rouge alizarine, qui permet de visualiser la mise en place de la minéralisation en liant les sels de calcium présents dans les cellules, est effectué après 21 jours de différenciation. On observe que la minéralisation s'est bien mise en place dans nos cultures d'hiPS-MSC WT-1 et WT-2 puisque l'on peut constater des dépôts de calcium colorés en rouge (Fig. 32A). Cependant, la minéralisation ne semble pas être mise en place après 21 jours de différenciation dans les cellules hiPS-MSC NF1 (Fig. 32B). Ces résultats montrent que les cellules hiPS-MSC NF1 ont des difficultés à se différencier en ostéoblastes.

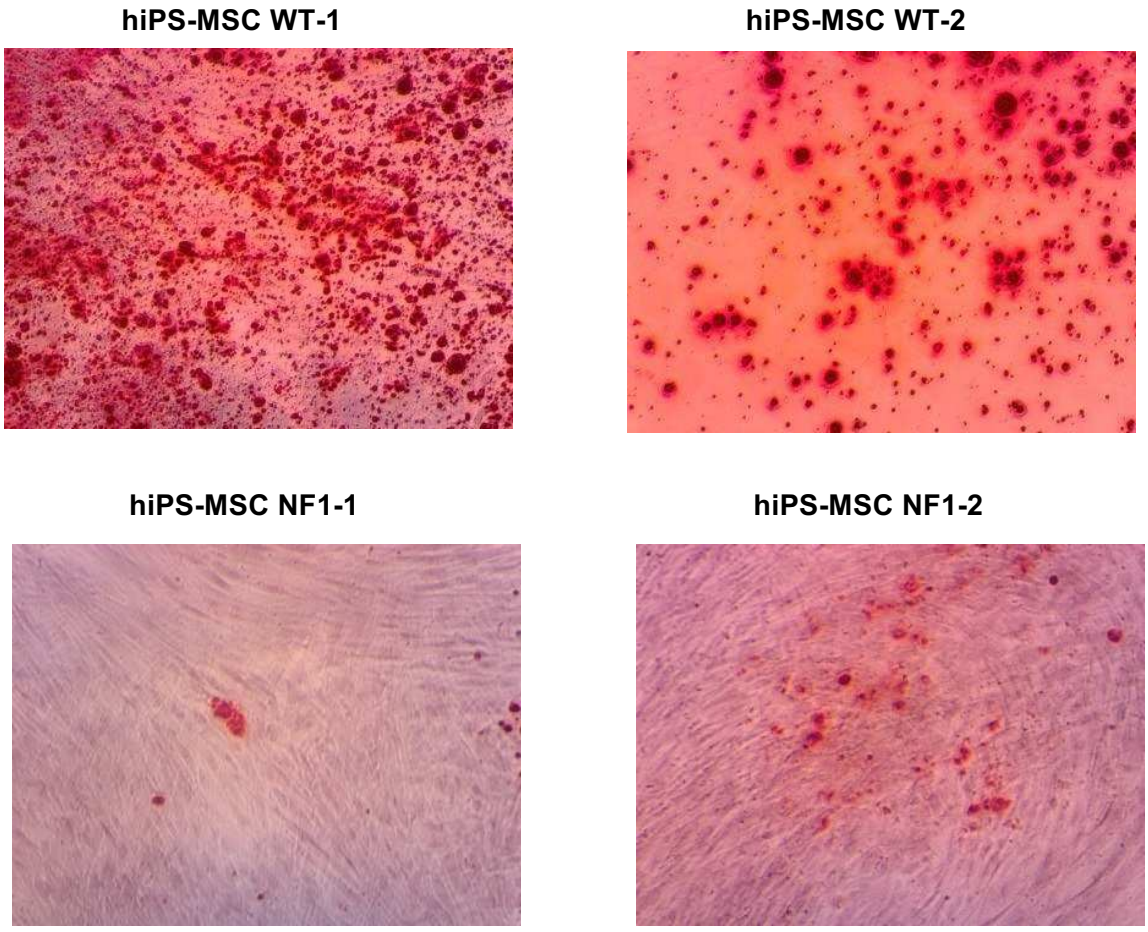


Figure 32 : Marquage au rouge alizarine des hiPS-MSC différenciées en ostéoblatses

(A) hiPS-MSC WT-1 et hiPS-MSC WT-2 après 10 jours de différenciation. (B) hiPS-MSC NF1-1 et hiPS-MSC NF1-2 après 10 jours de différenciation. (n=3).

De ces deux types de marquages, on peut conclure que les hiPS-MSC WT ont la capacité à se différencier in vitro en ostéoblastes à partir de MSC dérivées d'hiPS. Cette différenciation est moins efficace dans les cellules hiPS-MSC NF1.

Ce phénotype est décrit dans la littérature, ce qui nous fait penser que nos lignées de MSC dérivés d'hiPS NF1 constituent un modèle utile pour l'étude du phénotype osseux de la pathologie et innovant grâce à l'utilisation des cellules souches induites à la pluripotence. Afin de caractériser plus précisément ce phénotype, les études précédentes ont été complétées par l'analyse des profils géniques et protéiques de ces cellules.

5. Analyse du phénotype ostéoblastique lié à la perte d'expression de la neurofibromine.

Dans le but de confirmer ce phénotype j'ai quantifié par cytométrie en flux le nombre de cellules exprimant la phosphatase alcaline après différenciation en ostéoblastes. Puis j'ai étudié l'activité de la phosphatase alcaline dans nos cultures d'ostéoblastes dérivés des hiPS-MSC par colorimétrie.

- ### Quantification du phénotype par cytométrie en flux.

A la fin de la différenciation des hiPS-MSC en ostéoblastes, les cellules sont marquées à la phosphatase alcaline (ALP) afin de quantifier le nombre de cellules différenciées en ostéoblastes dans chaque lignée. L'analyse en cytométrie de flux montre une population cellulaire à 20% et 12% positive respectivement pour les hiPS-MSC NF1-1 et hiPS-MSC NF1-2 contre des populations exprimant ALP à 60% pour les hiPS-MSC WT-1 et plus de 80% pour les hiPS-MSC WT-2 (Fig. 33). Ces résultats confirment que les hiPS-MSC NF1 se différencient moins efficacement que les cellules hiPS-MSC WT en ostéoblastes.

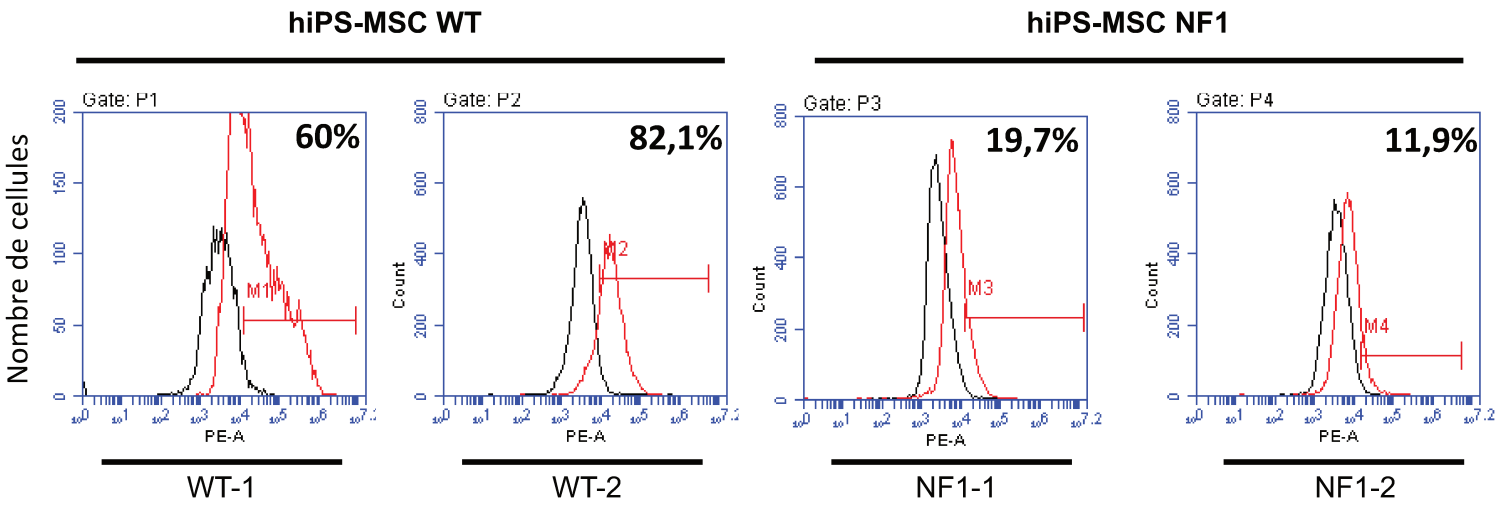


Figure 33 : Analyse par cytométrie de flux de la protéine ALP au bout de 10 jours de différenciation ostéoblastique

Les hiPS-MSC WT différenciées en ostéoblastes présentent entre 60% et 80% de marquage à l'ALP contre 10%-20% pour les cellules pathologiques. La courbe noire représente l'isotype et la courbe rouge représente les cellules marquées à l'ALP.

- Quantification du phénotype par colorimétrie

Afin de valider les résultats précédents, j'ai utilisé un test colorimétrique qui permet de déceler l'activité de l'ALP dans les cultures. Les résultats obtenus par colorimétrie (DO) on été normalisés pour chaque lignée au nombre de cellules. On constate que l'activité ALP est significativement diminuée dans les 2 lignées de cellules qui présentent la mutation NF1 comparée aux cellules WT-2 (Fig. 34), alors que la différence entre les hiPS-MSC WT-1 et hiPS-NF1-2 n'est pas significative dans ce test.

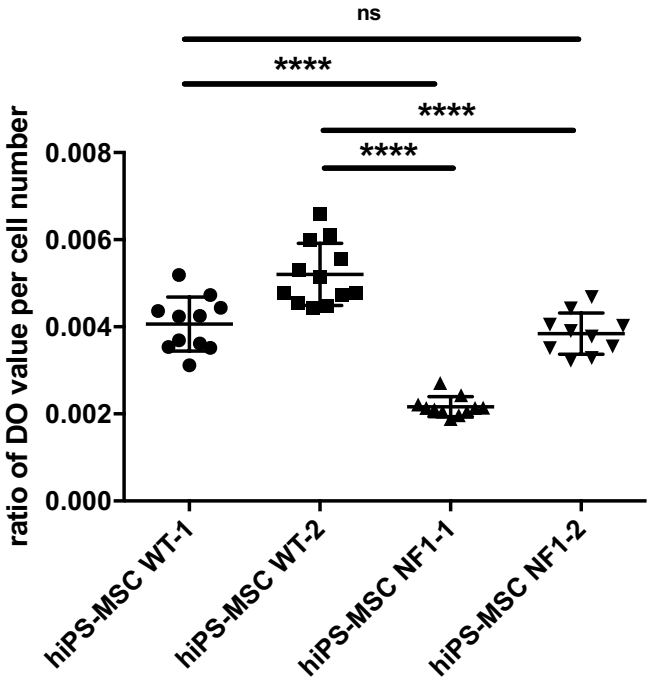


Figure 34 : Analyse par colorimétrie de l'activité ALP au bout de 10 jours de différenciation ostéoblastique

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (n = 3). **** P <0,0001 déterminé par une one way ANOVA suivi du test de comparaison de Tukey.

L'analyse de la phosphatase alcaline dans nos cellules hiPS-MSC WT et NF1 différenciées en ostéoblastes a permis de constater que les cellules NF1 présentaient une différenciation en ostéoblastes diminuée. En effet, on constate que les cellules hiPS-MSC NF1-1 et NF1-2 différenciées en ostéoblastes présentent moins de coloration à l'ALP que les hiPS-MSC WT- 1 et WT-2. Les analyses par cytometrie en flux ont permis de quantifier cette différence entre les cellules hiPS-MSC WT qui expriment l'ALP à plus de 60% alors que les cellules hiPS- MSC NF1 n'expriment l'ALP qu'à 20%. Pour finir, l'activité de l'ALP dans nos cultures de hiPS-MSC différenciées en ostéoblaste à permis de confirmer que les hiPS-MSC NF1 présentaient une activité diminuée par rapport aux hiPS-MSC WT. On peut donc conclure que le gène NF1 semble important dans la bonne différenciation des cellules MSC en ostéoblastes.

- Analyse du profil d'expression génique des hiPS-MSC différenciées en ostéoblastes

Toutes les lignées d'hiPS-MSC ont été différenciées en ostéoblastes comme décrit dans la figure 30. Les ARNm de chaque culture ont été récupérés au lancement de la différenciation (J0) puis sept jours plus tard (J7). Les échantillons ont été analysés par RT-qPCR pour vérifier les niveaux

d’expression des marqueurs ostéoblastiques tels que l’ALP : enzyme qui participe à la mise en place de la minéralisation, RunX2 : protéine responsable de l'induction de la différenciation des cellules mésenchymateuses multipotentes en ostéoblastes immatures, ainsi que de l'activation de l'expression de plusieurs protéines qui maintiennent la différenciation des ostéoblastes, et Col1A : protéine de matrice extracellulaire à haute résistance à la traction et composante principale du tissu conjonctif. Pour chaque lignée, le niveau d’expression à J7 est normalisé par rapport au J0 (Fig. 35).

Les hiPS-MSC WT-1 présentent une augmentation du niveau d’expression de l’ALP à J7 dix fois supérieur par rapport au niveau à J0. De la même manière, les hiPS-MSC WT-2 présentent une augmentation à J7 de plus de 100 fois supérieur au niveau d ‘expression d’ALP à J0. Les hiPS-MSC NF1 montrent également une augmentation des niveaux d’expressions d’ALP mais de manière moins prononcée : moins de 10 fois supérieur par rapport à J0 pour chacune des lignées.

RunX2 qui est un facteur de transcription essentiel pour la différenciation ostéoblastique n’est augmenté que dans les hiPS-MSC WT-2 à J7. Les hiPS-MSC WT-1 et les hiPS-MSC NF1-1 et NF1-2 ne montrent aucune différence entre J0 et J7.

A J7, les hiPS-MSC WT-2 montrent une augmentation d’expression de Col1A de presque 10 fois par rapport au J0. Cependant on constate que chez les hiPS-MSC WT-1, le Col1A n’est pas beaucoup plus exprimé qu’à J0 (2 fois), alors que les hiPS-MSC NF1-2 montrent une augmentation 5 fois supérieur par rapport au J0. Les hiPS-MSC NF1-1 ne montrent pas plus d’expression de Col1A à J7 qu’à J0.

Les résultats obtenus pour l’ALP sont en concordance avec les résultats précédents, les hiPS-MSC WT différenciées en ostéoblaste présentent une plus forte expression de ce marqueur par rapport aux hiPS-MSC NF1. Les niveaux d’expression de RunX2 et Col1A quant à eux ne permettent pas de conclure sur une meilleure différenciation des hiPS-MSC WT par rapport aux hiPS-MSC NF1.

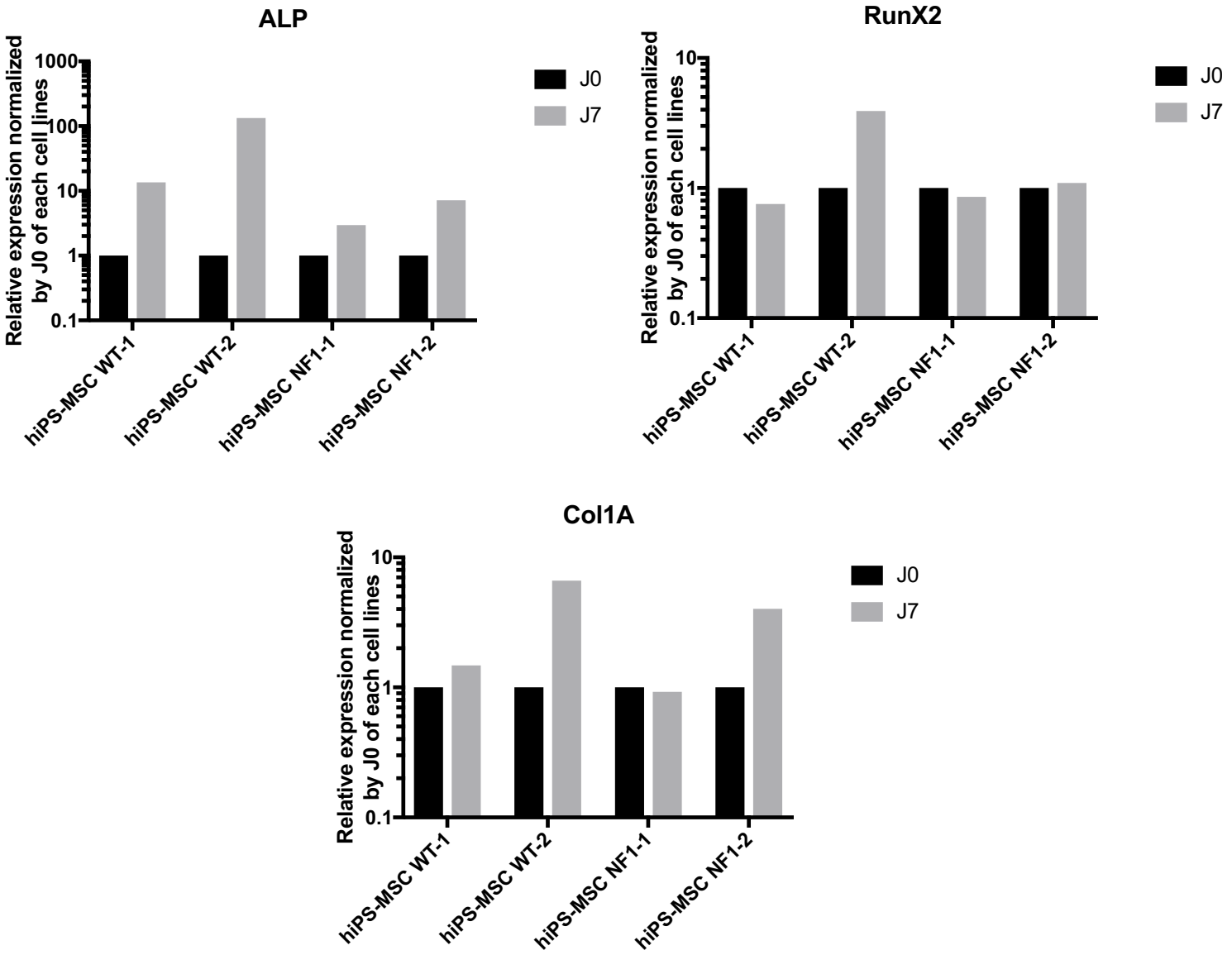


Figure 35 : Expression des marqueurs de différenciation ostéoblastique à J0 et J7 dans les hiPS-MSC WT et hiPS-MSC NF1

Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SD de triplicat techniques.

- Analyse des voies de signalisation RAS/MAPK et AKT/mTOR dans les hiPS-MSC différenciées en ostéoblastes

La signalisation Ras augmente la prolifération des cellules souches/progénitrices dans de nombreux tissus. L'activation de Kras augmente la prolifération des cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse (Chan et al., 2013 ; Braun et al., 2004 ; Van Meter et al., 2007).

Yu et al ont décrit que l''activation de Ras par la perte partielle du gène *Nf1* dans les cellules ostéoprogénitrices augmente la prolifération et provoque une apoptose prématurée (Yu et al., 2005). Les différentes études sur ce sujet n'ont cependant pas confirmé que l'apoptose était significativement augmentée, laissant plutôt à penser que l'augmentation de la prolifération est l'effet dominant de l'activation de Kras dans les cellules ostéoprogénitrices. Il existe encore peu

d’études sur le rôle de la voie de signalisation Ras-MAPK dans les cellules progénitrices des ostéoblastes de l'os in vivo. Matsushita et al. ont montré que la voie de signalisation ERK dans les cellules progénitrices mésenchymateuses favorise la différenciation des ostéoblastes et la formation osseuse au cours du développement squelettique précoce (Matsushita et al., 2009). L’équipe de Papaioannou et al. a également mis en évidence que la voie PI3K via AKT joue également un rôle important dans la prolifération des ostéoprogéniteurs (Papaioannou et al., 2016).

Je me suis donc intéressée à l’impact que pouvait avoir la perte de la neurofibromine sur la régulation des voies de signalisation en aval de RAS dans les ostéoblastes, par une analyse du profil protéique des formes phosphorylées ou non de ERK-AKT-mTOR dans les cellules hiPS-MSC WT et NF1. Mes résultats montrent que ces voies ne sont pas significativement altérées dans les cellules NF1 (Fig. 36). On observe cependant une forte variabilité intra-groupe ; cette étude devra être reproduite avec d’avantage d‘échantillons.

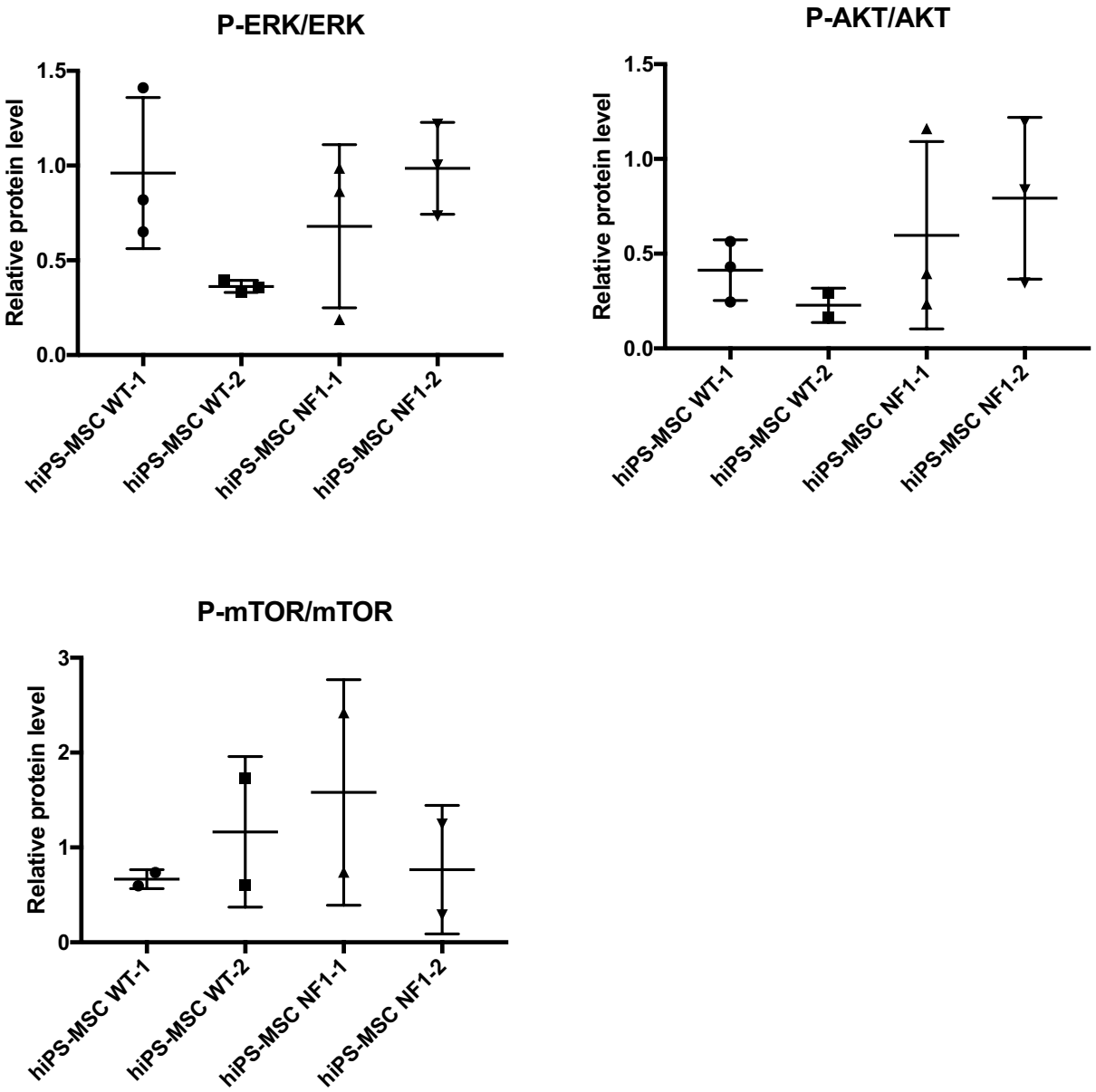


Figure 36 : Analyse des voies de signalisation normalement régulées par la neurofibromine

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (n = 3).

6. Utilisation de molécules potentiellement actives dans la restauration d'un phénotype normal dans les cellules NF1.

Dans cette dernière partie, je me suis intéressée à la possibilité de restaurer un phénotype normal à l'aide i) de molécules qui agissent sur les voies impactées par la perte d'expression de la neurofibromine et ii) de molécules utilisées dans des pathologies associées à des défauts osseux comme l'ostéoporose.

- ### Inhibiteurs de la voie RAS

J'ai testé des inhibiteurs des voies de signalisation qui sont impactées par NF1 tels que le PD0325901, inhibiteur des voies ERK et l'AZD8055 inhibiteur du complexe C1 et C2 de mTOR dans le but de vérifier si la différenciation ostéoblastique pouvait être potentialisée dans les hiPS-MSC NF1.

Le traitement par PD325901 est sans effet significatif, quelque soit le groupe, à l'exception d'une diminution de production d'ALP dans les cellules hiPS-MSC NF1-2 traitées (Fig. 37). Le traitement par AZD8055 diminue significativement l'activité ALP dans les deux hiPS-MSC WT, alors qu'il reste sans effet sur les hiPS-MSC NF1 (Fig. 37).

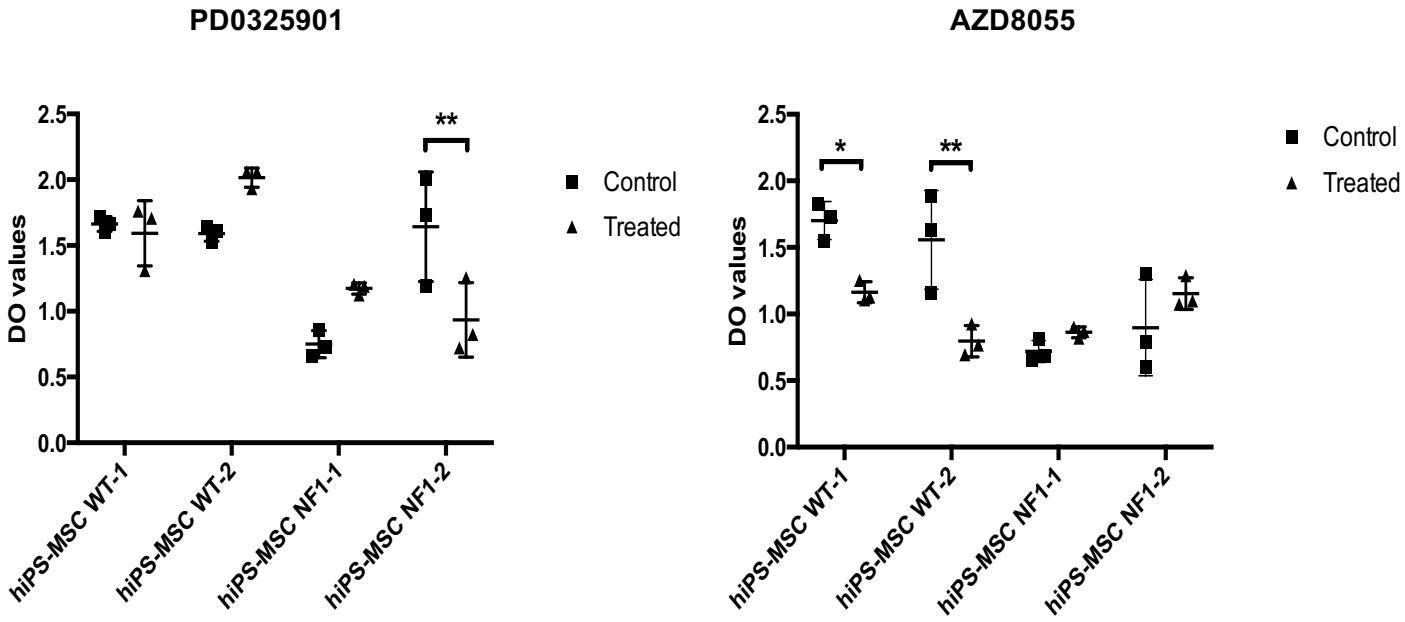


Figure 37 : Traitements des cellules en cours de différenciation ostéoblastique avec des inhibiteurs des voies impactées par la mutation NF1

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (n = 3), *P < 0.05, **P < 0.01 déterminé par two-way ANOVA suivi d'un test de Dunnett.

- Statines

L'utilisation de statines pour la régénération osseuse est un domaine de recherche prometteur et croissant. Les statines, initialement développées pour traiter le cholestérol, sont des inhibiteurs de l'enzyme 3-hydroxy-3-méthylglutaryl, enzyme limitante de la voie du mévalonate. Étant donné que la voie du mévalonate est responsable de la synthèse d'une grande variété de molécules biochimiques importantes, y compris le cholestérol et d'autres isoprénoïdes, les effets des statines sont pléiotropes. Plus particulièrement, les statines peuvent grandement affecter le processus de renouvellement et de régénération osseuse via des effets sur des types cellulaires importants, notamment les cellules souches mésenchymateuses, les ostéoblastes, les cellules endothéliales et les ostéoclastes.

Les statines étant le traitement préférentiellement utilisé dans les pathologies osseuses telles que l'ostéoporose, je me suis penchée sur leur potentiel dans le cadre des défauts osseux liés à NF1. L'effet des molécules a été analysé avec le test colorimétrique de l'ALP.

J'ai testé trois différentes statines :

- la lovastatine, notamment utilisée par Kolanczyk et al., dans un modèle de souris

permettant la modélisation de NF1. L'équipe a montré que la lovastatine améliore la guérison des fractures chez ses souris (Kolanczyk et al., 2008, Wang et al., 2011).

- la simvastatine, décrite comme augmentant le volume osseux, le taux de formation osseuse et la résistance à la compression (Park 2009; Mori et al., 2010) dans des études sur l'ostéoporose.

- l'atorvastatine, pour sa capacité à diminuer le taux de métabolisme osseux (résorption osseuse) et à augmenter l'activité ostéogénique (El-Nabarawi et al., 2017).

Les cellules hiPS-MSC WT et NF1 ont été différenciées en ostéoblastes. Pendant la différenciation, le milieu de culture est changé tous les deux jours et au moment du changement de milieu, les statines ont été ajoutées extemporanément. Afin de choisir la dose optimale à utiliser, un test d'effet-dose a été fait sur chaque lignée pour chaque molécule.

Seule la lovastatine n'a pas montré d'effet dose et donc n'a pas été conservé pour la suite de l'étude.
La simvastatine augmente significativement l'activité ALP dans les ostéoblastes issus d'hiPS-MSC NF1-2. Elle est sans effet sur les ostéoblastes issus d'hiPS-MSC NF1-1 ou sur les WT-1 et WT-2 (Fig. 38).
L'atorvastatine n'a aucun effet significatif sur les ostéoblastes issus d'hiPS-MSC WT et NF1 (Fig. 38). Une tendance à l'activation non significative s'observe dans les ostéoblastes NF1-2. Le fait que les différentes hiPS-MSC NF1 ne répondent pas de la même façon au traitement pourrait s'expliquer par le fait que leurs mutations au niveau du gène *NF1* sont différentes.

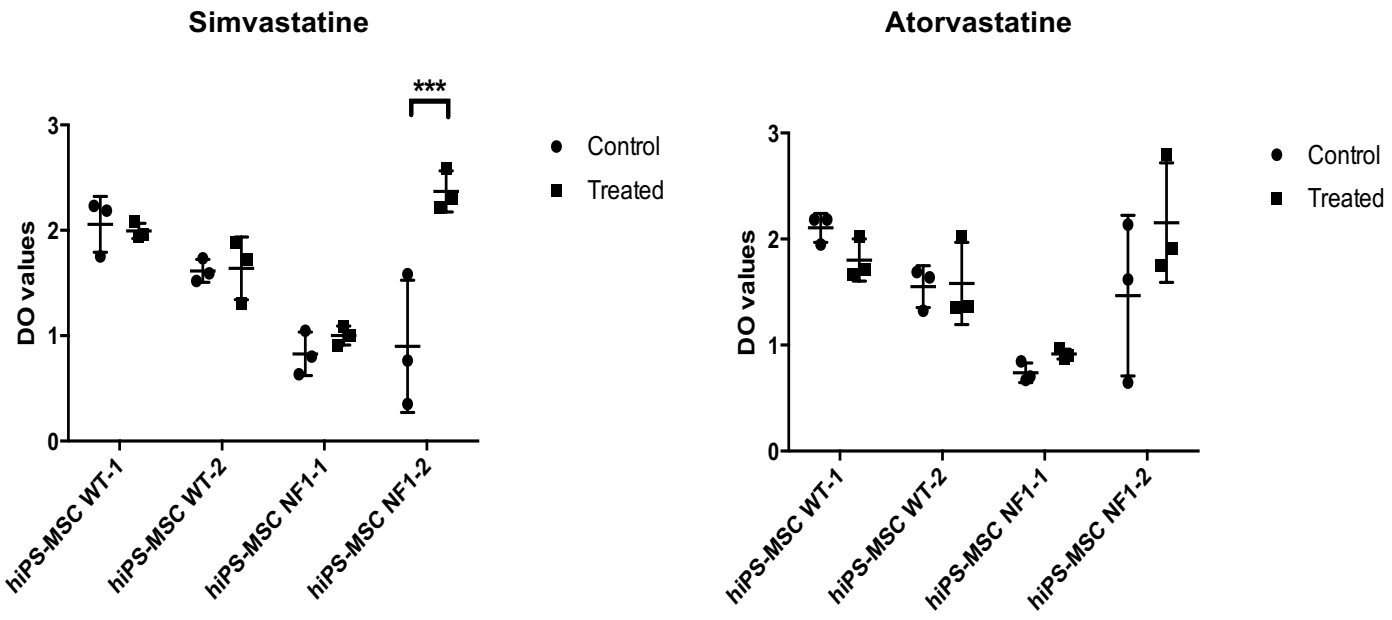


Figure 38 : Effet du traitement des cellules en cours de différenciation ostéoblastique avec des statines sur l'activité ALP

Les résultats sont exprimés en moyenne ± SD (n = 3), ***P < 0.001 déterminé par two-way ANOVA suivi par test de Dunnett

7. Mise en place de lignées isogéniques à l'aide de la technologie CRISPR/Cas9

Le domaine de la biologie connaît actuellement une phase de transformation avec le développement des techniques d'ingénierie du génome chez les animaux et les plantes à l'aide de CRISPR-Cas9. Ce système est aujourd'hui largement utilisé dans les laboratoires pour l'édition des génomes. La technologie CRISPR-Cas9 provient des systèmes CRISPR-Cas de type II, qui procurent aux bactéries une immunité adaptative aux virus et aux plasmides (Fig 39A). Le système CRISPR utilise la nucléase Cas9 (CRISPR-associated), qui complexée à un ARN guide (ARNg) complémentaire de la séquence cible (Protospacer), clive l'ADN de façon spécifique en amont d'une séquence PAM (Protospacer Adjacent Motif) localisée sur l'ADN génomique. L'action de la nucléase Cas9 guidée par l'ARNg aboutit à une coupure double brin de l'ADN génomique au niveau de la séquence cible. Deux mécanismes de réparation peuvent se produire (Figure 39B) :

- NHEJ : jonction des extrémités non homologues, aboutissant au Knock-Out (KO) du gène cible,
- Recombinaison homologue: en présence de séquences homologues, insérées via un vecteur donneur, qui permettent de réaliser des Knock-Out/In, réparation ou délétion de gène.

La simplicité de la programmation CRISPR-Cas9, associée à un mécanisme unique de clivage de l'ADN, à la capacité de reconnaissance de cibles multiplexées et à l'existence de nombreuses variantes de systèmes CRISPR-Cas de type II naturel, ont permis des développements remarquables en utilisant la technologie pour cibler, éditer, modifier, réguler et marquer avec précision et efficacité les locus génomiques d'un large éventail de cellules et d'organismes.

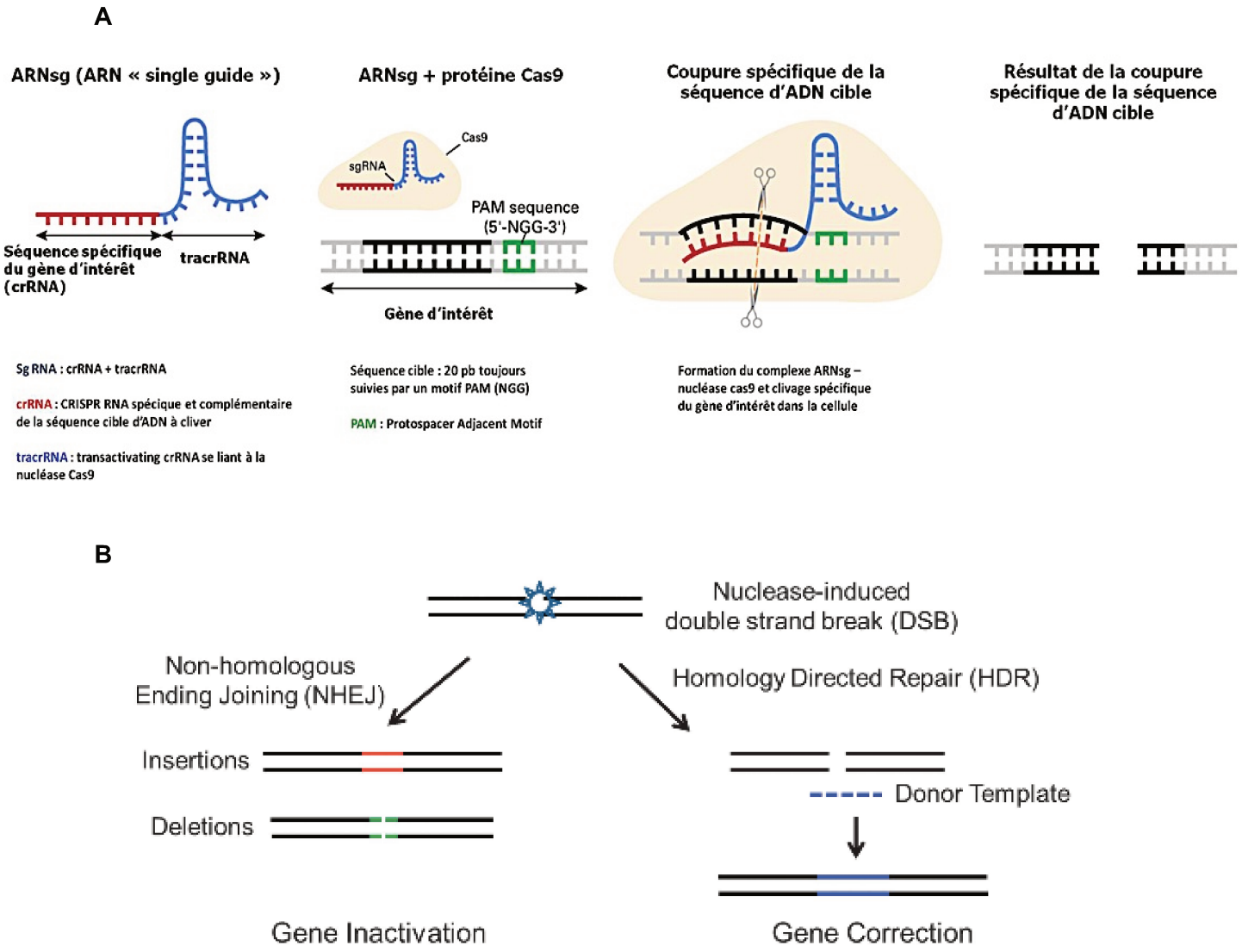


Figure 39 : Représentation du système CRISPR-Cas9

(A) Principe d'action du système CRISPR/Cas9. (B) Mécanisme de réparation mis en place après la coupure spécifique de la séquence d'ADN cible.

- ## Développement de lignées CRISPR/Cas9 dans le cadre de l'étude de la NF1

Dans le but d'étudier plus précisément les effets de la perte partielle ou totale de la neurofibromine dans les cellules osseuses et de pallier les variations de phénotypes observées selon le type de mutations, l'équipe a décidé de créer des lignées isogéniques NF1 (Tableau 11).

L'équipe a généré 54 lignées d'hiPS éditées dont 6 lignées ont été étudiées plus précisément. Les mutations entrainent l'apparition précoce d'un codon stop. Parmi ces 6 lignées, dont la mutation a été éditée dans l'exon 6 du gène NF1, on retrouve deux lignées hétérozygotes, deux hétérozygotes composites et deux lignées homozygotes.

Tableau 11 : Résumé des lignées obtenues avec la technologie CRISPR/Cas9

Lignée	Site d'édition	Séquences obtenues	Protéine	Resultat
61-H3	Exon 6	Sur 30 séquences : 13/30 (-1) 16/30 WT	Tronquée (24,5kD)	Hétérozygote
61-F1 clG	Exon 6	Sur 13 séquences : 9/13 WT 4/13 Del2bp	Tronquée (27,4kD)	Hétérozygote
22-B1	Exon 6	Sur 36 séquences : 36/36 +1A	Tronquée (23,5kD)	Homozygote
22-E1	Exon 6	Sur 29 séquences : 17/29 +1A 12/29 +2A	Tronquée (23,5 et 23,1kD)	Hétérozygote composite
2261-E3	Exon 6	Sur 36 séquences : 20/36 +1A 16/36 +3	Tronquée (23,5 et 24,5kD)	Hétérozygote composite
2261-H3	Exon 6	Sur 33 séquences : 33/33 Insertion/mutation (+5)	Tronquée (22,4kD)	Homozygote

- ## Analyse de l'extinction de NF1 dans les cellules éditées

Les 6 lignées d'hiPS éditées ont été différenciées manuellement en MSC. Afin de déterminer si ces lignées isogéniques présentent bien une perte d'expression de la neurofibromine, des analyses par Western blot ont été effectuées (Fig. 40). Les résultats sont exprimés en pourcentage correspondant à la moyenne des différentes lignées WT, hétérozygotes et homozygotes. On constate que les MSC hétérozygote (WT/ Δ) présente une diminution de 50%

de l'expression de la neurofibromine par rapport aux WT (WT/WT). Les homozygotes (Δ/Δ) quant à elles présentent une expression de seulement 6% de la neurofibromine. Ces résultats confirment donc que les lignées hétérozygotes et homozygotes ont été correctement éditées.

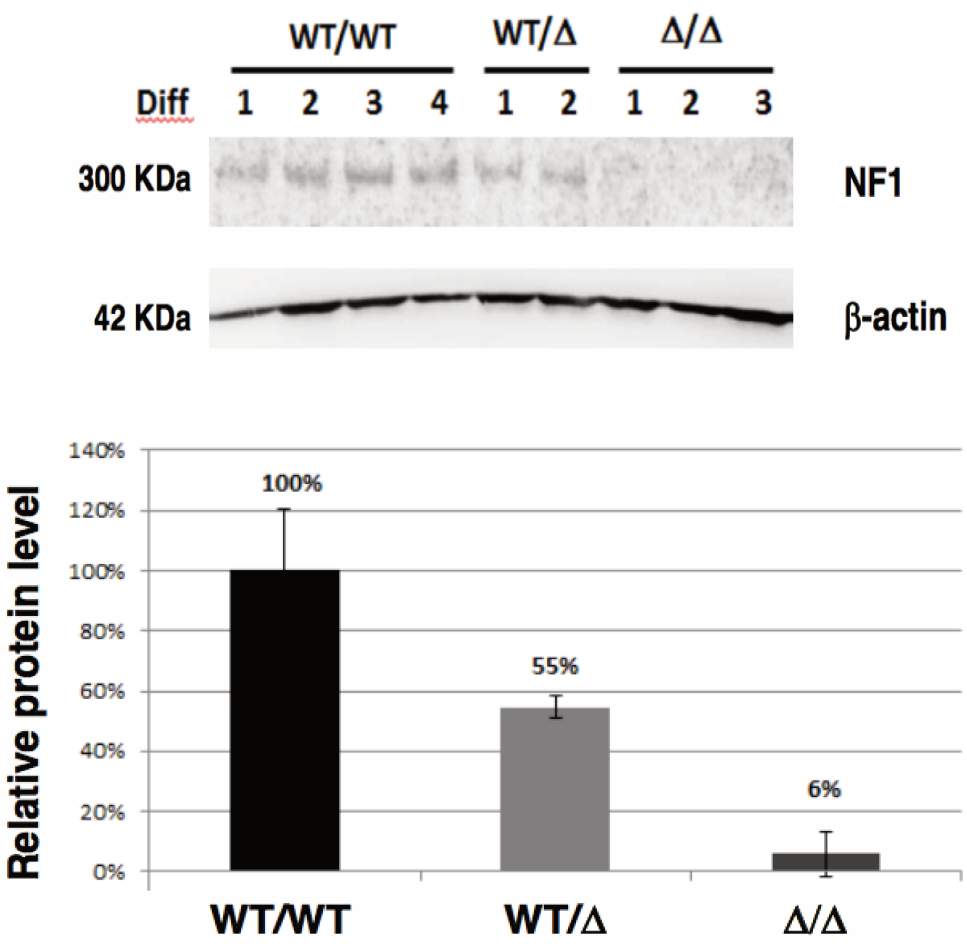


Figure 40 : Analyse de la perte d'expression de la neurofibromine dans les lignées isogéniques éditées avec la technologie CRISPR/Cas9

Les données sont normalisées par rapport au niveau d'expression de la β-actine et par rapport à la lignée WT/WT.

- Analyse du phénotype osseux dans les lignées isogéniques éditées

Pour vérifier si les lignées éditées présentent elles aussi un phénotype de différenciation osseuse, les cellules ont été marquées à la phosphatase alcaline (Fig. 41A) et au rouge alizarine (Fig. 41B) après avoir été différenciées en ostéoblastes.

On constate que les cellules mutées pour *NF1* présentent des marquages à la phosphatase alcaline et au rouge alizarine plus faibles que les cellules WT. De plus on constate que le marquage est d'autant plus faible dans les cellules homozygotes (Δ/Δ) par rapport aux cellules hétérozygotes (WT/Δ). On peut en conclure que les lignées isogéniques présentent les mêmes caractéristiques que les cellules mutées « naturellement » et que le phénotype est d'autant plus important lorsque les deux allèles de *NF1* sont mutés.

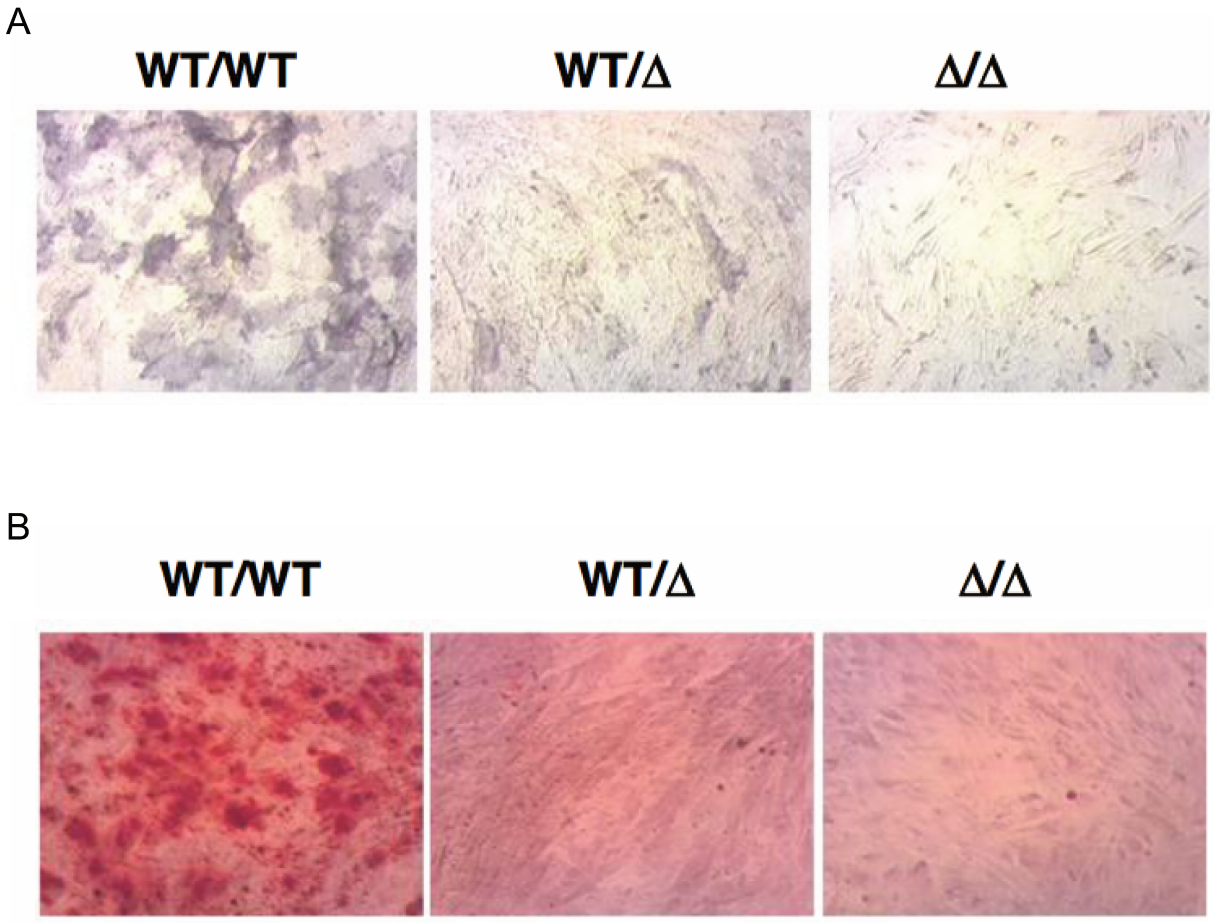


Figure 41 : Analyse du phénotype osseux dans les lignées isogéniques

(A) Marquage à la phosphatase alcaline. (B) Marquage au rouge alizarine.

8. Conclusions et perspectives.

Les résultats préliminaires de ce travail ont permis de constater que l'utilisation de cellules souches pluripotentes pouvait être un modèle pertinent pour l'étude de pathologies telles que la neurofibromatose de type 1. L'établissement de banques cellulaires standardisées au robot a permis la création de MSC dérivées d'hiPS WT et NF1 comme en témoigne l'expression des marqueurs CD29, CD44, CD73 et CD166.
Ces hiPS-MSC ont également la capacité de se différencier en adipocytes avec plus de 90% de cellules différenciées pour chaque lignée. L'analyse des voies de signalisation impactées par la perte de la neurofibromine dans les hiPS-MSC n'a pas permis de constater de modulation significative entre les hiPS-MSC WT et les hiPS-MSC NF1 tout comme aucune anomalie de prolifération des hiPS-MSC NF1 n'a été démontrée. La différenciation de ces hiPS-MSC en ostéoblastes a cependant permis d'observer que les hiPS-MSC NF1 ne parvenaient pas à se différencier correctement comparé aux hiPS-MSC WT. En effet, les hiPS-MSC NF1 présentent une coloration à la phosphatase alcaline diminuée par rapport aux ostéoblastes différenciés à partir des hiPS-MSC WT. Cette observation est confirmée par l'expression de l'ALP à plus 60% dans les hiPS-MSC WT et moins de 20% dans les hiPS-MSC NF1. L'ensemble de ces résultats laisse donc penser que les cellules mutées NF1 présentent un déficit de différenciation en ostéoblastes.

Afin d'analyser les voies de signalisation connues pour être impliquées dans la NF1, l'expression des principaux marqueurs de l'ostéogénèse (ALP, RunX2 et Col1A) a été analysée après 7 jours de différenciation dans les différents groupes. Les résultats montrent une forte variabilité entres les groupes WT et NF1, qui n'a pas permis de mettre en évidence de modulation significative des gènes étudiés entre les ostéoblastes WT et NF1.

L'analyse de l'activité de l'ALP se révèle être la méthode la plus efficace pour identifier le phénotype osseux dans les cellules mutées NF1. Afin d'étudier si des molécules actives pouvaient avoir un effet bénéfique sur la différenciation ostéoblastique des hiPS-MSC NF1, l'activité de l'ALP a été analysée au cours de la différenciation des hiPS-MSC WT et NF1 lorsque le milieu de culture était supplémenté avec des statines connues pour avoir un effet bénéfique contre l'ostéoporose. Les résultats ont confirmé que la simvastatine semblait potentialiser la différenciation des hiPS-MSC NF1-2 en ostéoblastes. Ce n'est cependant pas le cas pour les hiPS-MSC NF1-1. Ces résultats hétérogènes entre les deux hiPS-MSC NF1 peuvent être dus à la mutation NF1 qui se trouve être différentes entres les deux lignées NF1. En effet, on constate, dans le tableau 1, que les mutations engendrent des phénotypes différents chez les patients NF1. Chez le patient porteur de la mutation NF1-2, des phénotypes osseux ont été observé alors que chez le patients NF1-1, seules des suspicions de défauts osseux à venir ont été rapportés. Ceci pourrait expliquer pourquoi la hiPS-MSC NF1-2 a mieux réagit au traitement avec la simvastatine que la hiPS-MSC NF1-1. Bien que ces expériences seraient à reproduire en modulant les doses et les temps d'application des molécules utilisées, ces premières observations montrent la possibilité de réguler la différentiation en ostéoblaste afin d'atténuer le phénotype osseux dans certaines lignées. L'application directe de cette modélisation

pathologique peut donc permettre la recherche de composés capables de corriger ou de compenser les anomalies de différenciation en ostéoblastes.

Au cours de cette étude, nous avons constaté qu'il existait une variabilité entres les cellules WT et NF1 mais également une variabilité entres les WT-1 et WT-2 et les NF1-1 et NF1-2. Nous avons donc décidé de générer des lignées isogéniques grâce à la technologie CRISPR/Cas9 pour éliminer ce problème. Les nouvelles lignées reproduisent le phénotype osseux et nous avons pu constater que les cellules homozygotes NF1-/- présentaient un phénotype plus prononcé que les cellules hétérozygotes NF1+/-.

Ces résultats préliminaires laissent à penser que l'obtention d'ostéoblastes dérivés d'hiPS-MSC isogéniques donne accès à une ressource cellulaire en quantité presque illimitée, ouvrant la voie pour un criblage à haut débit permettant d'identifier de nouvelles molécules d'intérêts thérapeutiques dans le cadre du phénotype osseux observé dans la neurofibromatose de type 1.

B. Mise au point d'un protocole de différenciation des CSP en cellules de Schwann

1. Contexte de l'étude

Comme pour tout type de cellules, la mise au point d'un protocole de différenciation de cellules de Schwann à partir de CSP est particulièrement intéressante pour la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans le développement normal de la cellule de Schwann au cours de l'embryogenèse. Mais cela permet également de déceler les mécanismes moléculaires responsables de pathologies génétiques.

Aujourd'hui, la grande majorité des informations disponibles sur la migration de la crête neurale et la différenciation des cellules de Schwann précurseurs en cellules de Schwann myélinisantes proviennent d'observations faites chez l'animal (rat/souris) et extrapolées au modèle humain.

Le développement d'un protocole de production en laboratoire de cellules de Schwann humaines offre la possibilité de créer des banques de cellules stables en quantité importante, y compris de cellules pathologiques. Grâce à ces banques, il sera alors possible de penser à plus grande échelle : développement, automatisation et criblage à haut débit.

I-Stem a été parmi les pionniers en France à développer la technologie des hiPSC, appliquée à l'étude des maladies monogéniques en partenariat avec la société Phenocell qui a pour volonté de déployer des lignées iPSC et cellules différenciées de maladies rares. Le projet « cellules de Schwann NF1» s'inscrit dans la droite ligne d'un savoir-faire de pointe en matière de modélisation pathologique et d'applications à la découverte d'approches thérapeutiques innovantes.

2. Introduction

La NF1 se caractérise par des tumeurs du système nerveux périphérique (PNST), dont les neurofibromes plexiformes qui entrainent un dysfonctionnement nerveux, des déformations esthétiques, des douleurs au niveau des structures adjacentes, et qui peuvent subir une transformation maligne. Il n'y a pas de traitement efficace pour prévenir ou traiter les neurofibromes plexiformes. De plus, la recherche active de molécules thérapeutiques pour le traitement de ces manifestations se heurte à la nature « bénigne » des tumeurs associées aux cellules de Schwann dans cette pathologie.

Par ailleurs, les mélanocytes et les cellules de Schwann sont étroitement liés au cours du développement : ils proviennent tous deux de la crête neurale (Rawles, 1947, Woodhoo et

Sommer, 2008) (Figure 17). Je me suis basée en partie sur les précédents travaux de l'équipe (Allouche et al., 2013) afin de développer un protocole de différenciation en cellules de Schwann.

3. Induction des CSP vers le lignage Schwann in vitro

Des colonies de lignées de cellules hiPSC WT (PC1432 et PC069) sont isolées par traitement enzymatique doux (StemPro Accutase, ThermoFischer) afin de les dissocier en cellules individuelles. Elles sont ensuite ensemencées dans des plaques 96 puits de culture à faible adhérence qui favorise la formation de corps embryoïdes (EBs). Lors de la formation des EBs (3 premiers jours de différenciation) les cellules sont mises en présence d'un milieu classique de maintien des cellules souches (StemMACS™ iPS-Brew XF, Miltenyi). Les EBs sont déposés sur une matrice extracellulaire commerciale (Geltrex, Invitrogen) et mis en présence d'un milieu crête neurale (CN) supplémenté par les molécules SB431542 (inhibiteur des voies TGF-β/activin/Nodal) et CHIR99021 (activateur de la voie Wnt/beta-caténine via l'inhibition de GS3K) à des concentrations définies afin de favoriser l'induction vers le lignage crête neurale. D'autres petites molécules sont ajoutées après le dépôt des EBs sur le Geltrex afin d'induire une orientation des cellules vers une destinée gliale : HRG1β, membre de la famille du facteur de croissance épidermique (EGF),qui agit comme un ligand pour les récepteurs à activité tyrosine kinases de la famille ErbB; IGF1, polypeptide qui se lie au récepteur IGF-I, puissant activateur de la voie PI3K/AKT qui active également la signalisation ERK1/2 ; et le FGF2 (membre de la famille des facteurs de croissance du fibroblaste (FGF), facteur trophique exprimé entre autre par les cellules gliales et les différentes populations neuronales). Les cellules vont être cultivées à subconfluence pendant les 14 jours après dépôt des EBs, avant un premier passage. Par la suite, les cellules seront passées à chaque fois que la confluence sera atteinte. Après le premier passage, le milieu de culture est changé par un milieu qui permet une induction ciblée vers le lignage Schwann grâce à l'ajout de forskoline (FSK) avec un maintien des molécules HRG1β, l'IGF1 et FGF2. Pour finir cette étape de différenciation, au 30ème jour, le milieu est changé par du milieu commercial utilisé pour l'amplification des cellules de Schwann primaires (ScienCell™ Research Laboratory) (Fig. 42).

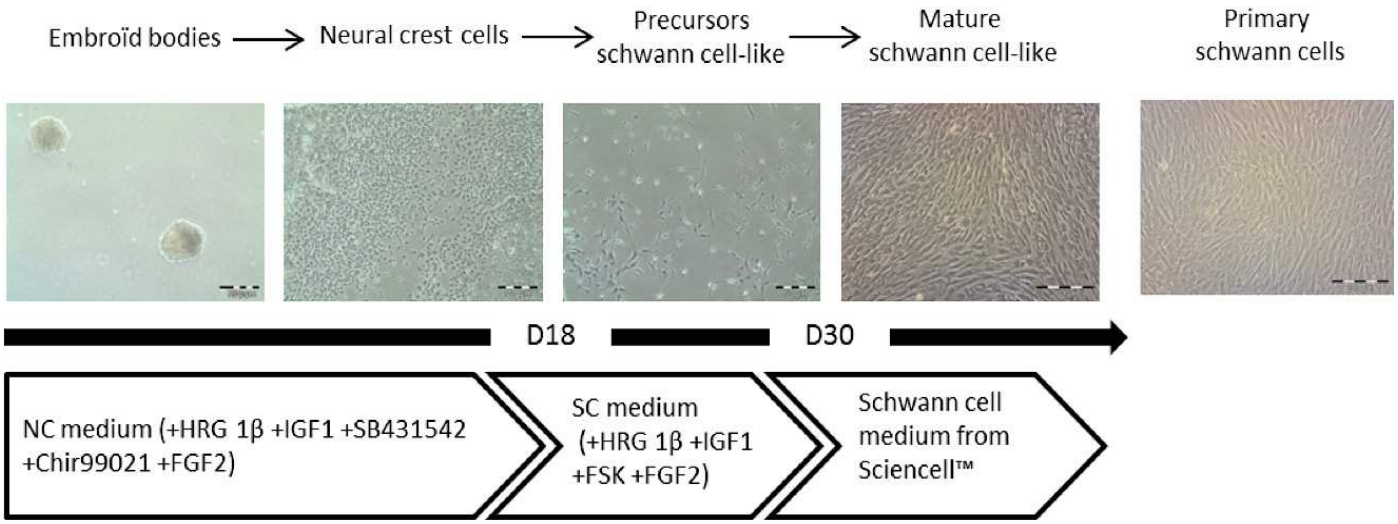


Figure 42 : Protocole de différenciation des CSP en cellules de Schwann

Des cellules de Schwann primaires (ScienCell™ Research Laboratory) servent de contrôle positif.

a) Contrôle Qualité des cellules hiPS différenciées en cellules de Schwann (hiPS-SC)

Pour caractériser les cellules hiPS-SC, j'ai d'abord comparé la morphologie des cellules différenciées avec celles des cellules de Schwann primaires contrôles distribuées par la société ScienCell™. Dans la littérature, les cellules de Schwann sont décrites comme des cellules bipolaires en forme de fuseaux avec un noyau réfringent (Lavdas et al., 2009).

- Analyse morphologique

Après 30 jours de différenciation, les hiPS-SC se présentent sous la forme d'une population homogène de cellules allongées et ordonnées mais ne présentent pas une morphologie bipolaire ni de noyaux réfringent (Fig. 43A). Cependant on constate que les cellules de Schwann primaires ScienCell™ présentent également cette morphologie allongée et ordonnée semblable à une morphologie fibroblastique. Ces cellules primaires ne présentent pas non plus de noyaux réfringents (Fig. 43B).

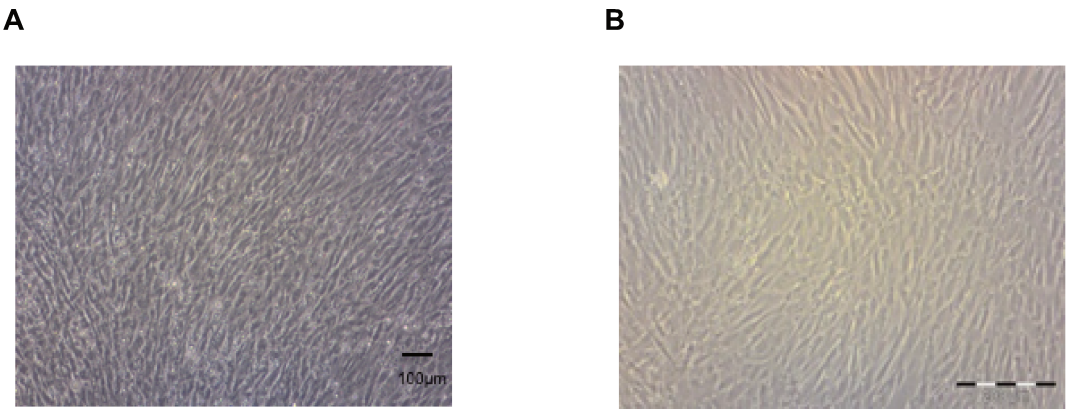


Figure 43 : Comparaison morphologique entre les hiPS-SC et les cellules de Schwann primaires ScienCell™ par microscopie optique

(A) hiPS-SC au bout de 30 jours de différenciation. (B) Cellules de Schwann primaires.

Les cellules de Schwann primaires ne présentant pas les caractéristiques morphologiques décrites dans la littérature, j'ai décidé de les comparer avec d'autres cellules de Schwann primaires. Pour cela, l'institut Cochin de Paris (UMR 8104/U1016) m'a procuré des cellules de Schwann primaires préparées à partir d'explant de nerf sciatique humain.

b) Identification d'un contrôle de qualité de cellules de Schwann primaires

Les cellules de Schwann primaires extraites d'explant de nerf sciatique (nommées E1P4) dont le contrôle qualité a été validé par l'institut Cochin (cellules positives au marqueur S10013), ont été comparées aux cellules de Schwann primaires ScienCell™ sur le plan morphologique et génique.

- Analyse morphologique

On constate que les cellules primaires E1P4 présentent une population hétérogène : les cellules étant tirées d'explant, il n'est pas surprenant que l'on retrouve plusieurs types cellulaires et notamment des fibroblastes dans les cultures. Cependant, on retrouve des cellules très allongées avec une morphologie bipolaire et des noyaux réfringents (Fig. 44).

Ces cellules présentent donc une morphologie très différente de celle des cellules de Schwann

primaires ScienCell™, qui correspond d'avantage à ce qui est décrit dans la littérature.

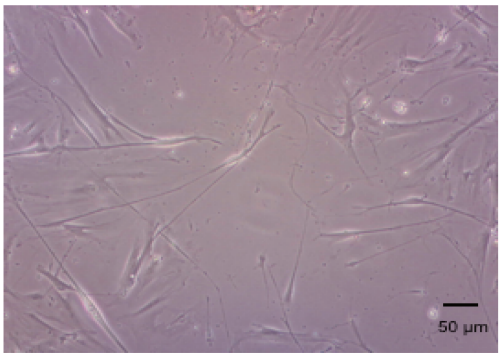


Figure 44 : Morphologie des cellules E1P4 en microscopie optique

La morphologie cellulaire n'étant pas un critère discriminant pertinent (la morphologie des cellules peut varier en fonctions de différents critères comme les conditions de cultures par exemple), j'ai analysé et comparé le profil génique de ces deux lignées de cellules primaires.

- Analyse du profil d'expression génique des cellules de Schwann primaires

Des ARN des deux lignées ont été récupérés et ont été analysés par RT-qPCR pour vérifier les niveaux d'expression des marqueurs impliqués dans le développement des cellules de Schwann. J'ai donc étudié les niveaux d'expression de : Sox10, P75 et ErbB3 qui sont exprimés durant les stades crête neurale, cellules de Schwann précurseurs et cellules de Schwann immatures; cad19, exprimé uniquement durant le stade cellules de Schwann précurseurs; GFAP, MPZ et S100 qui sont exprimés dans les cellules de Schwann précurseurs; MBP et Krox20 pour les cellules de Schwann myélinisantes (Fig. 45).
Les niveaux d'expression sont normalisés par rapport au gène de ménage CREBBP puis à l'ARN des cellules de Schwann primaires commerciales pour permettre la comparaison avec les cellules E1P4.

L'analyse du profil génique montre que les cellules E1P4 présentent de manière globale des niveaux d'expression très nettement supérieurs comparés à ceux des cellules de Schwann ScienCell™.

L'expression de P75, ErbB3, MPZ et Krox20 est plus de 100x supérieure; les niveaux d'expressions de MBP et Cad19 sont plus de 10 000x supérieurs; Sox10 et S100 sont plus de 100 000x plus exprimés. Seule l'expression de la GFAP semble être équivalente entre les deux

sources de cellules (Fig. 45).

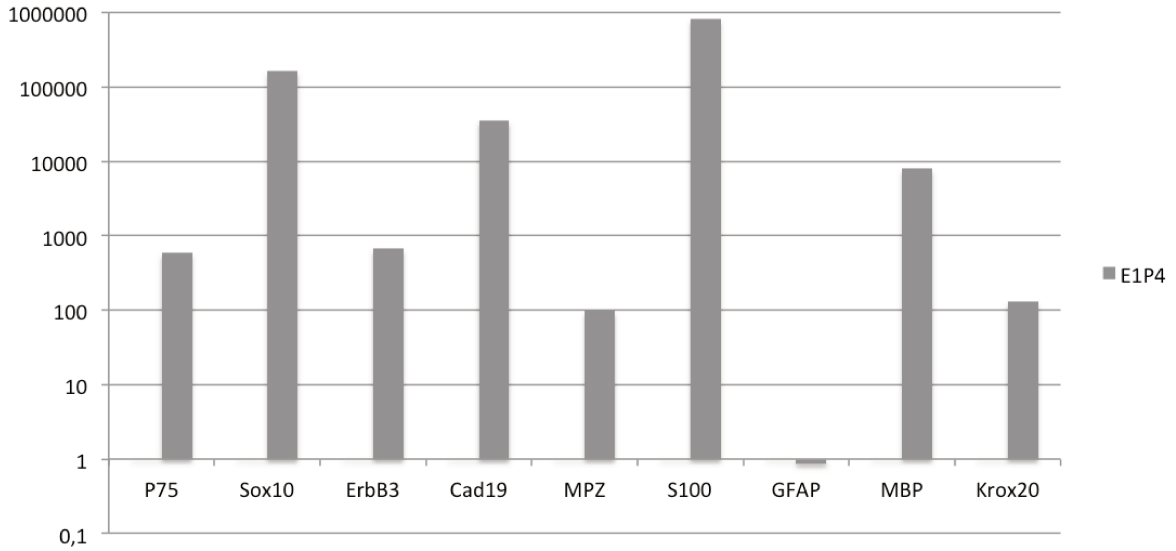


Figure 45 : Comparaison de l'expression des marqueurs de crête neurale et des marqueurs précoces et matures dans les cellules E1P4 par rapport aux cellules de Schwann ScienCell™

Pour chaque marqueur, des triplicats techniques ont été réalisés (n=1). Normalisation des niveaux d'expression sur les cellules ScienCell™.

Les cellules de Schwann primaires ScienCell™ n'ont pas été conservées comme contrôle cellulaire positif pour la validation du protocole de différenciation des hiPS-SC. Les cellules E1P4 présentent les caractéristiques morphologiques et géniques des cellules de Schwann primaires, elles seront dorénavant utilisées comme contrôle cellulaire.

c) Contrôle qualité des cellules hiPS-SC

Afin d'étudier si le protocole développé pour la différenciation des hiPS en cellules de Schwann était pertinent, j'ai étudié dans un premier temps l'évolution de l'expression des marqueurs de cellules de Schwann au cours de la différenciation.

- Analyse du profil d'expression génique des hiPS-SC en cellules de Schwann au cours de la différenciation

La figure 42 présente le protocole utilisé pour la différenciation des hiPS en cellules de Schwann. Pour rappel, durant les 20 premiers jours, les cellules sont cultivées dans un milieu qui favorise

la différenciation en cellules précoces de la lignée Schwann, puis le milieu est supplémenté avec des molécules qui favorisent leur maturation.

Lors de l'analyse des profils d'expression des marqueurs Schwann dans nos hiPS-SC au cours de la différenciation, on constate d'abord que l'expression des marqueurs évolue au cours de la cinétique jusqu'au jour 22 de différenciation (Fig. 46).
Néanmoins, les niveaux d'expression des marqueurs des cellules de Schwann au jour 22 restent moins élevés que les niveaux observés dans les E1P4 (cellules primaires contrôles). Dans les cellules primaires, les niveaux de Sox10 et ErbB3 sont plus de 10x supérieurs, les niveaux de Cad19 et MPZ sont de plus de 100x supérieurs et enfin le niveau d'expression de S100 est 1000x fois supérieur dans les E1P4 par rapport aux hiPS-SC au 22e jour de différenciation.
De plus, on constate que lorsque le milieu de culture des cellules hiPS-SC est modifié pour induire une maturation des cellules, tous les niveaux d'expressions des marqueurs Schwann chutent drastiquement.

On peut donc penser que malgré l'évolution positive des marqueurs Schwann dans nos hiPS-SC en début de différenciation, cette étape de « maturation » dans le protocole ne permet pas de différencier les cellules hiPS en cellules de Schwann. Une optimisation du protocole est donc nécessaire afin d'éviter la perte d'expression des marqueurs d'intérêts en cours de différenciation.

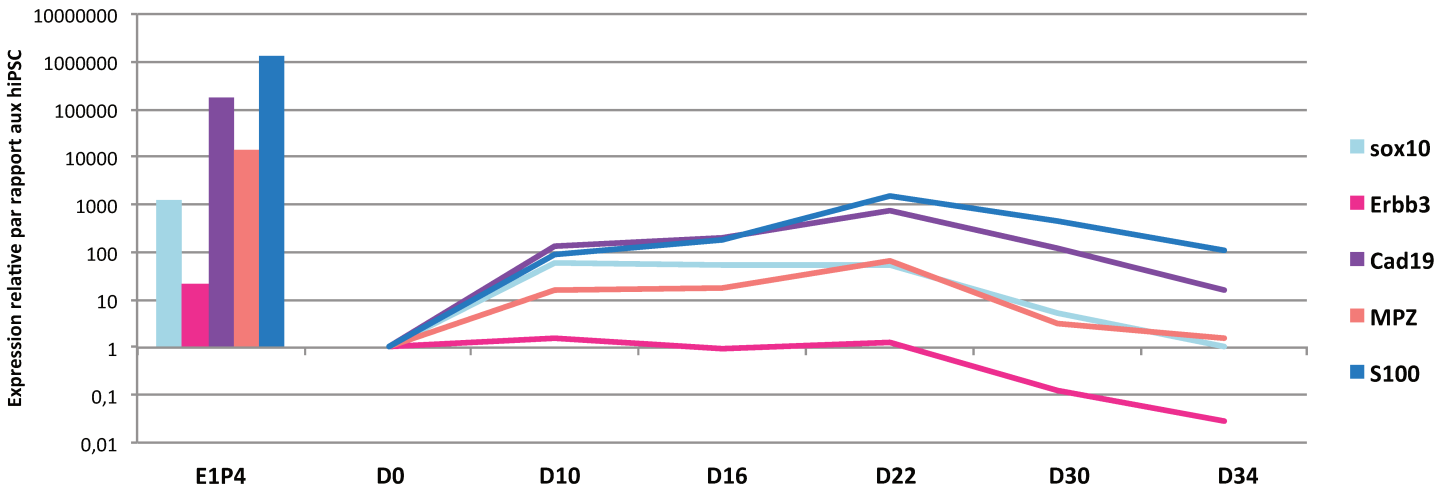


Figure 46 : Expression des marqueurs de Schwann des hiPS-SC au cours de la différenciation

Les niveaux d'expression sont normalisés par rapport au gène de ménage CREBBP puis à un ARN de référence (hiPS au jour 0). Pour chaque marqueur, des triplicats techniques ont été réalisés.

4. Optimisation du protocole d'induction des hiPS vers le lignage Schwann in vitro

A la différence du protocole initial, dans ce protocole optimisé, le milieu de culture n'est pas modifié après le premier passage (Fig. 47). Les cellules sont maintenues en culture pendant une trentaine de jours dans le même milieu de culture. A partir du 30ème jour de différenciation, les cellules ont été caractérisées par l'analyse de leur morphologie, de leur profil d'expression génique et protéique et enfin par leur capacité d'interaction avec des motoneurones.

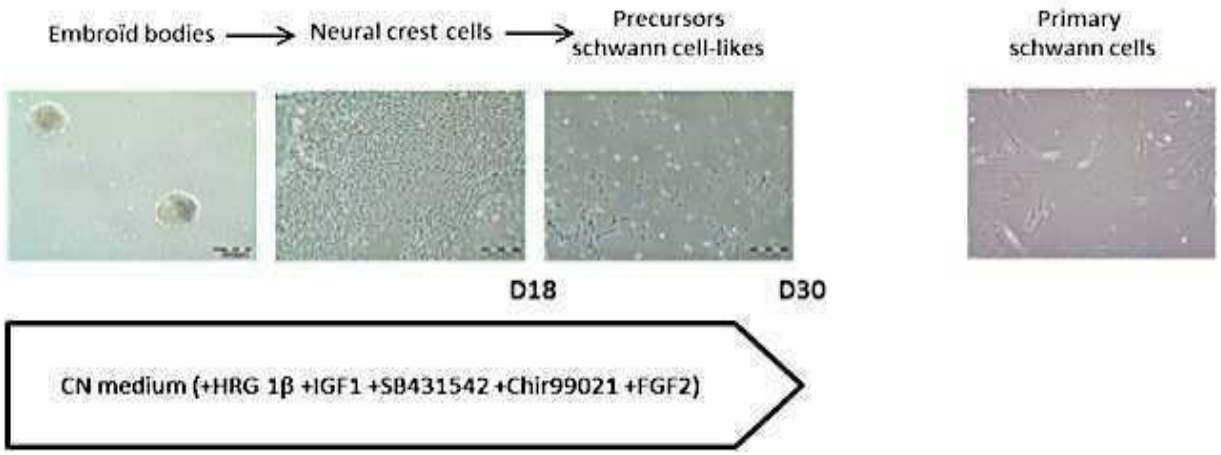


Figure 47 : Optimisation du protocole de différenciation des hiPS en cellules de Schwann

a) Analyse morphologique

Après 30 jours de différenciation, les hiPS-SC se présentent sous la forme d'une population hétérogène. On retrouve des petites cellules non réfringentes mais également des cellules plus allongées bipolaires et réfringentes (Fig. 48) semblables aux E1P4.

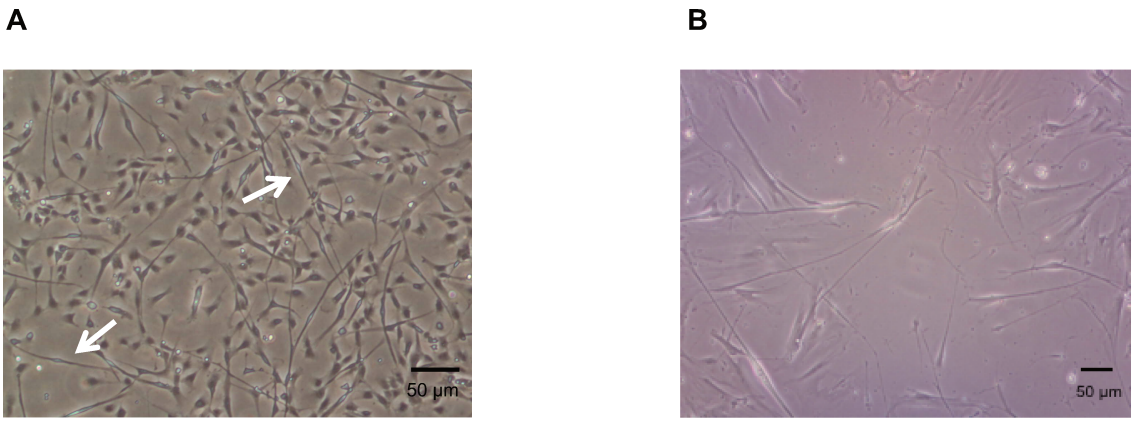


Figure 48 : Analyse morphologique par microscopie optique des hiPS-SC

(A) Morphologie des hiPS-SC au jour 30 de différenciation. Les flèches blanches montrent les cellules allongées et réfringentes. (B) Morphologie des E1P4.

b) Analyse du profil d'expression génique des hiPS-SC en cellules de Schwann au cours de la différenciation

En faisant le choix de ne plus modifier le milieu de culture des hiPS-SC au cours de la différenciation, on observe que les niveaux d'expression des marqueurs maintiennent leur augmentation au cours de la différenciation (Fig. 49).

Dans les cellules primaires, les niveaux de Sox10 sont toujours plus de 10x supérieurs. Cependant, les marqueurs Cad19 et S100 des hiPS-SC sont 10 fois plus exprimés dans le nouveau protocole par rapport à l'ancien protocole. De la même manière, les marqueurs ErbB3 et MPZ sont plus exprimés dans les hiPS-SC comparés aux niveaux d'expression de ces marqueurs dans les hiPS-SC de l'ancien protocole.

Ces résultats montrent que l'optimisation du protocole a permis de générer des cellules qui présentent un meilleur profil de cellules de Schwann.

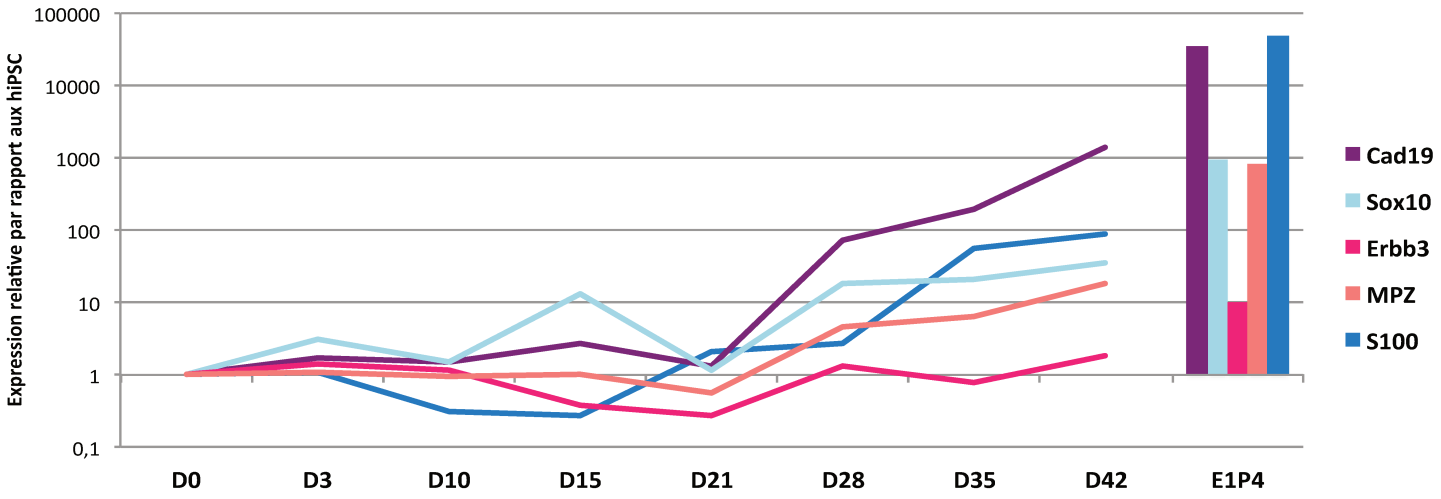


Figure 49 : Expression des marqueurs de cellules de Schwann des hiPS-SC au cours de la différenciation

Les niveaux d'expression sont normalisés par rapport au gène de ménage CREBBP puis à un ARN de référence (hiPS au jour 0). Pour chaque marqueur, des triplicats techniques ont été réalisés.

c) Analyse du profil protéique des hiPS-SC

Pour compléter l'analyse des transcrits, j'ai étudié le profil d'expression protéique des hiPS-SC à la fin de la différenciation.

- Cytométrie en flux

L'analyse par cytométrie en flux du marqueur des précurseurs de cellules de Schwann, Cad19, dans les hiPS-SC montre une population cellulaire de 23.6% qui exprime cette protéine au jour 30, confirmant que les différentes molécules ajoutées au milieu crête neurale (SB, CHIR, HRG1[3, IGF1 et FGF2) induisent l'engagement des cellules souches vers le lignage des cellules de Schwann (Fig. 50). Cela montre également que la population cellulaire est hétérogène. Il reste donc à savoir si cette population non positive à Cad19 est composée de cellules de Schwann à des stades de développement différents ou bien s'il s'agit d'un autre type cellulaire.

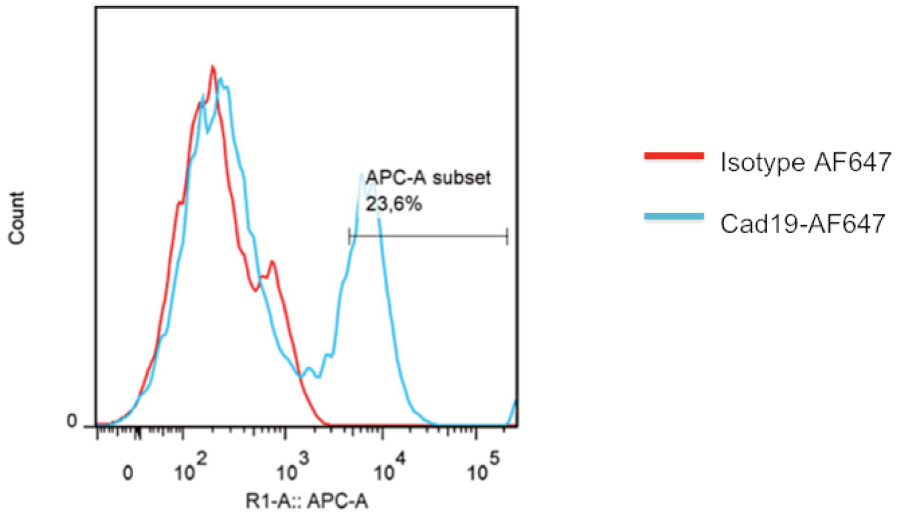


Figure 50 : Analyse par cytométrie en flux du marqueur des cellules de Schwann précurseurs Cad19 au 30e jour de différenciation

- Analyse par western blot

L'analyse de l'expression protéique par western blot (Fig. 51), confirme la présence de P75, Cad19 et GFAP dans les hiPS-SC. On observe l'expression de P75 dans les hiPS-SC à un niveau équivalent de celui des cellules E1P4. Il y a une très forte expression de GFAP dans les hiPS-SC mais pas d'expression dans les E1P4. Cela peut être expliqué par le caractère transitoire de la GFAP (Bianchini et al., 1992), exprimé au stade cellules de Schwann immatures. Cad19 est présent dans les cellules hiPS-SC et pas dans les E1P4 car il s'agit d'un marqueur présent uniquement dans les cellules de Schwann précurseurs (Jessen et Mirski 2005). L'absence d'expression de Pax3 (marqueur exprimé dans les mélanocytes) confirme que les cellules différenciées ne se sont pas engagées dans le lignage mélanocytaire.

Ces résultats montrent que les cellules différenciées semblent être bien engagées vers le lignage des cellules de Schwann précurseurs. Cependant, on ne retrouve pas d'expression de la MBP, ni pour les cellules différenciées ni pour les cellules primaires tirées d'explant. Cette absence d'expression chez les cellules primaires pourrait être expliquée par la plasticité des cellules de Schwann qui peuvent revenir à un stade plus immature lorsque elles ne sont plus en contact avec des cellules neuronales. Les cellules MHN (mélanocytes primaires humains) ont servi de contrôle négatif. Les cellules k4603 45 (kératinocytes dérivés d'hiPS) ont servi de contrôle négatif absolu car elles n'expriment aucun des marqueurs analysés.

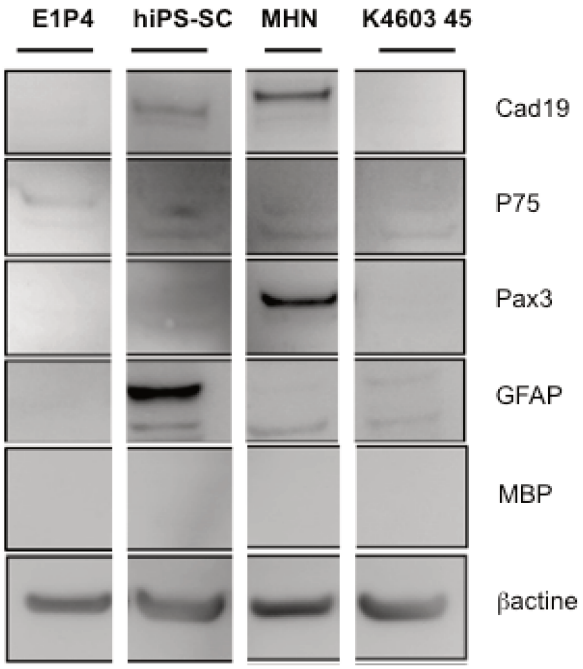


Figure 51 : Analyse par Western blot de l'expression protéique de Cad19, P75, Pax3, GFAP et MBP

d) Capacité des hiPS-SC à établir une interaction avec des motoneurones

Afin d'évaluer le potentiel fonctionnel des cellules de Schwann dérivées d'hiPS, des hiPS-MN (motoneurones issus d'hiPS WT différenciés à Phenocell) ont été mis en culture sur une couche nourricière non homogène de cellules hiPS-SC. L'étude de Haastert et al. a montré que les cellules de Schwann agissent comme une couche nourricière en apportant un support trophique aux motoneurones. Elles favorisent la croissance, la maturation et le développement fonctionnel des motoneurones cultivés pendant une période allant jusqu'à 4 semaines et la formation de réseaux neuronaux physiologiquement actifs (Haastert et al., 2005).

- Analyse morphologique des cocultures hiPS-SC/hiPS-MN

7 jours après la mise en coculture avec les hiPS-MN, on peut observer la mise en place de prolongements axonaux dans les plaques de cultures (Fig. 52A). On constate également une mort cellulaire importante des hiPS-MN lorsqu'ils sont mis en culture seuls sans couche nourricière de hiPS-SC. On peut donc en déduire que les cellules de Schwann dérivées à partir des hiPS jouent un rôle important dans le maintien et la survie des motoneurones comme le ferait des cellules de Schwann primaires.

Dès 15 jours, on peut observer un épaississement des prolongements axonaux qui, lorsque l'on

regarde à plus fort grossissement, correspond à l'alignement de cellules le long de ces axones (Fig. 52C).

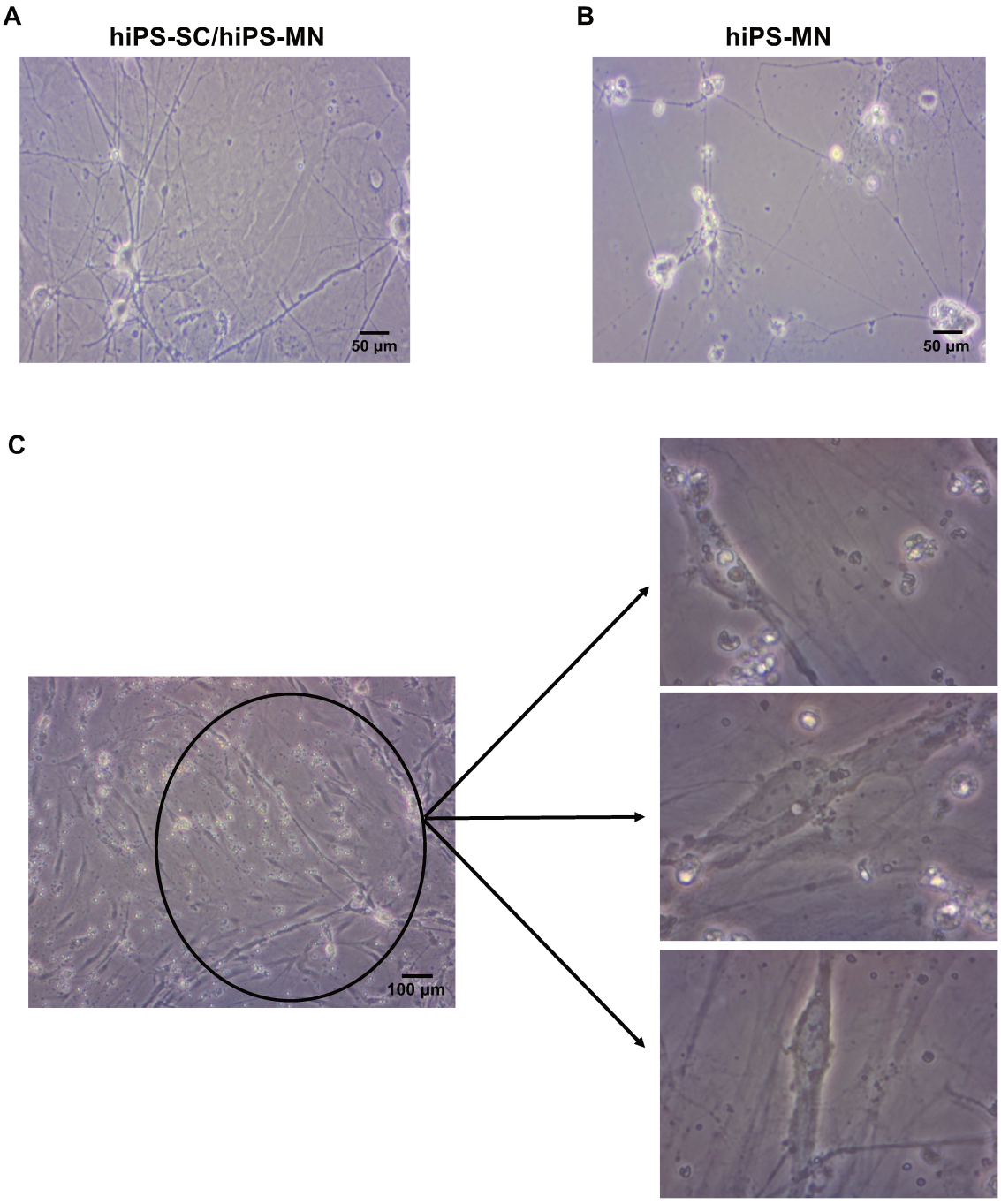


Figure 52 : Analyse morphologique de la co-culture hiPS-SC/hiPS-MN par microscopie optique

(A) Morphologie de la coculture hiPS-SC/hiPS-MN au bout de 7 jours. (B) Morphologie des hiPS-MN seuls après 7 jours de culture dans les mêmes conditions. (C) J15 de co-culture, les hiPS-MN forment des allongements axonaux sur lesquels on observe des noyaux accolés (grossissement).

- Profil d'expression génique des co-cultures hiPS-SC/hiPS-MN

L'analyse des profils d'expression des marqueurs de cellules de Schwann : Sox10, GFAP, S100 et Krox20 dans les conditions de co-culture de hiPS-SC avec hiPS-MN a confirmé le bénéfice de la co-culture (Fig. 53).
On observe une très nette augmentation de l'expression des quatre marqueurs dans les co-cultures hiPS-SC/hiPS-MN par rapport aux cellules hiPS-SC et hiPS-MN.

Krox20 est un marqueur des cellules de Schwann matures et pro-myélinisante, il n'est ni exprimé dans les hiPS-MN ni dans les hiPS-SC mais on observe qu'il est exprimé dans les co-cultures hiPS-SC/hiPS-MN.

Ces résultats préliminaires suggèrent que l'interaction entre les hiPS-MN et les hiPS-SC a permis de faire maturer les cellules de Schwann dérivées d'hiPS. De plus, le fait que les motoneurones seuls n'expriment pas ou très peu ces marqueurs confirme que l'augmentation des niveaux d'expression est due aux cellules de Schwann dérivées des hiPS.

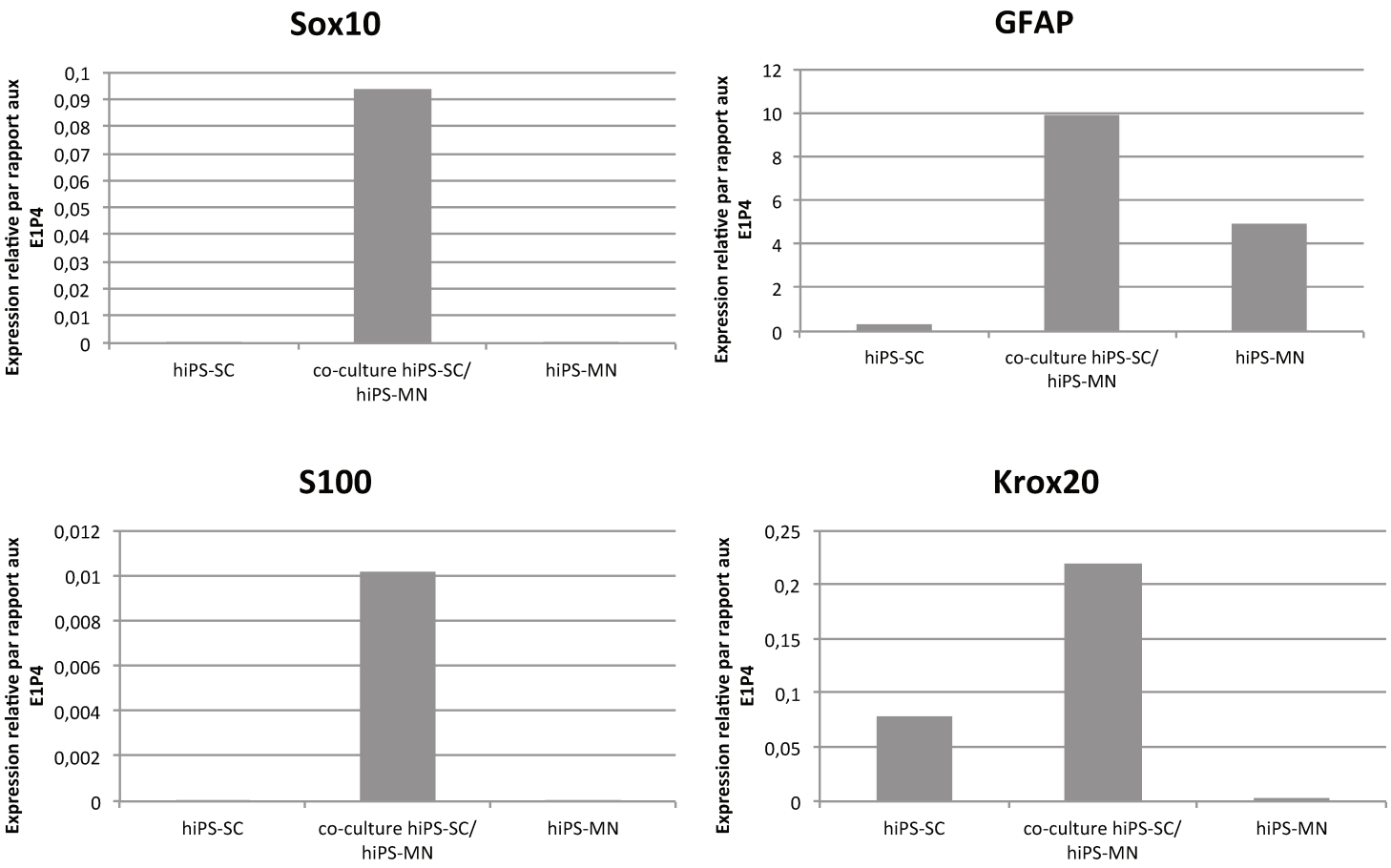


Figure 53 : Comparaison de l'expression des marqueurs Schwann Sox10, GFAP, S100 et Krox20 entre les hiPS-SC, les co-cultures hiPS-SC/hiPS-MN et les hiPS-MN

Les niveaux d'expression sont normalisés par rapport au gène de ménage CREBBP puis à un ARN de référence (E1P4). Pour chaque marqueur, des triplicats techniques ont été réalisés.

- Caractérisation des co-cultures hiPS-SC/hiPS-MN par immunohistochimie

A J21, les co-cultures de motoneurones différenciés à partir de la lignée d'hiPS PC069 et de cellules de Schwann différenciées à partir de la lignée PCi1432 ont été caractérisées par immunofluorescence.

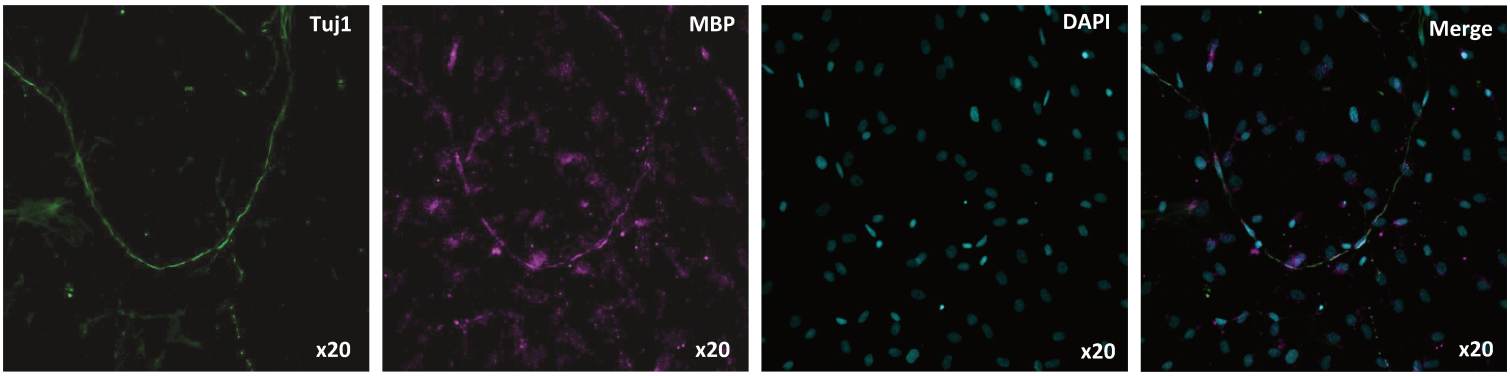
L'analyse montre une expression cytoplasmique de MBP le long des axones positifs au marqueur TUJ1, exprimé dans les motoneurones (Fig. 54A). L'analyse par vue orthogonale (Fig. 54B) et en 3D (Fig. 54C) en microscopie confocale montre des cellules de Schwann positives au CFSE (en vert) qui englobent des motoneurones marqués au TUJ1 (en magenta). Le CFSE est un colorant fluorescent, perméable aux cellules et qui se couple par covalence via son groupe succinimidyle à des molécules intracellulaires (Parish 1999), notamment à des résidus de lysine

intracellulaires et à d'autres sources d'amines. En raison de cette réaction de couplage covalente, le CFSE peut être retenu dans les cellules pendant des périodes extrêmement longues. De plus, en raison de cette liaison stable, une fois incorporé dans les cellules, le colorant n'est pas transféré aux cellules adjacentes. Le CFSE peut être utilisé pour surveiller la prolifération cellulaire, à la fois in vitro et in vivo, en raison de la réduction progressive de moitié de la fluorescence CFSE dans les cellules filles après chaque division cellulaire.

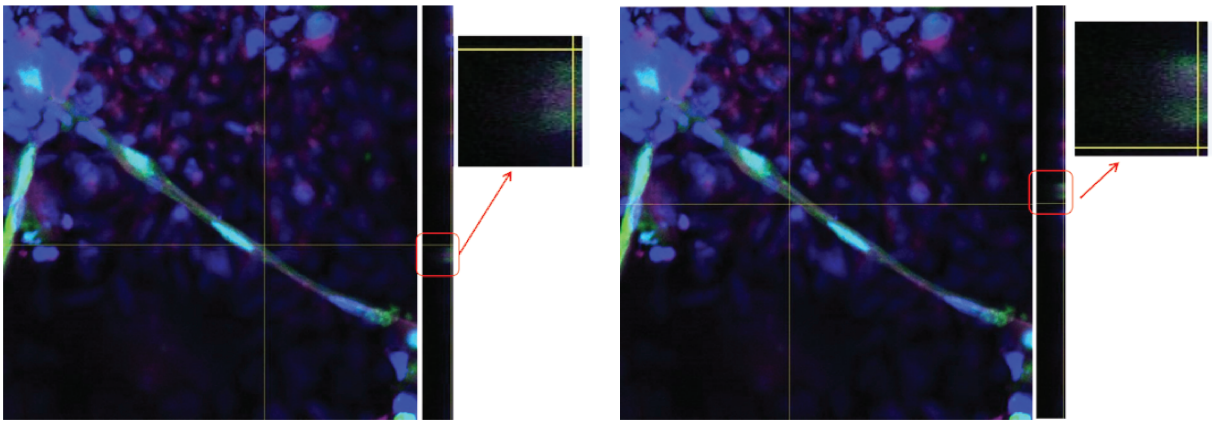
J'ai pris le parti de marquer toutes ces cellules hiPS-SC au CFSE afin de pouvoir visualiser l'ensemble des cellules provenant de la différenciation en cellules de Schwann. Cette population étant hétérogène, il se peut que certaines cellules ne soient pas encore des cellules de Schwann matures et/ou myélinisantes. Le marquage avec un anticorps anti-MBP ne semblait donc pas être le marqueur le plus adapté pour la caractérisation de la population de cellules de Schwann différenciées à partir des hiPS.

Ces résultats démontrent que les hiPS-SC ont la capacité d'interagir avec les hiPS-MN en s'accolant le long de leurs axones comme le feraient des cellules de Schwann primaires, validant ainsi le caractère « Schwann » des cellules différenciées à partir des hiPS à l'aide de notre protocole.

A



B



C

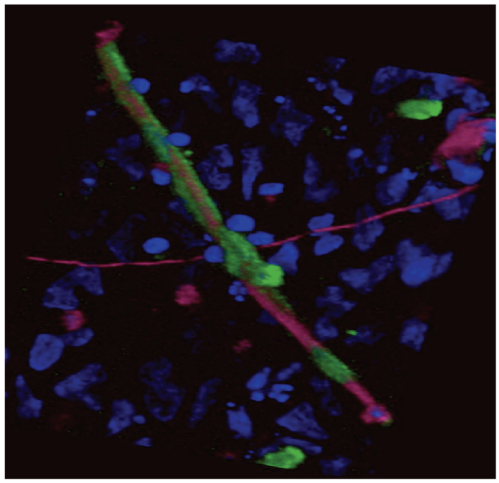


Figure 54 : Analyse par immunofluorescence des co-cultures hiPS-SC/hiPS-MN

(A) les hiPS-SC sont positives pour MBP (magenta) et les axones des hiPS-MN sont positifs à TUJ1 (vert). (B) Analyse en coupe orthogonale en microscopie confocale. (C) Représentation 3D en microscopie confocale d'un axone d'hiPS-MN positif pour TUJ1 (magenta) entouré de cellules marquées au CFSE (vert)

5. Conclusion et Perspectives

Les résultats préliminaires de ce travail montrent le développement d'un protocole de différenciation de cellules hiPS en cellules de Schwann en tentant de s'approcher de la biologie du développement. L'engagement vers la crête neurale est assuré par l'introduction de SB431542 et de CHIR99021 dès le 3ème jour et l'engagement vers le lignage de cellules de Schwann est assuré grâce à l'ajout de HRG1β, l'IGF1 et FGF2.

En effet, en étudiant l'expression des marqueurs spécifiques des différents stades d'évolution de la cellule de Schwann, on constate que les cellules différenciées à partir d'hiPS passent par un stade crête neurale tout en évoluant vers un stade de cellules de Schwann précurseurs. L'expression de S100β et Cad19 témoigne du caractère précoce des cellules différenciées et la faible proportion de cellules qui expriment Cad19 confirme le caractère hétérogène de la population obtenue.

La complexité de la caractérisation de la cellule de Schwann dans cette étude résulte de la variation d'expression des différents gènes aux différentes étapes de maturation (Woodhoo et al., 2008). Prenons par exemple Cad19, qui ne se retrouve exprimé que dans les cellules de Schwann précurseurs (Jessen et al., 2005). L'hypothèse que la faible proportion de cellules positives pour Cad19 reflète une hétérogénéité de maturation des cellules de Schwann est confirmée par l'analyse protéique au même stade de différenciation qui montre une forte expression de la GFAP, marqueur des cellules de Schwann immatures ou non myélinisantes. L'absence d'expression de MBP qui est une protéine de cellule de Schwann myélinisante peut être expliquée par l'absence d'interaction avec des axones de cellules neuronales, qui contrarie la maturation terminale de la cellule de Schwann. Le protocole établi en l'état ne permet que la production de cellules précoces qui ont le potentiel de devenir des cellules de Schwann matures en présence de leur cible physiologique (Corfas et al., 2004).

Dans l'objectif d'avoir la confirmation que ces cellules ont la capacité de maturer et d'assurer leurs capacités d'interaction avec les motoneurones, j'ai mis en place un protocole de co-culture avec des motoneurones eux aussi dérivés des cellules hiPSC. De manière générale, la co-culture avec des cellules de Schwann est habituellement établie avec des neurones ganlionnaires de rats ou de cellules neuronales primaires (Päiväläinen et al., 2008 ; Hyung et al., 2015). Dans notre cas, nous avons fait le choix de s'approcher au maximum d'un modèle le plus physiologique possible et 100% humain.

L'analyse en microscopie a confirmé la présence de MBP le long des axones de motoneurones. De plus, j'ai constaté que les cellules qui exprimaient la MBP adoptaient une conformation

particulière en « chapelet » le long des axones caractéristique des cellules de Schwann.

Pour vérifier les résultats obtenus en microscopie classique, j'ai choisi d'observer nos co-cultures à l'aide d'un microscope confocal après marquage au CFSE de notre population hétérogène de cellules de Schwann cultivée an présence de motoneurones différenciés. Les analyses orthogonales et 3D après 7 jours de co-culture ont montré que les cellules de Schwann englobaient les axones des motoneurones. Les cellules de Schwann étant les seules cellules capables de s'accoler contre un axone (leurs homologues du SNC, les oligodendrocytes ne s'accolent pas contre les motoneurones, ce sont leurs extensions dendritiques qui viennent s'enrouler autour de l'axone), il est permis de penser que nos cellules différenciées sont bien des cellules de Schwann matures.

Ce protocole n'est aujourd'hui qu'une ébauche dans le cadre de la différenciation des cellules de Schwann à partir de CSP. Il a cependant l'avantage de démontrer la capacité fonctionnelle des cellules obtenues. La prochaine étape consiste en l'analyse par microscopie électronique afin de vérifier la mise en place de gaine de myéline autour des axones avec des temps de culture plus longs.

Malgré tout, l'obtention de cellules de Schwann précurseurs en une trentaine de jours capable de maturer en une dizaine de jours est prometteuse pour la suite. Nous avons d'ailleurs, tenter d'établir des banques cellulaires en congélant les cellules différenciées (voir annexe 1). En effet, l'optimisation de ce protocole permettra d'obtenir des populations plus homogènes de cellules de Schwann. Ce système de différenciation *in vitro* pourrait révéler de nouveaux mécanismes moléculaires dans des maladies associées à un défaut de développement de la gaine de myéline telle que la maladie de Charcot Marie Tooth.

Après une optimisation du protocole afin de pouvoir obtenir une population homogène, l'accès à une telle ressource cellulaire en quantité presque illimitée ouvre également la voie pour le criblage à haut débit permettant d'identifier de nouvelles molécules d'intérêts thérapeutiques.

VIII. Discussion

Les cellules souches pluripotentes humaines (hCSP) apportent un bénéfice considérable dans la recherche scientifique et médicale. En effet, la recherche sur les processus de différenciation et la compréhension pour contrôler la différenciation des cellules souches en laboratoire donne un aperçu de la façon dont l'Homme se développe de l'embryon à l'adulte (Zhang et al., 2013). La différenciation dirigée de cellules ou de tissus peut être utilisée à des fins spécifiques telles que la modélisation de maladies d'origines génétiques (Marteyn et al., 2011), le criblage à haut débit de molécules potentiellement thérapeutiques (Choi et al., 2013; Sirenko et al., 2014) et la thérapie cellulaire (Nair et al., 2015; Schwartz et al., 2015).
Bien que la recherche sur les cellules souches ait progressé rapidement, il reste de nombreux défis à relever pour permettre l'utilisation de cellules souches pour la découverte de médicaments ou la médecine régénérative.

A. Modélisation pathologique : avantage de l'utilisation des hCSP

La modélisation expérimentale des troubles humains permet de définir les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents aux maladies et de mettre au point des thérapies pour les traiter.

L'utilisation des cellules souches pluripotentes humaines (hCSP), capables de s'auto-renouveler et de se différencier en pratiquement tous les types cellulaires, représente aujourd'hui un avantage exceptionnel dans l'étude du développement normal et pathologique humain. Elles constituent un outil puissant pour surmonter les limites des modèles animaux pour certains troubles.

La capacité de modéliser les maladies humaines à l'aide d'hCSP en culture a révolutionné la façon dont nous étudions les troubles monogéniques, complexes et épigénétiques, ainsi que les maladies à début précoce et tardif. Plusieurs stratégies sont utilisées pour générer de tels modèles de maladie en utilisant soit des cellules souches embryonnaires (hES), soit des hCSP induites spécifiques aux patients (hiPS), créant de nouvelles possibilités pour l'établissement de modèles *in vitro* pertinents et leurs utilisations dans le dépistage et le test de composés pharmacologiques potentiellement thérapeutiques.

Un des avantages majeurs de l'utilisation des hiPS à défaut des hES est de pouvoir s'affranchir de la question éthique posée par l'ultilisation des hES. Il est alors possible de multiplier le nombre de lignées d'hiPS (saines et porteuses de mutations) utilisées pour l'étude d'une pathologie. Ceci est un avantage majeur puisque répliquer le phénotype pathologique dans des

cellules avec un fond génétique différent permet de « lisser » les variabilités inter-individus.

Les premiers modèles d'hiPS pour l'étude de maladies humaines, ont été rapportés chez des patients atteints de troubles neurologiques. Cela peut être dû au fait que les premiers protocoles de différenciation des hES étaient axés sur les neurones (Zhang et al., 2001). Les troubles neurodégénératifs tels que la sclérose latérale amyotrophique (SLA) (De Boer et Eggan, 2015 ; Dimos et al., 2008 ; Mitne-Neto et al., 2011 ; Bilican et al., 2012 ; Wainger at al., 2014 ; Chen et al., 2014 et Sances et al., 2016), la maladie de Huntington (Juopperi et al., 2012 ; Zhang et al., 2010), la maladie de Parkinson (Jiang et al., 2012 ; Sanchéz-Dané et al., 2012) et la maladie d'Alzheimer (Kondo et al., 2013 ; Israel et al., 2012 ; Yagi et al., 2011) comptent parmi les troubles les plus étudiés avec les hiPS. Il a été rapporté que les neurones issus de ces troubles ont une morphologie neuronale altérée, notamment une dégénérescence des neurites, une réduction de la taille du soma et une morphologie mitochondriale perturbée. La formation d'agrégats de protéines a été observée dans les neurones, tout comme l'augmentation du stress cellulaire. La capacité des neurones, dérivés *in vitro*, de récapituler les phénotypes cellulaires est remarquable puisque ces troubles sont généralement présents chez les individus âgés alors que les neurones différenciés d'hiPS représentent des neurones foetaux.

Un trouble neurodégénératif qui affecte les jeunes enfants, l'atrophie musculaire spinale (SMA), a également été modélisé en utilisant des hiPS par plusieurs groupes (Ebert et al., 2009 ; Yoshida et al., 2015). Les phénotypes cellulaires associés à cette maladie comprennent une hyperexcitabilité, une taille de soma plus petite, des synapses incomplètes et une réduction des structures d'agrégats cytoplasmiques et nucléaires, appelées gemmes. Des hiPS provenant d'individus atteints de dysautonomie familiale, une neuropathie périphérique mortelle, ont également été créés (Lee et al., 2009).

Les troubles psychiatriques ont également été modélisés à l'aide d'hiPS comme la schizophrénie (Brennand et al., 2015 ; Pedrosa et al., 2011 ; Topol et al., 2015) et le trouble bipolaire (Mertens et al., 2015 ; Madison et al., 2015); le trouble du spectre autistique idiopathique (Mariani et al., 2015 ; Griesi-Oliveira et al., 2015); et la paraplégie spastique héréditaire (Zhu et al., 2014 ; Denton et al., 2014). Bien que la schizophrénie et les troubles du spectre autistique n'aient pas de causes génétiques connues chez les individus les plus affectés, ils ont une héritabilité élevée. Les hiPS ont été dérivées soit de l'un des rares sous-types génétiques connus de ces troubles, de familles avec un schéma de transmission autosomique dominant net, ou d'un individu atteint d'une maladie grave à l'apparition précoce. Illustrant ainsi la capacité des hiPS à modéliser des troubles d'étiologies génétiques inconnues. Par exemple, les hiPS dérivées d'individus présentant différentes formes de paraplégie spastique héréditaire réduisent la variété de phénotypes cellulaires associés à plusieurs troubles phénotypiquement similaires.

Comme décrite dans l'introduction, la neurofibromatose de type 1 est une maladie multi-systémique avec un taux de mutations extrêmement élevés sans de corrélation génotype/phénotype avérée. Cependant certains symptômes sont pathognomoniques de la maladie telles que les taches café-au-lait, les défauts osseux et les neurofibromes. D'ailleurs, Allouche et al., a utilisé des mélanocytes dérivés d'hES pour étudier l'aspect hyperpigmentaire des taches café-au-lait associé à la NF1 (Allouche et al., 2015). Ils ont ainsi pu définir les mécanismes moléculaires responsables de l'hyperpigmentation. Il a été démontré que ces mécanismes impliquent une activation de la voie AMPc et de la voie ERK, entrainant une dérégulation des principaux facteurs impliquées dans la biosynthèse de la mélanine et dans la biogénèse des mélanosomes. Ils ont également démontré que l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de ces voies pouvait moduler l'hyperpigmentation associée à NF1. Tous ces résultats confirment la pertinence des hCSP comme modèle d'étude pour la NF1.

B. La modélisation pathologique de la neurofibromatose de type 1 à partir de hiPS.

La différenciation de deux lignées de cellules souches induites à la pluripotence humaines porteuses des mutations (c.1721+3A>G et c.2412delT) sur le gène *NF1* a permis d'obtenir des populations homogènes de cellules souches mésenchymateuses (MSC). Ces cellules ont ensuite été différenciées en ostéoblaste afin d'étudier la corrélation entre l'impact de la perte de la neurofibromine et le phénotype osseux observé chez les patients NF1.

Dans l'étude menée par l'équipe de Wu et al., il a été démontré, dans un modèle murin, que la neurofibromine joue un rôle crucial dans la modulation de la différenciation des MSC en ostéoblastes et que le défaut de différenciation des ostéoblastes pourrait contribuer, au moins en partie, aux anomalies osseuses observées chez les personnes atteintes de NF1 (Wu et al., 2006).

Pour cela, ils ont tout d'abord analysé la capacité proliférative des MSC Nf1+/- par rapport aux MSC WT. Ils ont constaté que l'haploinsuffisance en *Nf1* induisaient une augmentation de l'activité télomérase et par conséquent associé à une prolifération plus importante des MSC Nf1+/-. Dans notre modèle de MSC dérivées d'hiPS NF1+/-, les analyses prolifératives n'ont pas démontré de différences significatives entres les lignées MSC dérivées d'hiPS NF1+/- et les lignées dérivées d'hiPS WT. Ces résultats contradictoires peuvent être imputés à la différence d'espèces des modèles étudiés, en effet, il n'existe pas, à notre connaissance, de travaux présentant une prolifération augmentée dans les MSC humaines porteuses de mutations *NF1*.

Dans cette même étude de Wu et al., ils ont mis en évidence une différenciation moins importante des MSC Nf1+/- en ostéoblastes par rapport à leurs homologues WT. En effet, les ostéoblastes différenciés à partir des MSC Nf1+/- présentaient des marquages à la phosphatase alcaline (ALP) moins important que dans les ostéoblastes différenciés à partir des MSC WT. Ces résultats ont été confirmés par l'analyse par qPCR des marqueurs ostéogéniques ostéocalcine et ostéonectine, qui montrent une diminution de l'expression de leurs transcrits dans les ostéoblastes Nf1+/-. Nous avons également observé ce phénotype de différenciation altérée dans nos ostéoblastes différenciés à partir des MSC NF1+/-. En effet, les marquages à l'ALP (marqueur précoce de l'ostéogénèse) et au rouge alizarine (marqueur spécifique de la minéralisation dans les ostéoblastes) étaient moins important des les cellules NF1. Ces résultats ont été confirmés par le dosage de l'activité de l'ALP qui était diminuée dans nos ostéoblastes NF1 indiquant que la perte de la neurofibromine impactait la différenciation ostéoblastique. Nous avons également étudié l'évolution de l'expression des marqueurs spécifiques de l'ostéogénèse tels que l'ALP, RUNX2 et COL1A au cours de la différenciation des MSC NF1 et WT en ostéoblastes. Malheureusement les résultats obtenus ne permettent pas de mettre en évidence des différences d'expressions significatives entre les cellules WT et les NF1. En effet, on observe des différences entre les cellules WT et NF1 mais également entre les deux lignées WT et les deux lignées NF1.

Wu et al., a réussi à restaurer le phénotype osseux en induisant la ré-expression de GRD dans les MSC Nf1+/- (par transduction d'un rétrovirus recombinant codant pour le domaine GRD), indiquant que la différenciation réduite des ostéoblastes est directement associée à l'activité Ras. Nous nous sommes donc intéressé, aux voies de signalisations MAPK et PI3K en aval de RAS. Les analyses protéiques n'ont pas permis d'affirmer une sur-activation de ces voies dans notre modèle.

L'équipe de Davidson et al., a été la première à mettre en évidence une double inactivation de *NF1* dans le tissus osseux humain prélevé de pseudarthrose tibiale (Davidson et al., 2006). Par ailleurs, dans un autre modèle murin dans lequel les deux allèles *Nf1* ont été éteints, les anomalies squelettiques des patients atteints de NF1 ont été récapitulées, il s'agit la du premier modèle animal reproduisant le mieux le phénotype osseux observé chez l'homme (Wang et al., 2011). En effet, les animaux générés présentaient une scoliose et une cyphose progressives, une inclinaison du tibia et des anomalies dans la formation du crâne et de la paroi thoracique antérieure. Ces anomalies étaient accompagnées d'un phénotype de masse osseuse faible, d'une porosité corticale osseuse élevée, d'une ostéoïdose, d'une augmentation de l'ostéoclastogenèse et d'une diminution du nombre d'ostéoblastes, quantifiés par histomorphométrie et microtomographie 3D. De plus, ils ont démontré que le blocage de l'activation RAS/ERK par la lovastatine au cours du développement embryonnaire pourrait

atténuer la porosité corticale accrue observée chez les ratons mutants.

Dans notre étude, nous avons également testé l'effet des statines sur la différenciation des ostéoblastes dérivés d'hiPS-NF1 et WT. Nous avons constaté, dans un premier temps, que les deux lignées NF1 ne réagissaient pas de la même manière. L'une répondant positivement à l'effet de la simvastatine en augmentant l'activité de l'ALP en fin de différenciation ostéoblastique et l'autre ne répondant pas. Ces résultats nous ont alors poussé à générer des lignées isogéniques à l'aide de la technologie CRISPR/Cas 9, nous permettant alors d'avoir des lignées NF1 hétérozygotes et homozygotes. Ces lignées vont nous permettre d'étudier si le phénotype osseux associé à la perte d'expression de la neurofibromine est corrélé avec la perte partielle ou totale de *NF1*.

Les résultats préliminaires obtenus confirment que les cellules NF1-/- présentent un phénotype plus important que les cellules NF1+/-. Il reste encore à étudier l'impact de la perte totale de la neurofibromine sur l'activation des voies de signalisation lié a RAS et si une restauration du phénotype est obtenue par le traitement avec des statines ou autres molécules pharmacologiques. En effet, il sera alors possible d'envisager la recherche de composés sur ces cellules grâce au criblage à haut débit.

C. Utilisation des cellules souches pluripotentes pour la recherche de composés pharmaceutiques avec le criblage à haut débit.

La modélisation des phénotypes d'une pathologie à partir des hCSP est la première étape dans un objectif plus global de correction de ces phénotypes. C'est la qu'intervient la mise en place du criblage à haut débit pour la recherche de composés capable de moduler et/ou restaurer un phénotype.

Pour cela, il est nécessaire d'adapter les protocoles permettant une utilisation industrielle, différents systèmes de production automatisée et d'amplification sont disponibles au laboratoire rendant possible la recherche de composés capable d'améliorer la capacité de nos cellules NF1 à se différencier en ostéoblastes.

Dans le cadre de l'étude de la NF1, des stratégies de criblage à haut débit ont déjà été mis en place mais pour l'étude de la réponse des lignées de cellules tumorales NF1 à une collection d'inhibiteurs de MEK, RAF, RAS, farnésyl transférase, PAK et ERK, médicaments utilisés contre de nombreuses autres voies impliquées dans les cancers, y compris Wnt, Hedgehog, p53, EGF,

HDAC, ainsi que des agents cytotoxiques classiques recommandés pour le traitement des tumeurs malignes des nerfs périphériques, tels que la doxorubicine et étoposide (Guo et al., 2017).

A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement autre que chirurgical aux lésions osseuses observées dans la NF1. Il paraît donc important de mettre ce criblage à haut débit en route dans notre modèle d'ostéoblastes dérivés d'hiPS-NF1.

D. Différenciation des hCSP en d'autres types cellulaires pertinents de la maladie : développement d'un protocole de différenciation des hiPS en cellules de Schwann.

La neurofibromatose de type 1 est caractérisée par l'apparition de symptômes variés parmi lesquels on retrouve des manifestations neurocutanées telles que les neurofibromes plexiformes. Les neurofibromes sont composés de cellules de Schwann néoplasiques, de cellules de type périneural et de fibroblastes (Zhu et al., 2002). Il est de plus en plus évident que la perte d'expression de NF1 dans les cellules de Schwann néoplasiques est associée à la formation et au développement des neurofibromes plexiformes d'où l'utilité de développer un modèle cellulaire pertinent permettant d'étudier la mise en place de ces tumeurs.

Avant de pouvoir modéliser le développement des neurofibromes à partir des hCSP, la mise en place d'un protocole permettant la différenciation de cellules de Schwann à partir d'hiPS est essentiel. De nombreux protocoles ont été publiés sur la différenciation des cellules de Schwann à partir de CSP humaines et de souris (Voir le Tableau 5 du chapitre résultats «E. Les cellules souches comme source de cellules de Schwann ». Tous débutent par une induction des cellules souches vers le lignage crête neurale en utilisant des méthodes différentes : mise en culture de corps embryoïdes dans un milieu d'induction crête neurale (Kawaguchi et al., 2010 ; Cui et al., 2008 ; Zhou et al., 2008 ; Uemura et al., 2012 ; Ikeda et al., 2013 ; Wang et al., 2011 et Liu et al., 2012) ou alors induction des cellules souches par mise en coculture avec des cellules stromales PA6/MS-5 (Mizuscki et al., 2003 ; Lee et al., 2007 ; Pomp et al., 2005 et 2008 ; Jiang et al., 2009 ; Ziegler et al., 2011 et Okawa et al., 2013). Notre protocole débute également par l'induction des hiPS vers le lignage crête neurale à partir de la formation de corps embryoïdes (mais sans co-culture avec des cellules stromales de souris) comme le confirme la présence des marqueurs SOX10 et ERBB3 dans nos cultures. Toute la difficulté dans la différenciation des cellules de Schwann réside dans la caractérisation des dites cellules. En effet, au cours de leur développement, les cellules de Schwann passent par différentes étapes de maturation au cours desquelles l'expression de leurs marqueurs fluctue. De plus, ces marqueurs tels que P75,

SOX10, GFAP, S100β ne sont pas spécifiques aux cellules de Schwann car également exprimés par d'autres types cellulaires dérivant également de la crête neurale (Neurones, astrocytes, mélanocytes). Or de nombreux protocoles ne basent leur caractérisation des cellules de Schwann que sur l'expression de la GFAP et de S100β dans leurs cultures (Kawaguchi et al., 2010 ; Motohashi et al., 2010 ; Rathjen et al., 2002 ; Pomp et al., 2008 ; Zhou et al., 2008 ; Wang et al., 2008 et Kreitzer et al., 2013).

Un bon moyen de savoir si les cellules ont bien été différenciées en cellules de Schwann est d'étudier leur fonctionnalité, à savoir, leur capacité à interagir avec des cellules neuronales et plus particulièrement leur capacité à former une gaine de myéline autour des axones des cellules neuronales. Pour cela, le test de prédilection est la mise en co-culture avec des ganglions de la racine dorsale de rat (Ziegler et al., 2011 ; Liu et al., 2012). Afin d'établir un modèle le plus proche de la physiologie humaine, nous avons décidé de vérifier la capacité d'interaction de nos cellules de Schwann avec des motoneurones dérivés également de cellules hiPS. Nous avons démontré que nos cellules de Schwann s'accolent le long des extensions axonales de motoneurones dérivés d'hiPS comme le ferai des cellules de Schwann primaires. Ce seul test ne permet pas de valider la complète fonctionnalité des cellules de Schwann. En effet, pour cela, il faudrait analyser par microscopie électronique, la mise en place d'une gaine de myéline autour des ces extensions.

Notre protocole de différenciation des hiPS en cellules de Schwann nécessite des optimisations permettant dans un premier temps, d'obtenir une population plus homogène de cellules de Schwann. En effet, avec le protocole que nous avons établi, la population finale est hétérogène et donc il n'est pas encore possible d'envisager d'utiliser ces cellules pour de la modélisation dans le cas de la NF1. Cependant ces premiers résultats sont prometteurs, en effet, au bout de seulement 30 jours de différenciation lorsque les cellules différenciées sont mises en co-culture avec des motoneurones, on observe une interaction entre les deux types cellulaires.

IX. Conclusion générale

Durant cette thèse, nous avons mis en place une modélisation pathologique de la neurofibromatose de type 1 à partir de cellules hiPS. Cette étude à permis de mettre en évidence un phénotype cellulaire (différenciation ostéoblastique altérée dans les cellules porteuses de la mutation *NF1*) directement lié aux symptômes osseux observés chez les patients NF1. L'utilisation de lignées de cellules souches éditées à l'aide de la technologie de CRISPR/Cas 9 pour la modélisation de ce phénotype osseux présente des résultats prometteurs. La mise en place, à venir, d'un criblage thérapeutique pour trouver des molécules capable de restaurer une différenciation normale des osteoblastes NF1 pourra permettre de développer un traitement chez les patients.

Fort de ces résultats, nous nous sommes intéressés au développement d'un autre modèle de la pathologie, à partir des cellules de Schwann. Pour cela, nous avons débuté par le développement d'un protocole de différentiation des hiPS en cellules de Schwann. Une fois que le protocole permettra la production d'une population homogène de cellules de Schwann. La modélisation des neurofibromes dans NF1 à partir des cellules souches permettra de comprendre les mécanismes responsables de la transformation tumorale que subissent les cellules de Schwann suite à la perte d'expression de la neurofibromine. Les anomalies ainsi détectées seront utilisées pour rechercher l'effet normalisateur de composés pharmacologiques.

Ces résultats ajoutés aux travaux publiés par le Dr Allouche (Allouche et al., 2015) confirment la puissance qu'offrent les cellules souches pluripotentes dans la modélisation de pathologies.

X. Annexe

1. Introduction

Lors de la mise en place d'un protocole de différenciation, la possibilité de pouvoir conserver les cellules par cryoconservation est un avantage certain puisqu'elle permet de construire des banques de cellules déjà différenciées.
Dans l'optique de pouvoir faire du criblage à haut débit, les quantités de cellules nécessaires doivent être très importantes d'où l'intérêt de se dispenser de l'étape de différenciation qui reste chronophage.

La procédure de congélation consiste à décoller les cellules par traitement enzymatique (TrypLE™, ThermoFisher) puis les resuspendre dans une solution de cryoconservation (CryoStor® CS10, StemCell) contenant 10% de DMSO. Les cellules sont ensuite conservées dans des cuves à azote jusqu'à une prochaine utilisation. Lors de la décongélation, les cellules sont manipulées de manière à éviter tout stress excessif, la procédure doit donc être rapide. Une fois remise en culture, les cellules sont traitées de manière classique avec un changement de milieu tous les deux jours et un passage avant d'atteindre la confluence.

Avec le protocole initial de différenciation des hiPS en cellules de Schwann, j'avais testé la congélation des cellules à différentes étapes de la différenciation. Une congélation au bout de seulement 10 jours de différenciation ne permet pas aux cellules de survivre à la décongélation. Une congélation à partir de 20 jours, au moment où les cellules sont subconfluentes, se passe bien et les cellules survivent après remise en culture. Cependant à ce stade, le milieu de culture des cellules est changé (cf Fig. 41 du chapitre «Mise au point d'un protocole de différenciation des CSP en cellules de Schwann »).

J'ai alors constaté que les cellules qui survivaient présentaient des morphologies particulières non semblables aux cellules de Schwann. J'ai donc décidé de les caractériser en les analysant au niveau morphologique et de leur expression génique et protéique.

2. Caractérisation du type cellulaire présent dans les cultures de hiPS différenciées vers le lignage Schwann

- Analyse morphologique

Après la décongélation les cellules reprennent un cycle de culture classique et à partir du premier passage post décongélation, on constate l'apparition de grosses structures qui se trouvent être polynuclées (Fig. 55). De plus, après quelques jours, ces cellules ont commencé à présenter des contractions spontanées en culture.
Cette morphologie particulière et cette capacité contractile ont orienté notre caractérisation vers l'analyse de nos cellules pour des marqueurs de cellules musculaires.

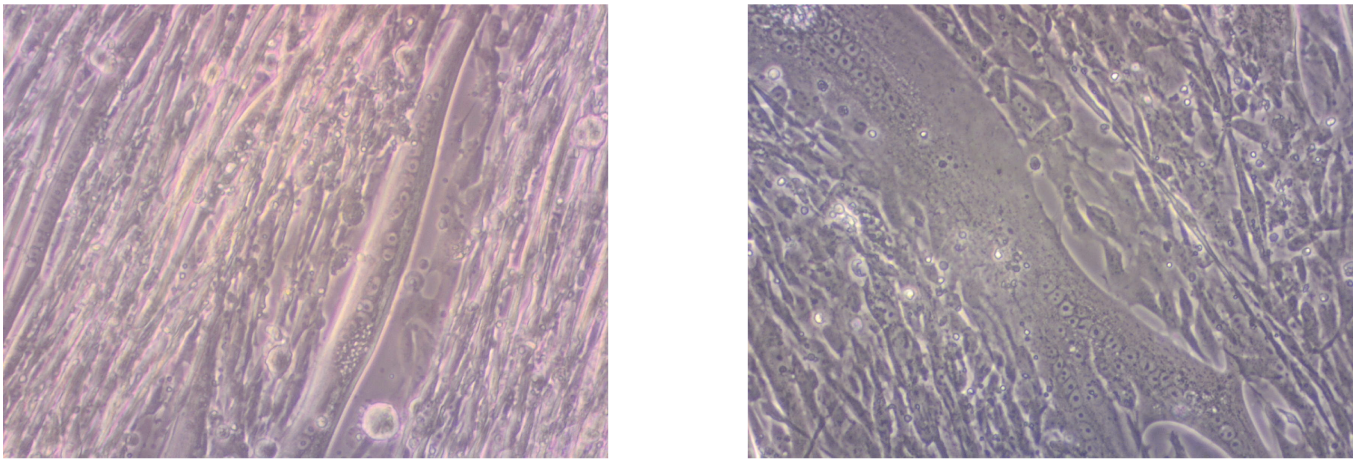


Figure 55 : Analyse morphologique post décongélation des cellules différenciées issues du premier protocole développé pour la différenciation des hiPS en cellules de Schwann

- Analyse du profil d'expression génique des populations cellulaires polynuclées

Suite à l'analyse morphologique, j'ai voulu caractériser ces cellules en étudiant dans un premier temps leur profil d'expression génique. Vu le caractère contractile des cellules et la présence de noyaux surnuméraires dans les cellules, j'ai testé des marqueurs de cellules musculaires sur trois lignées différentes obtenues post décongélation (Fig. 56).

Pax3, Pax7 et CD56 sont des marqueurs des progéniteurs musculaires qui sont exprimés dans les myoblastes. On constate que Pax3 est exprimé dans les différenciations WT1, WT2 et WT3 à des niveaux proches des myoblastes. Pax7 est exprimé dans les trois différenciations cellulaires

mais à des niveaux différents. En effet, dans la différenciation WT1 et WT3 les niveaux d'expressions sont plus élevés que dans la différenciation WT2. On constate que les différenciation WT2 et WT3 ont des niveaux d'expression de CD56 semblable aux myoblastes.

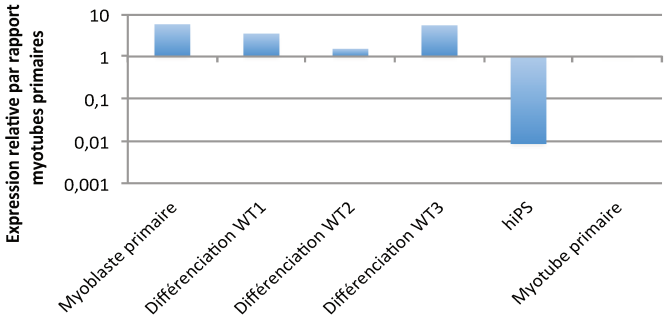
Myf5 et MyoD sont quant à eux des marqueurs de spécifications en myoblastes. Seule la différenciation WT1 exprime MyoD.
MyoG et MRF4 sont des marqueurs de spécifications en myotube et on ne les retrouve exprimés que dans la différenciation WT1 et à des niveaux similaires aux myotubes primaires.

La desmine est un marqueur des myoblastes et on constate que la différenciation WT1 exprime également la desmine.

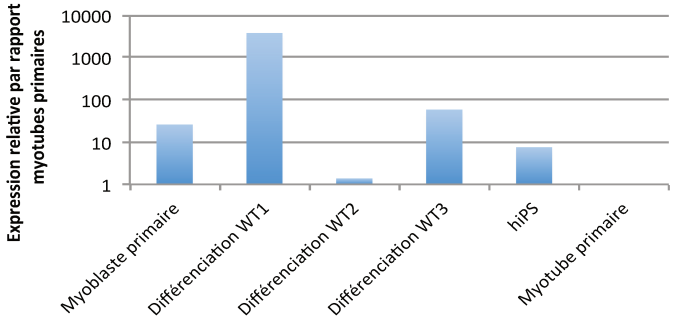
La dystrophine et la titine sont quant à eux des marqueurs tardifs des myotubes. Les différenciations WT2 et WT3 n'expriment pas ces marqueurs à l'inverse de la différenciation WT1 qui présente des niveaux d'expressions de dystrophine et de titine semblable aux myotubes primaires. Les myoblastes primaires (cellules musculaires précoces) et myotubes primaires (cellules musculaires terminales) ont été choisies ici comme contrôles positifs et les hiPS servent de contrôle négatif.

On constate que les cellules issues de la différenciation expriment (à des niveaux différents) les marqueurs de cellules musculaires (Fig. 56) ce qui peut laisser penser qu'après la décongélation, parmi la population hétérogène de départ, ces cellules survivent et prennent le dessus sur les cellules de Schwann potentielles.

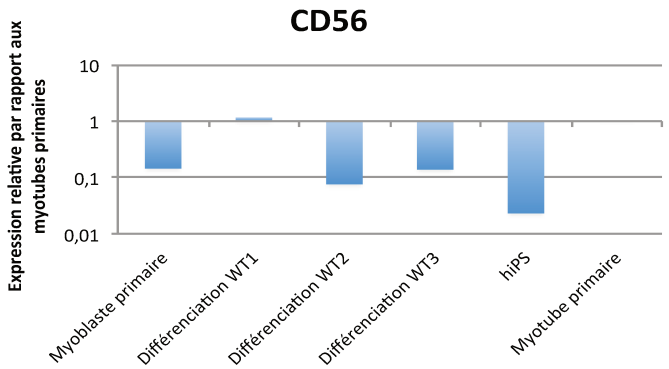
Pax3



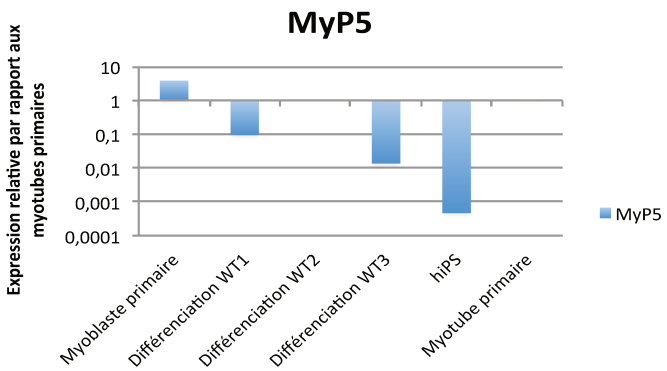
Pax7



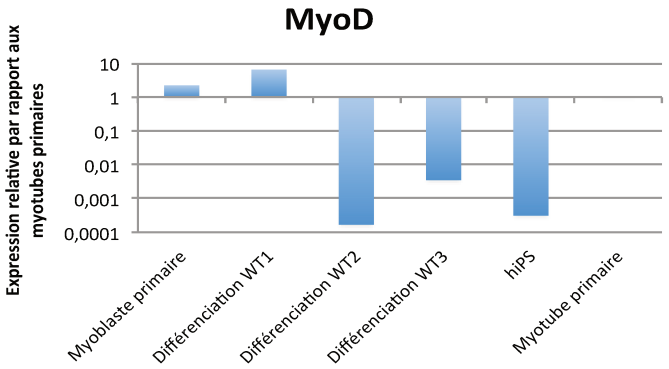
CD56



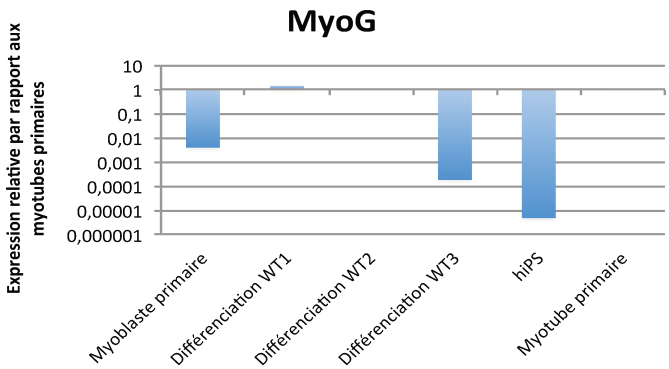
MyP5



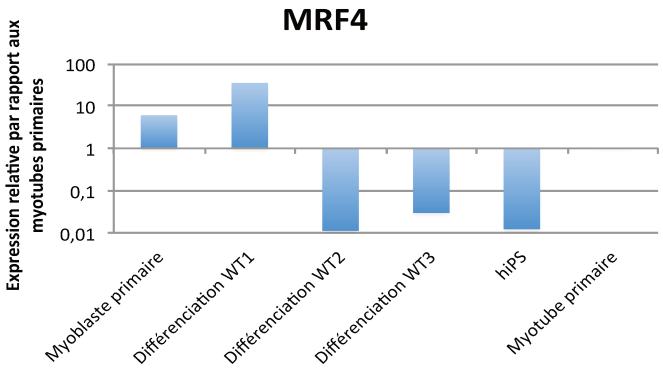
MyoD



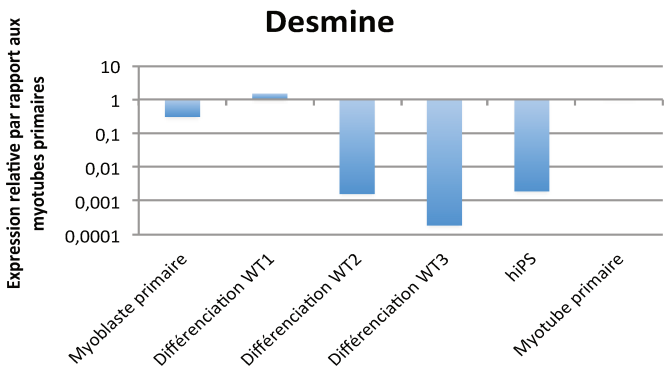
MyoG



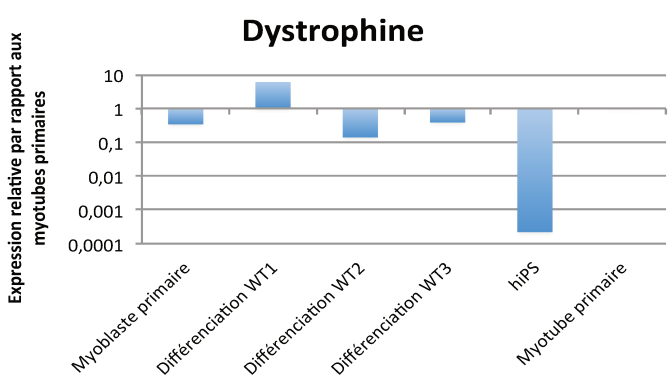
MRF4



Desmine



Dystrophine



Titine

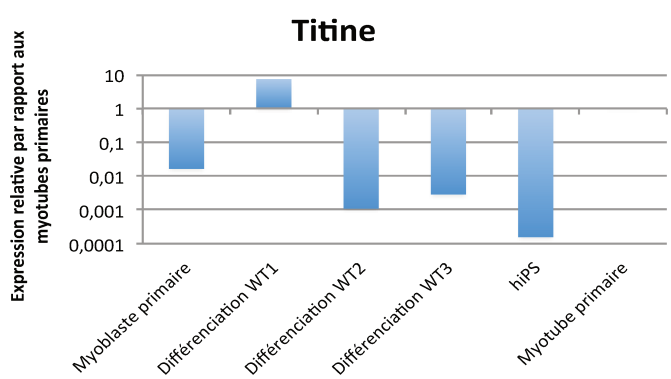


Figure 56 : Expression des marqueurs des cellules musculaires

Les cellules hiPS indifférenciées servent de contrôle négatif et les myoblastes primaires et myotubes primaires de contrôle positifs. Pour chaque marqueur, des triplicats techniques ont été réalisés

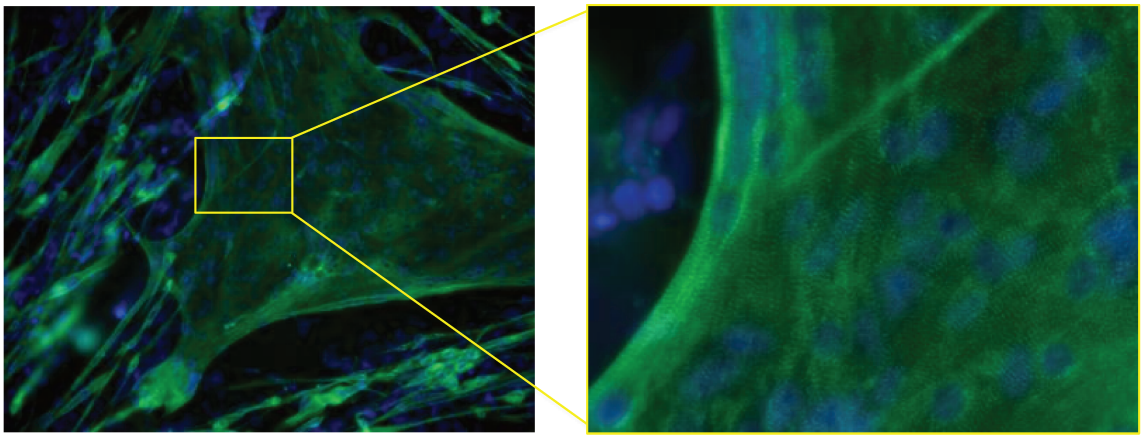
- Analyse immunohistologique

Afin de valider le caractère musculaire supposé des cellules, j'ai poursuivi la caractérisation des cellules par une analyse immunohistologique avec deux marqueurs classiques des cellules musculaires : l'alpha actinine et la desmine (Fig 57A-B et 57C).

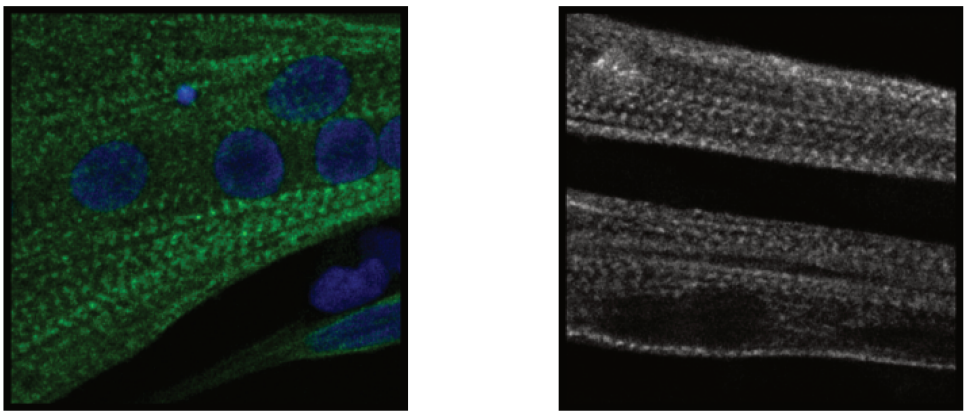
On constate que les cellules sont positives à l'alpha actinine et à la desmine, on peut même observer les stries musculaires de nos cellules avec un traitement « airy scale » des marquages à l'apha actinine.

Fort de tous ces résultats, on peut en déduire que les cellules observées après décongélation correspondent à des cellules musculaires.

A



B



C

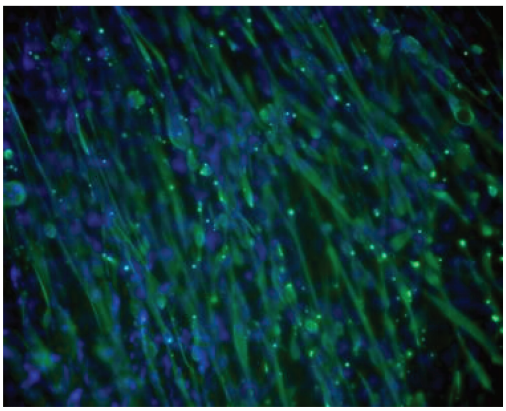


Figure 57 : Analyse en immunofluorescence par microscopie confocale

(A) Marquage à l'alpha-actinine des cellules avec un grossissement par croping (permet de sélectionner une région d'intérêt (ROI) d'une image). (B) Traitement « airy scale » (Fonction propre du confocal Zeiss permettant l'augmentation de résolution d'un facteur de x1,5 par rapport au mode confocal standard) au grossissement x63. (C) Marquage à la desmine.

3. Discussion et Perspectives

Les connaissances accumulées des voies de signalisation guidant la myogenèse ont aidé à développer un certain nombre de protocoles pour dériver les progéniteurs myogéniques et les myocytes à partir des CSP humaines. Les méthodes actuelles peuvent être classées en deux grandes catégories: (1) l'induction de la différenciation myogénique par surexpression des gènes myogéniques (méthodes transgéniques) et (2) la dérivation de progéniteurs myogéniques sous culture définie utilisant des facteurs de croissance et/ou des molécules de signalisation (méthodes sans transgène). Notre protocole s'inscrit dans la deuxième catégorie.

Des tentatives récentes ont été perpétrées pour obtenir des progéniteurs myogéniques à partir de cellules hiPS et hES dans des conditions de culture définies en utilisant des molécules spécifiques sécrétées comme facteurs paracrines jouant un rôle important dans le développement musculaire. Ces molécules contrôlent la prolifération, la migration et la différenciation des cellules mésodermiques en somite et en dermomyotome (partie restante d'un somite après que le sclérotome s'en soit dissocié) (Bentzinger et al., 2012). Le FGF2 a été utilisé à différentes concentrations (5–100 ng/ml) pour diriger et améliorer la différenciation myogénique (Xu et al., 2013 ; Awaya et al., 2012 ; Shelton et al., 2014 ; Cha et al., 2015 ; Xi et al., 2017). Bien que 10 à 20 ng/ml de FGF2 soient couramment utilisés pour maintenir la prolifération dans les lignées cellulaires ou les cellules primaires, il a été constaté qu'une concentration élevée de FGF2 (100 ng/ml) augmentait significativement le nombre de progéniteurs myogéniques positifs pour Pax7 des CSP humaines (Hosoyama et al., 2014). D'autres facteurs de croissance tels que le facteur de croissance analogue à l'insuline I (IGF-I), le facteur de croissance épidermique (EGF), le facteur de croissance hépatocytaire (HGF) et le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) favorisent également l'expansion des progéniteurs myogénique et la différenciation dans les CSP humaines (Caron et al., 2016). L'IGF-I peut augmenter l'hyperplasie et la fusion des myotubes (Latres et al., 2005, Tureckova et al., 2001). L'IGF-I a été utilisé à une concentration de 2–50 ng/ml pour améliorer la différenciation terminale (Borchin et al., 2013 ; (Caron et al., 2016 ; Xi et al., 2017 ; Cha et al., 2016).

Les inhibiteurs à petites molécules ont également été utilisés pour diriger et améliorer la différenciation myogénique. Les inhibiteurs de GSK3β, tels que CHIR99021 (Borchin et al., 2013, Xi et al., 2017) et BIO (6 bromoindirubin-3′-oxime) (Xu et al., 2013), peuvent favoriser l'induction du mésoderme lors de la différenciation en activant les voies Wnt.

De plus, un activateur de l'adénylyl cyclase, la forskoline, a été utilisé dans un triple cocktail avec FGF2 et un inhibiteur de la GSK3β (BIO) pour favoriser la différenciation musculaire (Xu et al., 2013).

Des inhibiteurs des récepteurs BMP de type I ou des récepteurs de type I du TGF-ß, tels que LDN193189 (Cha et al., 2015 ; Xi et al., 2017 ; Cha et al., 2016) et SB431542 (Caron et al., 2016), ont été utilisés pour améliorer la dérivation d'une population myogénique de CSP humaines. Dans certains protocoles, le supplément de base de l'insuline-transferrine-sélénium (communément appelé ITS) a été utilisé pour induire l'étape initiale de la spécification mésodermique (Awaya et al., 2012 , Borchin et al., 2013, Barberi et al., 2007). L'oncostatine, le nécrosulfonamide, l'acide ascorbique, l'insuline et la dexaméthasone ont récemment été utilisés en association avec des facteurs de croissance et des inhibiteurs du TGF-β1 pour accroître l'efficacité de la dérivation des myocytes. Ces petites molécules ont favorisé un pourcentage élevé de différenciation des muscles squelettiques (jusqu'à 70% de CMH + myotubes) et ont raccourci la période de différenciation à moins d'un mois (Caron et al., 2016). Un antagoniste Notch : DAPT (inhibiteur de la γ-sécrétase) a augmenté l'expression du gène MyoD et de la myogénine (Choi et al., 2016). Une combinaison de CHIR99021 et de DAPT améliore la différenciation myogénique (Choi et al., 2016).De plus, l'effet réducteur du mélange LDN193189 et SB431542 a été démontré par la réduction des taux de BMP4 et une augmentation de l'indice de fusion lorsqu'il est appliqué aux myotubes préparés à partir d'hiPS de patients atteints de dystrophie musculaire de Duchenne (Choi et al., 2016).

Si l'on reprend le protocole décrit en Figure 42 dans le chapitre « Mise au point d'un protocole de différenciation des CSP en cellules de Schwann », on constate que jusqu'au jour 18 de la différenciation des hiPS, les cellules sont cultivées dans un milieu supplémenté, entre autre, avec du SB431542, du CHIR99021, du FGF2 et de l'IGF1, molécules décrites et utilisées également pour l'induction en cellules progénitrices des myoblastes. Nous avons constaté la présence de cellules polynuclées après avoir remis en culture des cellules congélées au jour 18. Les cellules étaient alors cultivées dans un milieu différent supplémenté notamment avec de l'IGF1, du FGF2 et de la FSK. Comme décrit précédemment, ces molécules ont démontré leur implication dans la différenciation myogénique. Lorsque les hiPS sont cultivées dans ces conditions sans étapes de congélation, nous n'observons pas de cellules polynuclées et contractiles. Ces résultats peuvent nous laisser penser que la congélation/décongélation engendre une sélection des cellules et seules les cellules potentiellement progénitrices de myoblastes se maintiennent et subissent une maturation vers le lignage myogénique.

En 2005, Stevenson et al., a publié les résultats d'une analyse de 40 personnes atteintes de NF1, obtenus à l'aide d'un scanner tomodensitométrique quantitatif périphérique (pQCT) (Stevenson et al., 2005). Les personnes atteintes de NF1 présentaient une réduction significative de la surface transversale du muscle par rapport aux témoins du même âge. Des résultats comparables ont été observés dans une cohorte pédiatrique NF1 où le tissu maigre était mesuré à l'aide d'une absorptiométrie à rayons X à double énergie (DEXA) (Hirbe et Gutmann 2014 ;

Souza et al., 2009). Les enfants atteints de NF1 avaient une masse de tissu maigre considérablement réduite. Bien qu'une réduction de la taille des muscles puisse impliquer une réduction de la force (Maughan et al., 1983 ; Maughan et al., 1984), les résultats fonctionnels des muscles n'ont pas été évalués dans ces études principalement radiographiques (Dulai et al., 2007 ; Stevenson et al., 2005). Cependant, dans une étude fondamentale de 2009, Souza et al. a effectué des tests de dynamométrie de préhension de la main sur 21 sujets (âgés de 7 à 60 ans) atteints de NF1 par rapport à des témoins appariés par sexe, âge et activité physique, et ont démontré une réduction significative de la force de préhension dans la cohorte NF1 (Souza et al., 2009). Les résultats de l'affaiblissement des fonctions musculaires dans NF1 ont été rapportés par la suite lors d'essais cliniques. Il a notamment été décrit une réduction de la force des muscles extenseurs de la hanche à l'aide d'une dynamométrie portative (Johnson et al., 2012). De même, un essai mené en 2013 sur le fonctionnement des muscles du bas du corps chez des enfants atteints de NF1 a révélé que la force de saut (N/kg) et la puissance de saut (W/kg) était réduite (Hockett et al., 2013). La performance en exercices aérobiques peut également être altérée. Une cohorte de 17 personnes atteintes de NF1, ainsi que des sujets contrôle appariés en sexe, âge et en poids corporel, ont subi un test de consommation maximale d'oxygène (VO2 max), une mesure de la capacité maximale d'exercice aérobique. Les personnes atteintes de NF1 avaient une VO2 max réduite ainsi qu'une pression artérielle systolique maximale réduite (de Souza et al., 2014). Bien que les auteurs aient reconnu qu'il y avait quelques difficultés à recruter des contrôles appariés aux activités, il reste à étudier de manière approfondie si la réduction de l'activité physique explique la réduction de la capacité d'exercice dans NF1. Étant donné les preuves de plus en plus nombreuses de déficits moteurs et musculaires chez NF1, il serait intéressant de développer un modèle cellulaire musculaire NF1 afin de pouvoir étudier de manière plus approfondie les phénotypes observés. L'utilisation de notre protocole pour dériver des hiPS porteuses de la mutation causale *NF1* pourrait être ce modèle. De plus, en utilisant la méthode de CRISPR/Cas 9, comme effectué lors de la modélisation du phénotype osseux présenté dans cette thèse, il serait alors possible d'établir des lignées isogéniques porteuses des mutations hétérozygotes et homozygotes et peut-être de mettre en place un criblage haut débit pour la découverte de molécules actives.

Références Bibliographiques

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. Nature Biotechnology 26, 1276–1284.

Alexiev, B.A., Chou, P.M., and Jennings, L.J. (2018). Pathology of Melanotic Schwannoma. Archives of Pathology & Laboratory Medicine.

Alfred, R., Taiani, J.T., Krawetz, R.J., Yamashita, A., Rancourt, D.E., and Kallos, M.S. (2011). Large-scale production of murine embryonic stem cell-derived osteoblasts and chondrocytes on microcarriers in serum-free media. Biomaterials 32, 6006–6016.

Allouche, J., Bellon, N., Saidani, M., Stanchina-Chatrousse, L., Masson, Y., Patwardhan, A., Gilles-Marsens, F., Delevoye, C., Domingues, S., Nissan, X., et al. (2015). In vitro modeling of hyperpigmentation associated to neurofibromatosis type 1 using melanocytes derived from human embryonic stem cells. Proceedings of the National Academy of Sciences 112, 9034–9039.

Amoh, Y., Li, L., Campillo, R., Kawahara, K., Katsuoka, K., Penman, S., and Hoffman, R.M. (2005). Implanted hair follicle stem cells form Schwann cells that support repair of severed peripheral nerves. Proceedings of the National Academy of Sciences 102, 17734–17738.

Anderson, D.J. (1993) Molecular Control of Cell Fate in the Neural Crest: The Sympathoadrenal Lineage. Annual Review of Neuroscience 30.

Anderson, H., Clarke (2005). The role of matrix vesicles in growth plate development and biomineralization. Frontiers in Bioscience 10, 822.

Aoi, T., Yae, K., Nakagawa, M., Ichisaka, T., Okita, K., Takahashi, K., Chiba, T., and Yamanaka, S. (2008). Generation of Pluripotent Stem Cells from Adult Mouse Liver and Stomach Cells. Science 321, 699–702.

Arana-Chavez, V.E., Soares, A.M.V., and Katchburian, E. (1995). Junctions between Early Developing Osteoblasts of Rat Calvaria as Revealed by Freeze-Fracture and Ultrathin Section Electron Microscopy. Archives of Histology and Cytology 58, 285–292.

Arrington, D.K., Danehy, A.R., Peleggi, A., Proctor, M.R., Irons, M.B., and Ullrich, N.J. (2013). Calvarial defects and skeletal dysplasia in patients with neurofibromatosis Type 1: Clinical article. Journal of Neurosurgery: Pediatrics 11, 410–416.

Aubin, J.E., and Triffitt, J.T. Mesenchymal Stem Cells and Osteoblast Differentiation. 23.

Avilion, A.A. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. Genes & Development 17, 126–140.

van Baarsen, K., Roth, J., Serova, N., Packer, R.J., Shofty, B., Thomale, U.-W., Cinalli, G., Toledano, H., Michowiz, S., and Constantini, S. (2018). Optic pathway–hypothalamic glioma hemorrhage: a series of 9 patients and review of the literature. Journal of Neurosurgery 1–9.

Bajenaru, M.L., Zhu, Y., Hedrick, N.M., Donahoe, J., Parada, L.F., and Gutmann, D.H. (2002). Astrocyte-Specific Inactivation of the Neurofibromatosis 1 Gene (NF1) Is Insufficient for Astrocytoma Formation. Molecular and Cellular Biology 22, 5100–5113.

Bajenaru, M.L., Hernandez, M.R., Perry, A., Zhu, Y., Parada, L.F., Garbow, J.R., and Gutmann, D.H. (2003) Optic Nerve Glioma in Mice Requires Astrocyte Nf1 Gene Inactivation and Nf1 Brain Heterozygosity. Cancer Research 6.

Ballester, R., Marchuk, D., Boguski, M., Saulino, A., Letcher, R., Wigler, M., and Collins, F. (1990). The NF1 locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast IRA proteins. Cell 63, 851–859.

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. Proceedings of the National Academy of Sciences 108, 14234–14239.

Baralle, M., Skoko, N., Knezevich, A., De Conti, L., Motti, D., Bhuvanagiri, M., Baralle, D., Buratti, E., and Baralle, F.E. (2006). NF1 mRNA biogenesis: Effect of the genomic milieu in splicing regulation of the NF1 exon 37 region. FEBS Letters 580, 4449–4456.

Barron, V.A., and Lou, H. (2012). Alternative splicing of the neurofibromatosis type I pre- mRNA. Bioscience Reports 32, 131–138.

Bernards, A., Snijders, A.J., Hannigan, G.E., Murthy, A.E., and Gusella, J.F. (1993). Mouse neurofibromatosis type 1 cDNA sequence reveals high degree of conservation of both coding and non-coding mRNA segments. Human Molecular Genetics 2, 645–650.

Bianchini, D., De Martini, I., Cadoni, A., Zicca, A., Tabaton, M., Schenone, A., Anfosso, S., Wattar, A.S.A., Zaccheo, D., and Mancardi, G.L. (1992). GFAP expression of human Schwann cells in tissue culture. Brain Research 570, 209–217.

Bielby, R.C., Boccaccini, A.R., Polak, J.M., and Buttery, L.D.K. (2004) In Vitro Differentiation and In Vivo Mineralization of Osteogenic Cells Derived from Human Embryonic Stem Cells. Tissue Engineering 8.

Bielinska, M., Narita, N., and Wilson, D.B. (1999) Distinct roles for visceral endoderm during embryonic mouse development. The international Journal of Developmental Biology 23.

Biernaskie, J., Sparling, J.S., Liu, J., Shannon, C.P., Plemel, J.R., Xie, Y., Miller, F.D., and Tetzlaff, W. (2007). Skin-Derived Precursors Generate Myelinating Schwann Cells That Promote Remyelination and Functional Recovery after Contusion Spinal Cord Injury. Journal of Neuroscience 27, 9545–9559.

Bixby, S., Kruger, G.M., Mosher, J.T., Joseph, N.M., and Morrison, S.J. (2002). Cell-Intrinsic Differences between Stem Cells from Different Regions of the Peripheral Nervous System Regulate the Generation of Neural Diversity. Neuron 35, 643–656.

Blakeley, P., Fogarty, N.M.E., Hu, X., Elder, K., Snell, P., Christie, L., Robson, P., and Niakan, K. (2015) Defining the Three Cell Lineages of the Human Blastocyst by Single- Cell RNA- seq. Development 45.

Boivin, G., and Meunier, P.J. (2002) Effects of bisphosphonates on matrix mineralization. Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions 6.

Boivin, G., Bala, Y., Doublier, A., Farlay, D., Ste-Marie, L.G., Meunier, P.J., and Delmas, P.D. (2008). The role of mineralization and organic matrix in the microhardness of bone tissue from controls and osteoporotic patients. Bone 43, 532–538.

Boland, M.J., Hazen, J.L., Nazor, K.L., Rodriguez, A.R., Gifford, W., Martin, G., Kupriyanov, S., and Baldwin, K.K. (2009). Adult mice generated from induced pluripotent stem cells. Nature 461, 91–94.

Boyd, K.P., Gao, L., Feng, R., Beasley, M., Messiaen, L., Korf, B.R., and Theos, A. (2010). Phenotypic variability among café-au-lait macules in neurofibromatosis type 1. Journal of the American Academy of Dermatology 63, 440–447.

Boyer, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G., et al. (2005). Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. Cell 122, 947–956.

Brannan, C.I., Perkins, A.S., Vogel, K.S., Ratner, N., Nordlund, M.L., Reid, S.W., Buchberg, A.M., Jenkins, N.A., Parada, L.F., and Copeland, N.G. (1994). Targeted disruption of the neurofibromatosis type-1 gene leads to developmental abnormalities in heart and various neural crest-derived tissues. Genes & Development 8, 1019–1029.

Brasfield, R.D. (1972). Von Recklinghausen's Disease: A Clinicopathological Study. Ann. Surg. 175, 19.

Braun, B.S., Tuveson, D.A., Kong, N., Le, D.T., Kogan, S.C., Rozmus, J., Le Beau, M.M., Jacks, T.E., and Shannon, K.M. (2004). Somatic activation of oncogenic Kras in hematopoietic cells initiates a rapidly fatal myeloproliferative disorder. Proceedings of the National Academy of Sciences 101, 597–602.

Bronner-Fraser, M., and Fraser, S.E. (1991) Cell lineage analysis of the avian neural crest. Dev Suppl 8.

Brosius, S. (2010). A History of von Recklinghausen's NF1. Journal of the History of the Neurosciences 19, 333–348.

Bruder, S.P., and Caplan, A.I. (1989). First bone formation and the dissection of an osteogenic lineage in the embryonic chick tibia is revealed by monoclonal antibodies against osteoblasts.

Bone 10, 359–375.

Brunetti-Pierri, N., Doty, S.B., Hicks, J., Phan, K., Mendoza-Londono, R., Blazo, M., Tran, A., Carter, S., Lewis, R.A., Plon, S.E., et al. (2008). Generalized metabolic bone disease in Neurofibromatosis type I. Molecular Genetics and Metabolism 94, 105–111.

Buchstaller, J. (2004). Efficient Isolation and Gene Expression Profiling of Small Numbers of Neural Crest Stem Cells and Developing Schwann Cells. Journal of Neuroscience 24, 2357–2365.

Burr, D.B., Forwood, M.R., Fyhrie, D.P., Martin, R.B., Schaffler, M.B., and Turner, C.H. (1997). Bone Microdamage and Skeletal Fragility in Osteoporotic and Stress Fractures. Journal of Bone and Mineral Research 12, 6–15.

Caddick, J., Kingham, P.J., Gardiner, N.J., Wiberg, M., and Terenghi, G. (2006). Phenotypic and functional characteristics of mesenchymal stem cells differentiated along a Schwann cell lineage. Glia 54, 840–849.

Campen, C.J., and Gutmann, D.H. (2018). Optic Pathway Gliomas in Neurofibromatosis Type 1. Journal of Child Neurology 33, 73–81.

Castelnovo, L., Bonalume, V., Melfi, S., Ballabio, M., Colleoni, D., and Magnaghi, V. (2017). Schwann cell development, maturation and regeneration: a focus on classic and emerging intracellular signaling pathways. Neural Regeneration Research 12, 1013.

Castle, B. (2003). Evaluation of genotype-phenotype correlations in neurofibromatosis type 1. Journal of Medical Genetics 40, 109e – 109.

Cawthon, M., Viskochil, D., Dunn, D., Gesteland, R., O'Connell, P., and White', R. (1990) A Major Segment of the Neurofibromatosis Type 1 Gene: cDNA Sequence, Genomic Structure, and Point Mutations. Cell 9.

Chan, G., Gu, S., and Neel, B.G. (2013). Erk1 and Erk2 are required for maintenance of hematopoietic stem cells and adult hematopoiesis. Blood 121, 3594–3598.

Chan, J.R., Watkins, T.A., Cosgaya, J.M., Zhang, C., Chen, L., Reichardt, L.F., Shooter, E.M., and Barres, B.A. (2004). NGF Controls Axonal Receptivity to Myelination by Schwann Cells or Oligodendrocytes. Neuron 43, 183–191.

Chazaud, C. (2008). L'embryogenèse précoce des mammifères: Premières différenciations cellulaires et cellules souches. médecine/sciences 24, 1043–1048.

Cheah, K.S.E., and Lau, E.T. (1991) Expression of the mouse a1(ll) collagen gene is not restricted to cartilage during development. Development 11.

Chen, S., Burgin, S., McDaniel, A., Li, X., Yuan, J., Chen, M., Khalaf, W., Clapp, D.W., and Yang, F.-C. (2010). Nf1−/− Schwann Cell-Conditioned Medium Modulates Mast Cell Degranulation by c-Kit-Mediated Hyperactivation of Phosphatidylinositol 3-Kinase. The American Journal of

Pathology 177, 3125–3132.

Chesné, P., Adenot, P.G., Viglietta, C., Baratte, M., Boulanger, L., and Renard, J.-P. (2002). Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells. Nature Biotechnology 20, 366–369.

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.

Chubb, R., Oh, J., Riley, A.K., Kimura, T., Wu, S.M., and Wu, J.Y. (2017). In Vivo Rescue of the Hematopoietic Niche By Pluripotent Stem Cell Complementation of Defective Osteoblast Compartments: Pluripotent Stem Cell Complementation of Bone. Stem Cell 35, 2150– 2159.

Chung, Y.G., Eum, J.H., Lee, J.E., Shim, S.H., Sepilian, V., Hong, S.W., Lee, Y., Treff, N.R., Choi, Y.H., Kimbrel, E.A., et al. (2014). Human Somatic Cell Nuclear Transfer Using Adult Cells. Cell Stem Cell 14, 777–780.

Colapietro, P., Gervasini, C., Natacci, F., Rossi, L., Riva, P., and Larizza, L. (2003). NF1 exon7 skipping and sequence alterations in exonic splice enhancers (ESEs) in a neurofibromatosis1 patient. Human Genetics 113, 551–554.

Colello, R.J., and Pott, U. (1997). Signals that initiate myelination in the developing mammalian nervous system. Molecular Neurobiology 15, 83–100.

Corfas, G. (2004). Mechanisms and Roles of Axon-Schwann Cell Interactions. Journal of Neuroscience 24, 9250–9260.

Costa, R.M., Federov, N.B., Kogan, J.H., Murphy, G.G., Stern, J., Ohno, M., Kucherlapati, R., Jacks, T., and Silva, A.J. (2002). Mechanism for the learning de®cits in a mouse model of neuro®bromatosis type. Nature 415, 5.

Crane, J.L., and Cao, X. (2014). Bone marrow mesenchymal stem cells and TGF-β signaling in bone remodeling. Journal of Clinical Investigation 124, 466–472.

Crawford, A.H., and Schorry, E.K. (1999). Neurofibromatosis in children: the role of the orthopaedist. J Am Acad Orthop Surg 7, 217–230.

Cserjesi, P., Brown, D., Ligon, K.L., Lyons, G.E., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., and Olson, E.N. (1995) Scleraxis: a basic helix-loop-helix protein that prefigures skeletal formation during mouse embryogenesis. Development 12.

Cui, L., Jiang, J., Wei, L., Zhou, X., Fraser, J.L., Snider, B.J., and Yu, S.P. (2008). Transplantation of Embryonic Stem Cells Improves Nerve Repair and Functional Recovery After Severe Sciatic Nerve Axotomy in Rats. Stem Cells 26, 1356–1365.

Dagalakis, U., Lodish, M., Dombi, E., Sinaii, N., Sabo, J., Baldwin, A., Steinberg, S.M., Stratakis, C.A., and Widemann, B.C. (2014). Puberty and Plexiform Neurofibroma Tumor Growth in

Patients with Neurofibromatosis Type I. The Journal of Pediatrics 164, 620–624.

Damien, C.J., and Parsons, J.R. (1991). Bone graft and bone graft substitutes: A review of current technology and applications. Journal of Applied Biomaterials 2, 187–208.

Damoulis, P.D., and Hauschka, P.V. (1997). Nitric Oxide Acts in Conjunction with Proinflammatory Cytokines to Promote Cell Death in Osteoblasts. Journal of Bone and Mineral Research 12, 412–422.

Dang, I., and De Vries, G.H. (2011). Aberrant cAMP Metabolism in NF1 Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor Cells. Neurochemical Research 36, 1697–1705.

Danglot, G., Regnler, V., Fauvet, D., Vassal, G., Kujas, M., and Bernheim, A. (1995). Neurofibromatosis 1 (NF1) mRNAs expressed in the central nervous system are differentially spliced in the 5' part of the gene. Human Molecular Genetics 4, 915–920.

van Dartel, D.A.M., Pennings, J.L.A., de la Fonteyne, L.J.J., van Herwijnen, M.H., van Delft, J.H., van Schooten, F.J., and Piersma, A.H. (2010). Monitoring Developmental Toxicity in the Embryonic Stem Cell Test Using Differential Gene Expression of Differentiation-Related Genes. Toxicological Sciences 116, 130–139.

Dasgupta, B., Dugan, L.L., and Gutmann, D.H. (2003). The Neurofibromatosis 1 Gene Product Neurofibromin Regulates Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide- Mediated Signaling in Astrocytes. The Journal of Neuroscience 23, 8949–8954.

Daston, M.M., Scrable, H., Nordlund, M., Sturbaum, A.K., Nissen, L.M., and Ratner, N. (1992). The protein product of the neurofibromatosis type 1 gene is expressed at highest abundance in neurons, Schwann cells, and oligodendrocytes. Neuron 8, 415–428.

Davies, A.M. (1996). The neurotrophic hypothesis: where does it stand? Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences 351, 389–394.

De Schepper, S., Maertens, O., Callens, T., Naeyaert, J.-M., Lambert, J., and Messiaen, L. (2008). Somatic Mutation Analysis in NF1 Café au lait Spots Reveals Two NF1 Hits in the Melanocytes. Journal of Investigative Dermatology 128, 1050–1053.

DeClue, J.E., Cohen, B.D., and Lowy, D.R. (1991). Identification and characterization of the neurofibromatosis type 1 protein product. Proceedings of the National Academy of Sciences 88, 9914–9918.

Delfino-Machín, M., Chipperfield, T.R., Rodrigues, F.S.L.M., and Kelsh, R.N. (2007). The proliferating field of neural crest stem cells. Developmental Dynamics 236, 3242–3254.

Derynck, R., and Akhurst, R.J. (2007). Differentiation plasticity regulated by TGF-β family proteins in development and disease. Nature Cell Biology 9, 1000–1004.

Derynck, R., Piek, E., Schneider, R.A., Choy, L., and Alliston, T. (2018) TGF-β Family Signaling in Mesenchymal Differentiation. Cold Spring Harb Perspect Biol. 54.

Dezawa, M., Takahashi, I., Esaki, M., Takano, M., and Sawada, H. (2001). Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells: Sciatic nerve regeneration by marrow stromal cells. European Journal of Neuroscience 14, 1771–1776.

Diwakar, G., and Hornyak, T.J. (2006). Café-au-lait Patches and Senile Plaques: How APPt the Connection? Journal of Investigative Dermatology 126, 547–550.

Diwakar, G., Zhang, D., Jiang, S., and Hornyak, T.J. (2008). Neurofibromin as a regulator of melanocyte development and differentiation. Journal of Cell Science 121, 167–177.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.., Krause, D.S., Deans, R.J., Keating, A., Prockop, D.J., and Horwitz, E.M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy 8, 315–317.

Dong, Z., Sinanan, A., Parkinson, D., Parmantier, E., Mirsky, R., and Jessen, K.R. (1999) Schwann Cell Development in Embryonic Mouse Nerves. Journal of Neuroscience Research 15.

Dong, Z., Yarden, Y., Lefkowitz, G., Mirsky, R., and Jessen, K.R. (1995) Neu Differentiation Factor Is a Neuron-Gila Signal and Regulates Survival, Proliferation, and Maturation of Rat Schwann Cell Precursors. Neuron 12.

Douarin, N.M.L., and Smith, J. (1988) Development of the Peripheral Nervous System from the Neural Crest. Annual Review of Cell and Developmental Biology 32.

Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science 346, 1258096–1258096.

Draper, J.S., Smith, K., Gokhale, P., Moore, H.D., Maltby, E., Johnson, J., Meisner, L., Zwaka, T.P., Thomson, J.A., and Andrews, P.W. (2004). Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. Nature Biotechnology 22, 53–54.

Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A.L., and Karsenty, G. (1997). Osf2/Cbfa1: A Transcriptional Activator of Osteoblast Differentiation. Cell 89, 747–754.

Dupin, E. (2011). Plasticité phénotypique des mélanocytes et des cellules de Schwann. Biologie Aujourd'hui 205, 53–61.

Dupin, E., and Sommer, L. (2012). Neural crest progenitors and stem cells: From early development to adulthood. Developmental Biology 366, 83–95.

Duplomb, L., Dagouassat, M., Jourdon, P., and Heymann, D. (2006). Concise Review: Embryonic Stem Cells: A New Tool to Study Osteoblast and Osteoclast Differentiation. Stem Cells 25, 544–552.

Easton, D.F. An Analysis of Variation in Expression of Neurofibromatosis (NF) Type I (NF I):

Evidence for Modifying Genes. 9.

Ebert, A.D., Yu, J., Rose, F.F., 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.

Eiraku, M., and Sasai, Y. (2012). Self-formation of layered neural structures in three- dimensional culture of ES cells. Current Opinion in Neurobiology 22, 768–777.

Elbuluk, A., Einhorn, T.A., and Iorio, R. (2017). A Comprehensive Review of Stem-Cell Therapy: JBJS Reviews 5, e15.

Elefteriou, F., Benson, M.D., Sowa, H., Starbuck, M., Liu, X., Ron, D., Parada, L.F., and Karsenty, G. (2006). ATF4 mediation of NF1 functions in osteoblast reveals a nutritional basis for congenital skeletal dysplasiae. Cell Metabolism 4, 441–451.

Elefteriou, F., Kolanczyk, M., Schindeler, A., Viskochil, D.H., Hock, J.M., Schorry, E.K., Crawford, A.H., Friedman, J.M., Little, D., Peltonen, J., et al. (2009). Skeletal abnormalities in neurofibromatosis type 1: Approaches to therapeutic options. American Journal of Medical Genetics Part A 149A, 2327–2338.

El-Nabarawi, nagla, El-Wakd, M., and Salem, M. (2017). Atorvastatin, a double weapon in osteoporosis treatment: an experimental and clinical study. Drug Design, Development and Therapy Volume 11, 1383–1391.

Eminli, S., Utikal, J., Arnold, K., Jaenisch, R., and Hochedlinger, K. (2008). Reprogramming of Neural Progenitor Cells into Induced Pluripotent Stem Cells in the Absence of Exogenous Sox2 Expression: reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous sox2 expression. Stem Cells 26, 2467–2474.

Réseau NF1 Rhône Alpes Auvergne-France, Lion-François, L., Gueyffier, F., Mercier, C., Gérard, D., Herbillon, V., Kemlin, I., Rodriguez, D., Ginhoux, T., Peyric, E., et al. (2014). The effect of methylphenidate on neurofibromatosis type 1: a randomised, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. Orphanet Journal of Rare Diseases 9.

Evans, N.D., Gentleman, E., Chen, X., Roberts, C.J., Polak, J.M., and Stevens, M.M. (2010). Extracellular matrix-mediated osteogenic differentiation of murine embryonic stem cells. Biomaterials 31, 3244–3252.

Fakhry, M. (2013). Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts. World Journal of Stem Cells 5, 136.

Feltri, M.L., Porta, D.G., Previtali, S.C., Nodari, A., Migliavacca, B., Cassetti, A., Littlewood-Evans, A., Reichardt, L.F., Messing, A., Quattrini, A., et al. (2002). Conditional disruption of β1 integrin in Schwann cells impedes interactions with axons. The Journal of Cell Biology 156, 199–210.

Feltri, M.L., Poitelon, Y., and Previtali, S.C. (2016). How Schwann Cells Sort Axons: New

Concepts. The Neuroscientist 22, 252–265.

Feng-Chun, Y., Ingram, D.A., Chen, S., Hingtgen, C.M., Ratner, N., Monk, K.R., Clegg, T., White, H., Mead, L., Wenning, M.J., et al. (2003). Neurofibromin-deficient Schwann cells secrete a potent migratory stimulus for Nf1+/– mast cells. Journal of Clinical Investigation 112, 1851–1861.

Fernandes, K.J.L., McKenzie, I.A., Mill, P., Smith, K.M., Akhavan, M., Barnabé-Heider, F., Biernaskie, J., Junek, A., Kobayashi, N.R., Toma, J.G., et al. (2004). A dermal niche for multipotent adult skin-derived precursor cells. Nature Cell Biology 6, 1082–1093.

Ferner, R.E. (2010). The neurofibromatoses. Practical Neurology 10, 82–93.

Ferner, R.E., and Gutmann, D.H. (2013). Neurofibromatosis type 1 (NF1). In Handbook of Clinical Neurology, (Elsevier), pp. 939–955.

Ferner, R.E., Huson, S.M., Thomas, N., Moss, C., Willshaw, H., Evans, D.G., Upadhyaya, M., Towers, R., Gleeson, M., Steiger, C., et al. (2006). Guidelines for the diagnosis and management of individuals with neurofibromatosis 1. Journal of Medical Genetics 44, 81–88.

Fields, R.D. (2009). Schwann Cells and Axon Relationship. In Encyclopedia of Neuroscience, (Elsevier), pp. 485–489.

Fisher, J.E., Rogers, M.J., Halasy, J.M., Luckman, S.P., Hughes, D.E., Masarachia, P.J., Wesolowski, G., Russell, R.G.G., Rodan, G.A., and Reszka, A.A. (1999). Alendronate mechanism of action: geranylgeraniol, an intermediate in the mevalonate pathway, prevents inhibition of osteoclast formation, bone resorption, and kinase activation in vitro. Proceedings of the National Academy of Sciences 96, 133–138.

Florencio-Silva, R., Sasso, G.R. da S., Sasso-Cerri, E., Simões, M.J., and Cerri, P.S. (2015). Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. BioMed Research International 2015, 1–17.

Fraher, J., and Dockery, P. (1998). A strong myelin thickness-axon size correlation emerges in developing nerves despite independent growth of both parameters. Journal of Anatomy 193, 195–201.

Frank, E., and Sanes, J.R. (1991) Lineage of neurons and glia in chick dorsal root ganglia: analysis in vivo with a recombinant retrovirus. Development 14.

Franz-Odendaal, T.A., Hall, B.K., and Witten, P.E. (2006). Buried alive: How osteoblasts become osteocytes. Developmental Dynamics 235, 176–190.

Furlan, A., and Adameyko, I. (2018). Schwann cell precursor: a neural crest cell in disguise? Developmental Biology.

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. Proceedings of the Japan Academy, Series B 85,

348–362.

Garratt, A.N., Voiculescu, O., Topilko, P., Charnay, P., and Birchmeier, C. (2000). A Dual Role of erbB2 in Myelination and in Expansion of the Schwann Cell Precursor Pool. The Journal of Cell Biology 148, 12.

Garrett, I.R., Gutierrez, G.E., Rossini, G., Nyman, J., McCluskey, B., Flores, A., and Mundy, G.R. (2007). Locally delivered lovastatin nanoparticles enhance fracture healing in rats. Journal of Orthopaedic Research 25, 1351–1357.

Gauthier, M., Maury, Y., Peschanski, M., and Martinat, C. (2011). Human pluripotent stem cells for genetic disease modeling and drug screening. Regenerative Medicine 6, 607–622.

Geist, R.T., and Gutmann, D.H. (1996) Expression of a developmentally-regulated neuron-specific isoform of the neurofibromatosis 1 (NFl) gene. Neuroscience Letters 4.

Geller, M., Ribeiro, M.G., Q.C. Araujo, A.P., Oliveira, L.J.B., and Nunes, F.P. (2006). Serum IgE levels in neurofibromatosis 1. International Journal of Immunogenetics 33, 111–115.

Glass, D.A., Bialek, P., Ahn, J.D., Starbuck, M., Patel, M.S., Clevers, H., Taketo, M.M., Long, F., McMahon, A.P., Lang, R.A., et al. (2005). Canonical Wnt Signaling in Differentiated Osteoblasts Controls Osteoclast Differentiation. Developmental Cell 8, 751–764.

Glimcher, M.J. (1998). The Nature of the Mineral Phase in Bone: Biological and Clinical Implications. In Metabolic Bone Disease and Clinically Related Disorders, (Elsevier), pp. 23- 52e.

Goland, R., and Egli, D. (2014). Stem Cell-Derived Beta Cells for Treatment of Type 1 Diabetes? EBioMedicine 1, 93–94.

Golub, E.E., and Boesze-Battaglia, K. (2007). The role of alkaline phosphatase in mineralization: Current Opinion in Orthopaedics 18, 444–448.

Granero-Molto, F., Weis, J.A., Longobardi, L., and Spagnoli, A. (2008). Role of mesenchymal stem cells in regenerative medicine: application to bone and cartilage repair. Expert Opinion on Biological Therapy 8, 255–268.

Greber, B., Wu, G., Bernemann, C., Joo, J.Y., Han, D.W., Ko, K., Tapia, N., Sabour, D., Sterneckert, J., Tesar, P., et al. (2010). Conserved and Divergent Roles of FGF Signaling in Mouse Epiblast Stem Cells and Human Embryonic Stem Cells. Cell Stem Cell 6, 215–226.

Griffin, J.W., and Thompson, W.J. (2008). Biology and pathology of nonmyelinating Schwann cells. Glia 56, 1518–1531.

Grinspan, J.B., Marchionni, M.A., Reeves, M., Coulaloglou, M., and Scherer, S.S. (1996). Axonal Interactions Regulate Schwann Cell Apoptosis in Developing Peripheral Nerve: Neuregulin Receptors and the Role of Neuregulins. The Journal of Neuroscience 16, 6107– 6118.

Guo, H.-F., Tong, J., Hannan, F., Luo, L., and Zhong, Y. (2000). A neurofibromatosis-1-

regulated pathway is required for learning in Drosophila. Nature 403, 4.

Guo, J., Grovola, M.R., Xie, H., Coggins, G.E., Duggan, P., Hasan, R., Lin, D.W., Song, C., Witek, G.M., Berritt, S., et al. (2017) Comprehensive pharmacological profiling of neurofibromatosis cell lines. American Journal of Cancer Research 13.

Gutmann, D.H., and Giovannini, M. (2002). Mouse Models of Neurofibromatosis 1 and 2. Neoplasia 4, 279–290.

Gutmann, D.H., Wood, D.L., and Collins, F.S. (1991). Identification of the neurofibromatosis type 1 gene product. Proceedings of the National Academy of Sciences 88, 9658–9662.

Gutmann, D.H., Cole, J.L., and Collins, F.S. (1995). Chapter 33 Expression of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene during mouse embryonic development. In Progress in Brain Research, (Elsevier), pp. 327–335.

Gutmann, D.H., Ferner, R.E., Listernick, R.H., Korf, B.R., Wolters, P.L., and Johnson, K.J. (2017). Neurofibromatosis type 1. Nature Reviews Disease Primers 3, 17004.

Gutmann, D.H., Loehr, A., Zhang, Y., Kim, J., Henkemeyer, M., and Cashen, A. (1999) Haploinsu fficiency for the neurofibromatosis 1 (NF1) tumor suppressor results in increased astrocyte proliferation. Oncogene 10.

Haastert, K., Grosskreutz, J., Jaeckel, M., Laderer, C., Bufler, J., Grothe, C., and Claus, P. (2005). Rat embryonic motoneurons in long-term co-culture with Schwann cells—a system to investigate motoneuron diseases on a cellular level in vitro. Journal of Neuroscience Methods 142, 275–284.

Hannan, F., Ho, I., Tong, J.J., Zhu, Y., Nurnberg, P., and Zhong, Y. (2006). Effect of neurofibromatosis type I mutations on a novel pathway for adenylyl cyclase activation requiring neurofibromin and Ras. Human Molecular Genetics 15, 1087–1098.

Hatori, M., Teixeira, C.C., Debolt, K., Pacifici, M., and Shapiro, I.M. (1995). Adenine nucleotide metabolism by chondrocytes in vitro: Role of ATP in chondrocyte maturation and matrix mineralization. Journal of Cellular Physiology 165, 468–474.

Hegedus, B., Dasgupta, B., Shin, J.E., Emnett, R.J., Hart-Mahon, E.K., Elghazi, L., Bernal-Mizrachi, E., and Gutmann, D.H. (2007). Neurofibromatosis-1 Regulates Neuronal and Glial Cell Differentiation from Neuroglial Progenitors In Vivo by Both cAMP- and Ras-Dependent Mechanisms. Cell Stem Cell 1, 443–457.

H.Gutmann, D., B.Andersen, L., L.Cole, J., Swaroop, M., and S.Collins, F. (1993). An alternatively-spliced mRNA in the carboxy terminus of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene is expressed in muscle. Human Molecular Genetics 2, 989–992.

Homma, S., Beermann, M.L., and Miller, J.B. (2011). Peripheral nerve pathology, including aberrant Schwann cell differentiation, is ameliorated by doxycycline in a laminin- 2-deficient mouse model of congenital muscular dystrophy. Human Molecular Genetics 20, 2662–2672.

Hu, H. (2004). Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. Development 132, 49–60.

Hu, K., Yu, J., Suknuntha, K., Tian, S., Montgomery, K., Choi, K.-D., Stewart, R., Thomson, J.A., and Slukvin, I.I. (2011). Efficient generation of transgene-free induced pluripotent stem cells from normal and neoplastic bone marrow and cord blood mononuclear cells. Blood 117, e109–e119.

Huson, S.M., Compston, D.A., Clark, P., and Harper, P.S. (1989). A genetic study of von Recklinghausen neurofibromatosis in south east Wales. I. Prevalence, fitness, mutation rate, and effect of parental transmission on severity. Journal of Medical Genetics 26, 704–711.

Hyung, S., Yoon Lee, B., Park, J.-C., Kim, J., Hur, E.-M., and Francis Suh, J.-K. (2015). Coculture of Primary Motor Neurons and Schwann Cells as a Model for In Vitro Myelination. Scientific Reports 5.

Ikeda, M., Uemura, T., Takamatsu, K., Okada, M., Kazuki, K., Tabata, Y., Ikada, Y., and Nakamura, H. (2014). Acceleration of peripheral nerve regeneration using nerve conduits in combination with induced pluripotent stem cell technology and a basic fibroblast growth factor drug delivery system: Acceleration of peripheral nerve regeneration. Journal of Biomedical Materials Research Part A 102, 1370–1378.

Ingram, D.A., Hiatt, K., King, A.J., Fisher, L., Shivakumar, R., Derstine, C., Wenning, M.J., Diaz, B., Travers, J.B., Hood, A., et al. (2001). Hyperactivation of P21 ^{ras} and the Hematopoietic-Specific Rho Gtpase, Rac2, Cooperate to Alter the Proliferation of Neurofibromin-Deficient Mast Cells in Vivo and in Vitro. The Journal of Experimental Medicine *194*, 57–70.

Itskovitz-Eldor, J., Schuldiner, M., Karsenti, D., Eden, A., Amit, M., Soreq, H., and Benvenisty, N. (2000). Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Embryoid Bodies Comprising the Three Embryonic Germ Layers. Molecular Medicine 6, 8.

Jackson, W.M., Nesti, L.J., and Tuan, R.S. (2012). Mesenchymal stem cell therapy for attenuation of scar formation during wound healing. Stem Cell Research & Therapy 3, 20.

Jadhav, S.B., and Jain, G.K. (2006). Statins and osteoporosis: new role for old drugs. Journal of Pharmacy and Pharmacology 58, 3–18.

Jaegle, M. (2003). The POU proteins Brn-2 and Oct-6 share important functions in Schwann cell development. Genes & Development 17, 1380–1391.

Jaenisch, R., and Young, R. (2008). Stem Cells, the Molecular Circuitry of Pluripotency and Nuclear Reprogramming. Cell 132, 567–582.

James, D. (2005). TGF /activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. Development 132, 1273–1282.

Jessen, K.R. (2004). Glial cells. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 36, 1861–1867.

Jessen, K.R., and Mirsky, R. (2005). The origin and development of glial cells in peripheral nerves. Nature Reviews Neuroscience 6, 671–682.

Jessen, K.R., and Mirsky, R. (2016). The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves: Repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. The Journal of Physiology 594, 3521–3531.

Jessen, K.R., Brennan, A., Morgan, L., Mirsky, R., Kent, A., Hashimoto, Y., and Gavrilovic, J. (1994). The schwann cell precursor and its fate: A study of cell death and differentiation during gliogenesis in rat embryonic nerves. Neuron 12, 509–527.

Jett, K., and Friedman, J.M. (2010). Clinical and genetic aspects of neurofibromatosis 1. Genetics in Medicine 12, 1–11.

Jiang, L., Zhu, J.-K., Liu, X.-L., Xiang, P., Hu, J., and Yu, W.-H. (2008) Differentiation of rat adipose tissue-derived stem cells into Schwann-like cells in vitro. Neuroreport 5.

Jiang, X., Gwye, Y., McKeown, S.J., Bronner-Fraser, M., Lutzko, C., and Lawlor, E.R. (2009). Isolation and Characterization of Neural Crest Stem Cells Derived From In Vitro–Differentiated Human Embryonic Stem Cells. Stem Cells and Development 18, 1059–1071.

Jindal, G.A., Goyal, Y., Burdine, R.D., Rauen, K.A., and Shvartsman, S.Y. (2015). RASopathies: unraveling mechanisms with animal models. Disease Models & Mechanisms 15.

Jouhilahti, E.-M., Peltonen, S., Heape, A.M., and Peltonen, J. (2011). The Pathoetiology of Neurofibromatosis 1. The American Journal of Pathology 178, 1932–1939.

Jukes, J.M., Both, S.K., Leusink, A., Sterk, L.M.T., van Blitterswijk, C.A., and de Boer, J. (2008). Endochondral bone tissue engineering using embryonic stem cells. Proceedings of the National Academy of Sciences 105, 6840–6845.

Kainer, M.A., Whaley, D.N., Holmes, H.T., and Jernigan, D.B. (2004). Clostridium Infections Associated with Musculoskeletal-Tissue Allografts. The New England Journal of Medicine 8.

Karmakar, S., and Reilly, K.M. (2017a). The role of the immune system in neurofibromatosis type 1-associated nervous system tumors. CNS Oncology *6*, 45–60.

Kang, L., Wang, J., Zhang, Y., Kou, Z., and Gao, S. (2009). iPS Cells Can Support Full-Term Development of Tetraploid Blastocyst-Complemented Embryos. Cell Stem Cell 5, 135–138.

Kaufmann, D., Müller, R., Kenner, O., Leistner, W., Hein, C., Vogel, W., and Bartelt, B. (2002). The N-terminal splice product NF1-10a-2 of the NF1 gene codes for a transmembrane segment. Biochemical and Biophysical Research Communications 294, 496–503.

Kawaguchi, J., Nichols, J., Gierl, M.S., Faial, T., and Smith, A. (2010). Isolation and propagation of enteric neural crest progenitor cells from mouse embryonic stem cells and embryos. Development 137, 693–704.

Keng, V.W., Rahrmann, E.P., Watson, A.L., Tschida, B.R., Moertel, C.L., Jessen, W.J., Rizvi, T.A., Collins, M.H., Ratner, N., and Largaespada, D.A. (2012). PTEN and NF1 Inactivation in Schwann Cells Produces a Severe Phenotype in the Peripheral Nervous System That Promotes the Development and Malignant Progression of Peripheral Nerve Sheath Tumors. Cancer Research 72, 3405–3413.

Kettenmann, H., Kettenmann, H., and Ransom, B.R. (2013). Neuroglia (Oxford ; New York: Oxford University Press).

Kim, H.A., Ratner, N., Roberts, T.M., and Stiles, C.D. (2001). Schwann Cell Proliferative Responses to cAMP and Nf1 Are Mediated by Cyclin D1. The Journal of Neuroscience 21, 1110–1116.

Kim, J.B., Zaehres, H., Wu, G., Gentile, L., Ko, K., Sebastiano, V., Araúzo-Bravo, M.J., Ruau, D., Han, D.W., Zenke, M., et al. (2008). Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. Nature 454, 646–650.

Kim, K., Zhao, R., Doi, A., Ng, K., Unternaehrer, J., Cahan, P., Hongguang, H., Loh, Y.-H., Aryee, M.J., Lensch, M.W., et al. (2011). Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells. Nature Biotechnology 29, 1117–1119.

Kim, Y., Rim, Y.A., Yi, H., Park, N., Park, S.-H., and Ju, J.H. (2016). The Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells from Blood Cells: An Efficient Protocol Using Serial Plating of Reprogrammed Cells by Centrifugation. Stem Cells International 2016, 1–9.

Kingham, P.J., Kalbermatten, D.F., Mahay, D., Armstrong, S.J., Wiberg, M., and Terenghi, G. (2007). Adipose-derived stem cells differentiate into a Schwann cell phenotype and promote neurite outgrowth in vitro. Experimental Neurology 207, 267–274.

Kiuru, M., and Busam, K.J. (2017). The NF1 gene in tumor syndromes and melanoma. Laboratory Investigation 97, 146–157.

Kolanczyk, M., Kossler, N., Kühnisch, J., Lavitas, L., Stricker, S., Wilkening, U., Manjubala, I., Fratzl, P., Spörle, R., Herrmann, B.G., et al. (2007). Multiple roles for neurofibromin in skeletal development and growth. Human Molecular Genetics 16, 874–886.

Kolanczyk, M., Kühnisch, J., Kossler, N., Osswald, M., Stumpp, S., Thurisch, B., Kornak, U., and Mundlos, S. (2008). Modelling neurofibromatosis type 1 tibial dysplasia and its treatment with lovastatin. BMC Medicine 6.

Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R.., Gao, Y.-H., Inada, M., et al. (1997). Targeted Disruption of Cbfa1 Results in a Complete Lack of Bone Formation owing to Maturational Arrest of Osteoblasts. Cell 89, 755– 764.

Korf, B.R. (2008). Statins, bone, and neurofibromatosis type 1. BMC Medicine 6.

Krause, M.P., Dworski, S., Feinberg, K., Jones, K., Johnston, A.P.W., Paul, S., Paris, M., Peles, E., Bagli, D., Forrest, C.R., et al. (2014). Direct Genesis of Functional Rodent and Human Schwann Cells from Skin Mesenchymal Precursors. Stem Cell Reports 3, 85–100.

Kunarso, G., Chia, N.-Y., Jeyakani, J., Hwang, C., Lu, X., Chan, Y.-S., Ng, H.-H., and Bourque, G. (2010). Transposable elements have rewired the core regulatory network of human embryonic stem cells. Nature Genetics 42, 631–634.

Kuorilehto, T., Nissinen, M., Koivunen, J., Benson, M.D., and Peltonen, J. (2004). NF1 Tumor Suppressor Protein and mRNA in Skeletal Tissues of Developing and Adult Normal Mouse and NF1-Deficient Embryos. Journal of Bone and Mineral Research 19, 983–989.

Kuorilehto, T., Pöyhönen, M., Bloigu, R., Heikkinen, J., Väänänen, K., and Peltonen, J. (2005). Decreased bone mineral density and content in neurofibromatosis type 1: Lowest local values are located in the load-carrying parts of the body. Osteoporosis International 16, 928–936.

Kuznetsov, S.A., Cherman, N., and Robey, P.G. (2011). In Vivo Bone Formation by Progeny of Human Embryonic Stem Cells. Stem Cells and Development 20, 269–287.

Lakkis, M.M., and Epstein, J.A. (1998) Neurofibromin modulation of ras activity is required for normal endocardial- mesenchymal transformation in the developing heart. Development 9.

Lancaster, M.A., and Knoblich, J.A. (2014). Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. Science 345, 1247125–1247125.

Larizza, L., Gervasini, C., Natacci, F., and Riva, P. (2009). Developmental Abnormalities and Cancer Predisposition in Neurofibromatosis Type 1. Current Molecular Medicine 9, 634–653.

Larribere, L., Wu, H., Novak, D., Galach, M., Bernhardt, M., Orouji, E., Weina, K., Knappe, N., Sachpekidis, C., Umansky, L., et al. (2015). NF1 loss induces senescence during human melanocyte differentiation in an iPSC-based model. Pigment Cell & Melanoma Research *28*, 407–416.

Le, L.Q., and Parada, L.F. (2007). Tumor microenvironment and neurofibromatosis type I: connecting the GAPs. Oncogene 26, 4609–4616.

Le, L.Q., Liu, C., Shipman, T., Chen, Z., Suter, U., and Parada, L.F. (2011). Susceptible Stages in Schwann Cells for NF1-Associated Plexiform Neurofibroma Development. Cancer Research 71, 4686–4695.

Lebkowski, J. (2011). GRNOPC1: the world's first embryonic stem cell-derived therapy. Regenerative Medicine 6, 11–13.

Lee, D.-F., Su, J., Kim, H.S., Chang, B., Papatsenko, D., Zhao, R., Yuan, Y., Gingold, J., Xia, W., Darr, H., et al. (2015). Modeling Familial Cancer with Induced Pluripotent Stem Cells. Cell 161, 240–254.

Lee, G., Kim, H., Elkabetz, Y., Al Shamy, G., Panagiotakos, G., Barberi, T., Tabar, V., and

Studer, L. (2007). Isolation and directed differentiation of neural crest stem cells derived from human embryonic stem cells. Nature Biotechnology 25, 1468–1475.

Lee, G., Chambers, S.M., Tomishima, M.J., and Studer, L. (2010). Derivation of neural crest cells from human pluripotent stem cells. Nature Protocols 5, 688–701.

Leskelä, H.-V., Kuorilehto, T., Risteli, J., Koivunen, J., Nissinen, M., Peltonen, S., Kinnunen, P., Messiaen, L., Lehenkari, P., and Peltonen, J. (2009). Congenital pseudarthrosis of neurofibromatosis type 1: Impaired osteoblast differentiation and function and altered NF1 gene expression. Bone 44, 243–250.

Li, H., Chang, L.-J., Neubauer, D.R., Muir, D.F., and Wallace, M.R. (2016). Immortalization of human normal and NF1 neurofibroma Schwann cells. Laboratory Investigation *96*, 1105–1115.

Li, K., Turner, A.N., Chen, M., Brosius, S.N., Schoeb, T.R., Messiaen, L.M., Bedwell, D.M., Zinn, K.R., Anastasaki, C., Gutmann, D.H., et al. (2016). Mice with missense and nonsense NF1 mutations display divergent phenotypes compared with human neurofibromatosis type I. Disease Models & Mechanisms 9, 759–767.

Li, W., Cui, Y., Kushner, S.A., Brown, R.A.M., Jentsch, J.D., Frankland, P.W., Cannon, T.D., and Silva, A.J. (2005). The HMG-CoA Reductase Inhibitor Lovastatin Reverses the Learning and Attention Deficits in a Mouse Model of Neurofibromatosis Type 1. Current Biology 15, 1961–1967.

Li, W., Wei, W., Zhu, S., Zhu, J., Shi, Y., Lin, T., Hao, E., Hayek, A., Deng, H., and Ding, S. (2009). Generation of Rat and Human Induced Pluripotent Stem Cells by Combining Genetic Reprogramming and Chemical Inhibitors. Cell Stem Cell 4, 16–19.

Li, X., Cui, Q., Kao, C., Wang, G.-J., and Balian, G. (2003). Lovastatin inhibits adipogenic and stimulates osteogenic differentiation by suppressing PPARγ2 and increasing Cbfa1/Runx2 expression in bone marrow mesenchymal cell cultures. Bone 33, 652–659.

Li, Y., Li, J., Zhou, Q., Liu, Y., Chen, W., and Xu, H. (2017). mTORC1 signaling is essential for neurofibromatosis type I gene modulated osteogenic differentiation of BMSCs: mTORC1 and BMSC osteogenic differentiation in NF1. Journal of Cellular Biochemistry.

Lian, Q., Zhang, Y., Zhang, J., Zhang, H.K., Wu, X., Zhang, Y., Lam, F.F.-Y., Kang, S., Xia, J.C., Lai, W.-H., et al. (2010). Functional Mesenchymal Stem Cells Derived From Human Induced Pluripotent Stem Cells Attenuate Limb Ischemia in Mice. Circulation 121, 1113– 1123.

Lin, A.L., and Gutmann, D.H. (2013). Advances in the treatment of neurofibromatosis- associated tumours. Nature Reviews Clinical Oncology 10, 616–624.

Listernick, R. (1994). Natural history of optic pathway tumors in children with neurofibromatosis type I' A longitudinal study. The Journal of Pediatrics 4.

Listernick, R., Darling, C., Greenwald, M., and Strauss, L. (1995). Optic pathway tumors in children: The effect of neurofibromatosis type 1 on clinical manifestations and natural history.

The Journal of Pediatrics 127, 5.

Listernick, R., Ferner, R.E., Liu, G.T., and Gutmann, D.H. (2007). Optic pathway gliomas in neurofibromatosis-1: Controversies and recommendations. Annals of Neurology 61, 189– 198.

Liu, H., Zhu, F., Yong, J., Zhang, P., Hou, P., Li, H., Jiang, W., Cai, J., Liu, M., Cui, K., et al. (2008). Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Adult Rhesus Monkey Fibroblasts. Cell Stem Cell 3, 587–590.

Liu, Q., Spusta, S.C., Mi, R., Lassiter, R.N.T., Stark, M.R., Höke, A., Rao, M.S., and Zeng, X. (2012). Human Neural Crest Stem Cells Derived from Human ESCs and Induced Pluripotent Stem Cells: Induction, Maintenance, and Differentiation into Functional Schwann Cells. Stem Cells Translational Medicine 1, 266–278.

Loh, Y.-H., Wu, Q., Chew, J.-L., Vega, V.B., Zhang, W., Chen, X., Bourque, G., George, J., Leong, B., Liu, J., et al. (2006). The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. Nature Genetics 38, 431–440.

Lou, X. (2015). Induced Pluripotent Stem Cells as a new Strategy for Osteogenesis and Bone Regeneration. Stem Cell Reviews and Reports 11, 645–651.

Ma, M.-S., Boddeke, E., and Copray, S. (2015). Pluripotent Stem Cells for Schwann Cell Engineering. Stem Cell Reviews and Reports 11, 205–218.

Macklon, N.S. (2002). Conception to ongoing pregnancy: the “black box” of early pregnancy loss. Human Reproduction Update 8, 333–343.

Maes, C., Kobayashi, T., Selig, M.K., Torrekens, S., Roth, S.I., Mackem, S., Carmeliet, G., and Kronenberg, H.M. (2010). Osteoblast Precursors, but Not Mature Osteoblasts, Move into Developing and Fractured Bones along with Invading Blood Vessels. Developmental Cell 19, 329–344.

Maherali, N., Sridharan, R., Xie, W., Utikal, J., Eminli, S., Arnold, K., Stadtfeld, M., Yachechko, R., Tchieu, J., Jaenisch, R., et al. (2007). Directly Reprogrammed Fibroblasts Show Global Epigenetic Remodeling and Widespread Tissue Contribution. Cell Stem Cell 1, 55–70.

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.

Malik, N., and Rao, M.S. (2013). A Review of the Methods for Human iPSC Derivation. In Pluripotent Stem Cells, U. Lakshmipathy, and M.C. Vemuri, eds. (Totowa, NJ: Humana Press), pp. 23–33.

Marks, S.C., and Odgren, P.R. Structure and Developmentof the Skeleton. 13.

Markus, A., Zhong, J., and Snider, W.D. (2002). Raf and Akt Mediate Distinct Aspects of Sensory Axon Growth. Neuron 35, 65–76.

Marolt, D., Campos, I.M., Bhumiratana, S., Koren, A., Petridis, P., Zhang, G., Spitalnik, P.F., Grayson, W.L., and Vunjak-Novakovic, G. (2012). Engineering bone tissue from human embryonic stem cells. Proceedings of the National Academy of Sciences 109, 8705–8709.

Martello, G., and Smith, A. (2014). The Nature of Embryonic Stem Cells. Annual Review of Cell and Developmental Biology 30, 647–675.

Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proceedings of the National Academy of Sciences 78, 7634–7638.

Masaki, T., and Matsumura, K. (2010). Biological Role of Dystroglycan in Schwann Cell Function and Its Implications in Peripheral Nervous System Diseases. Journal of Biomedicine and Biotechnology 2010, 1–17.

Masui, S., Nakatake, Y., Toyooka, Y., Shimosato, D., Yagi, R., Takahashi, K., Okochi, H., Okuda, A., Matoba, R., Sharov, A.A., et al. (2007). Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. Nature Cell Biology 9, 625– 635.

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. Human Reproduction 21, 503–511.

Matsumoto, Y., Hayashi, Y., Schlieve, C.R., Ikeya, M., Kim, H., Nguyen, T.D., Sami, S., Baba, S., Barruet, E., Nasu, A., et al. (2013). Induced pluripotent stem cells from patients with human fibrodysplasia ossificans progressiva show increased mineralization and cartilage formation. Orphanet Journal of Rare Diseases 8, 190.

Matsushita, T., Chan, Y.Y., Kawanami, A., Balmes, G., Landreth, G.E., and Murakami, S. (2009). Extracellular Signal-Regulated Kinase 1 (ERK1) and ERK2 Play Essential Roles in Osteoblast Differentiation and in Supporting Osteoclastogenesis. Molecular and Cellular Biology 29, 5843–5857.

Maury, Y., Gauthier, M., Peschanski, M., and Martinat, C. (2012). Human pluripotent stem cells for disease modelling and drug screening. BioEssays 34, 61–71.

Mayes, D.A., Rizvi, T.A., Cancelas, J.A., Kolasinski, N.T., Ciraolo, G.M., Stemmer-Rachamimov, A.O., and Ratner, N. (2011). Perinatal or Adult Nf1 Inactivation Using Tamoxifen-Inducible PlpCre Each Cause Neurofibroma Formation. Cancer Research *71*, 4675–4685.

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.

McDaniel, A.S., Allen, J.D., Park, S.-J., Jaffer, Z.M., Michels, E.G., Burgin, S.J., Chen, S., Bessler, W.K., Hofmann, C., Ingram, D.A., et al. (2008). Pak1 regulates multiple c-Kit mediated Ras-MAPK gain-in-function phenotypes in Nf1+/- mast cells. Blood *112*, 4646–4654.

McKenzie, I.A., Biernaskie, J., Toma, J.G., Midha, R., and Miller, F.D. (2006). Skin-Derived Precursors Generate Myelinating Schwann Cells for the Injured and Dysmyelinated Nervous System. Journal of Neuroscience 26, 6651–6660.

Mellert, K., Lechner, S., Lüdeke, M., Lamla, M., Möller, P., Kemkemer, R., Scheffzek, K., and Kaufmann, D. (2018). Restoring functional neurofibromin by protein transduction. Scientific Reports *8*.

Menendez, L., Kulik, M.J., Page, A.T., Park, S.S., Lauderdale, J.D., Cunningham, M.L., and Dalton, S. (2013). Directed differentiation of human pluripotent cells to neural crest stem cells. Nature Protocols 8, 203–212.

Michailov, G.V. (2004). Axonal Neuregulin-1 Regulates Myelin Sheath Thickness. Science 304, 700–703.

Miller, S.J., Jessen, W.J., Mehta, T., Hardiman, A., Sites, E., Kaiser, S., Jegga, A.G., Li, H., Upadhyaya, M., Giovannini, M., et al. (2009). Integrative genomic analyses of neurofibromatosis tumours identify SOX9 as a biomarker and survival gene: Gene expression in neurofibroma and MPNST. EMBO Molecular Medicine *1*, 236–248.

Mimura, T., Dezawa, M., Kanno, H., Sawada, H., and Yamamoto, I. (2004). Peripheral nerve regeneration by transplantation of bone marrow stromal cell—derived Schwann cells in adult rats. Journal of Neurosurgery 101, 806–812.

Mitalipova, M.M., Rao, R.R., Hoyer, D.M., Johnson, J.A., Meisner, L.F., Jones, K.L., Dalton, S., and Stice, S.L. (2005). Preserving the genetic integrity of human embryonic stem cells. Nature Biotechnology 23, 19–20.

Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., and Yamanaka, S. (2003). The Homeoprotein Nanog Is Required for Maintenance of Pluripotency in Mouse Epiblast and ES Cells. Cell 113, 631–642.

Mizuseki, K., Sakamoto, T., Watanabe, K., Muguruma, K., Ikeya, M., Nishiyama, A., Arakawa, A., Suemori, H., Nakatsuji, N., Kawasaki, H., et al. (2003). Generation of neural crest-derived peripheral neurons and floor plate cells from mouse and primate embryonic stem cells. Proceedings of the National Academy of Sciences 100, 5828–5833.

Monroe, C.L., Dahiya, S., and Gutmann, D.H. (2017). Dissecting Clinical Heterogeneity in Neurofibromatosis Type 1. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease 12, 53–74.

Mori, M., Nishikawa, T., Masuno, K., Okamura, T., Tanaka, A., and Shikimori, M. (2010). Statins: candidates for promoting bone formation via BMP-2. Oral Medicine & Pathology 14, 81–87.

Morohaku, K., Tanimoto, R., Sasaki, K., Kawahara-Miki, R., Kono, T., Hayashi, K., Hirao, Y., and Obata, Y. (2016). Complete in vitro generation of fertile oocytes from mouse primordial germ cells. Proceedings of the National Academy of Sciences 113, 9021–9026.

Morrison, S.J., White, P.M., Zock, C., and Anderson, D.J. (1999). Prospective Identification, Isolation by Flow Cytometry, and In Vivo Self-Renewal of Multipotent Mammalian Neural Crest

Stem Cells. Cell 96, 737–749.

Motohashi, T., Aoki, H., Chiba, K., Yoshimura, N., and Kunisada, T. (2007). Multipotent Cell Fate of Neural Crest-Like Cells Derived from Embryonic Stem Cells. Stem Cells 25, 402–410.

Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J.M., Behringer, R.R., and de Crombrugghe, B. (2002). The Novel Zinc Finger-Containing Transcription Factor Osterix Is Required for Osteoblast Differentiation and Bone Formation. Cell 108, 17–29.

Newbern, J., and Birchmeier, C. (2010). Nrg1/ErbB signaling networks in Schwann cell development and myelination. Seminars in Cell & Developmental Biology 21, 922–928.

Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Schöler, H., and Smith, A. (1998). Formation of Pluripotent Stem Cells in the Mammalian Embryo Depends on the POU Transcription Factor Oct4. Cell 95, 379–391.

NISC Comparative Sequencing Program, NCI DCEG Cancer Genomics Research Laboratory, Pemov, A., Li, H., Patidar, R., Hansen, N.F., Sindiri, S., Hartley, S.W., Wei, J.S., Elkahloun, A., et al. (2017). The primacy of NF1 loss as the driver of tumorigenesis in neurofibromatosis type 1-associated plexiform neurofibromas. Oncogene *36*, 3168–3177.

Nishimura, R., Hata, K., Ono, K., Takashima, R., Yoshida, M., and Yoneda, T. (2012). Regulation of endochondral ossification by transcription factors. Journal of Oral Biosciences 54, 180–183.

Nitzan, E., Pfaltzgraff, E.R., Labosky, P.A., and Kalcheim, C. (2013). Neural crest and Schwann cell progenitor-derived melanocytes are two spatially segregated populations similarly regulated by Foxd3. Proceedings of the National Academy of Sciences 110, 12709– 12714.

Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A.G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. Nature Genetics 24, 372–376.

Niwa, H., Toyooka, Y., Shimosato, D., Strumpf, D., Takahashi, K., Yagi, R., and Rossant, J. (2005). Interaction between Oct3/4 and Cdx2 Determines Trophectoderm Differentiation. Cell 123, 917–929.

Nordlund, M., Gu, X., Shipley, M., and Ratner, N. (1993). Neurofibromin is enriched in the endoplasmic reticulum of CNS neurons. The Journal of Neuroscience 13, 1588–1600.

Oberlender, S.A., and Tuan, R.S. (1994) Expression and functional involvement of N-cadherin in embryonic limb chondrogenesis. Development 11.

Obokata, H., Wakayama, T., Sasai, Y., Kojima, K., Vacanti, M.P., Niwa, H., Yamato, M., and Vacanti, C.A. (2014). Retraction Note to: Stimulus-triggered fate conversion of somatic cells into pluripotency. Nature 505, 641–647.

Ohnaka, K., Shimoda, S., Nawata, H., Shimokawa, H., Kaibuchi, K., Iwamoto, Y., and Takayanagi, R. (2001). Pitavastatin Enhanced BMP-2 and Osteocalcin Expression by Inhibition of Rho-Associated Kinase in Human Osteoblasts. Biochemical and Biophysical Research

Communications 287, 337–342.

Okawa, T., Kamiya, H., Himeno, T., Kato, J., Seino, Y., Fujiya, A., Kondo, M., Tsunekawa, S., Naruse, K., Hamada, Y., et al. (2013). Transplantation of Neural Crest-Like Cells Derived from Induced Pluripotent Stem Cells Improves Diabetic Polyneuropathy in Mice. Cell Transplantation 22, 1767–1783.

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.

Ovchinnikov, D.A., Deng, J.M., Ogunrinu, G., and Behringer, R.R. (2000). Col2a1-directed expression of Cre recombinase in differentiating chondrocytes in transgenic mice. Genesis 26, 145–146.

Palm, A.-K.E., Garcia-Faroldi, G., Lundberg, M., Pejler, G., and Kleinau, S. (2016). Activated mast cells promote differentiation of B cells into effector cells. Scientific Reports *6*.

Päiväläinen, S., Nissinen, M., Honkanen, H., Lahti, O., Kangas, S.M., Peltonen, J., Peltonen, S., and Heape, A.M. (2008). Myelination in mouse dorsal root ganglion/Schwann cell cocultures. Molecular and Cellular Neuroscience 37, 568–578.

Papaioannou, G., Mirzamohammadi, F., and Kobayashi, T. (2016). Ras signaling regulates osteoprogenitor cell proliferation and bone formation. Cell Death & Disease 7, e2405–e2405.

Parish, C.R. (1999). Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. Immunology and Cell Biology 77, 499–508.

Park, J.-B. (2009). The use of simvastatin in bone regeneration. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 4.

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. (2008). Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. Nature 451, 141–146.

Pasmant, E., Masliah-Planchon, J., Lévy, P., Laurendeau, I., Ortonne, N., Parfait, B., Valeyrie-Allanore, L., Leroy, K., Wolkenstein, P., Vidaud, M., et al. (2011) Identification of Genes Potentially Involved in the Increased Risk of Malignancy in NF1-Microdeleted Patients. Molecular Medecine 9.

Pemov, A., Sung, H., Hyland, P.L., Sloan, J.L., Ruppert, S.L., Baldwin, A.M., Boland, J.F., Bass, S.E., Lee, H.J., Jones, K.M., et al. (2014). Genetic Modifiers of Neurofibromatosis Type 1-Associated Café-au-Lait Macule Count Identified Using Multi-platform Analysis. PLoS Genetics *10*, e1004575.

Pera, M.F. (2004). Regulation of human embryonic stem cell differentiation by BMP-2 and its antagonist noggin. Journal of Cell Science 117, 1269–1280.

Pomp, O., Brokhman, I., Ben-Dor, I., Reubinoff, B., and Goldstein, R.S. (2005). Generation of Peripheral Sensory and Sympathetic Neurons and Neural Crest Cells from Human Embryonic Stem Cells. Stem Cells 23, 923–930.

Pomp, O., Brokhman, I., Ziegler, L., Almog, M., Korngreen, A., Tavian, M., and Goldstein, R.S. (2008). PA6-induced human embryonic stem cell-derived neurospheres: a new source of human peripheral sensory neurons and neural crest cells. Brain Research 1230, 50–60.

Prada, C.E., Jousma, E., Rizvi, T.A., Wu, J., Dunn, R.S., Mayes, D.A., Cancelas, J.A., Dombi, E., Kim, M.-O., West, B.L., et al. (2013). Neurofibroma-associated macrophages play roles in tumor growth and response to pharmacological inhibition. Acta Neuropathologica *125*, 159–168.

Previtali, S.C., Nodari, A., Taveggia, C., Pardini, C., Dina, G., Villa, A., Wrabetz, L., Quattrini, A., and Feltri, M.L. (2003). Expression of Laminin Receptors in Schwann Cell Differentiation: Evidence for Distinct Roles. The Journal of Neuroscience 23, 5520–5530.

Prokhorova, T.A., Harkness, L.M., Frandsen, U., Ditzel, N., Schrøder, H.D., Burns, J.S., and Kassem, M. (2009). Teratoma Formation by Human Embryonic Stem Cells Is Site Dependent and Enhanced by the Presence of Matrigel. Stem Cells and Development 18, 47–54.

Rasmussen, S.A., Yang, Q., and Friedman, J.M. (2001). Mortality in Neurofibromatosis 1: An Analysis Using U.S. Death Certificates. The American Journal of Human Genetics 68, 1110–1118.

Ratner, N., and Miller, S.J. (2015). A RASopathy gene commonly mutated in cancer: the neurofibromatosis type 1 tumour suppressor. Nature Reviews Cancer 15, 290–301.

Reubinoff, B.E., Pera, M.F., Fong, C.-Y., Trounson, A., and Bongso, A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. Nature Biotechnology 18, 399–404.

Rice', D., and Jr, S.B. (2000). Critical Periods of Vulnerability for the Developing Nervous System: Evidence from Humans and Animal Models. Environmental Health Perspectives 108, 23.

Richetta, A., Giustini, S., Recupero, S., Pezza, M., Carlomagno, V., Amoruso, G., and Calvieri, S. (2004). Lisch nodules of the iris in neurofibromatosis type 1. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology 18, 342–344.

Riddle, N.D., Gorden, L., Rojiani, M.V., Hakam, A., and Rojiani, A.M. (2010) CD44 and p53 immunoexpression patterns in NF1 neoplasms - indicators of malignancy and infiltration. International Journal of Clinical and Experimental Pathology 7.

Rivron, N.C., Frias-Aldeguer, J., Vrij, E.J., Boisset, J.-C., Korving, J., Vivié, J., Truckenmüller, R.K., van Oudenaarden, A., van Blitterswijk, C.A., and Geijsen, N. (2018). Blastocyst-like structures generated solely from stem cells. Nature 557, 106–111.

Rodriguez, F.J., Giannini, C., Spinner, R.J., and Perry, A. (2018). Tumors of Peripheral Nerve. In Practical Surgical Neuropathology: A Diagnostic Approach, (Elsevier), pp. 323– 373.

Ross, F.P. (2006). M-CSF, c-Fms, and Signaling in Osteoclasts and their Precursors. Annals of the New York Academy of Sciences 1068, 110–116.

Roth, T.M., Ramamurthy, P., Ebisu, F., Lisak, R.P., Bealmear, B.M., and Barald, K.F. (2007). A mouse embryonic stem cell model of Schwann cell differentiation for studies of the role of neurofibromatosis type 1 in Schwann cell development and tumor formation. Glia 55, 1123–1133.

Ruan, F., Zheng, Q., and Wang, J. (2012). Mechanisms of bone anabolism regulated by statins. Bioscience Reports 32, 511–519.

Rutkovskiy, A., Stensløkken, K.-O., and Vaage, I.J. (2016). Osteoblast Differentiation at a Glance. Medical Science Monitor Basic Research 22, 95–106.

Rutledge, K., Cheng, Q., Pryzhkova, M., Harris, G.M., and Jabbarzadeh, E. (2014). Enhanced Differentiation of Human Embryonic Stem Cells on Extracellular Matrix-Containing Osteomimetic Scaffolds for Bone Tissue Engineering. Tissue Engineering Part C: Methods 20, 865–874.

Sabbagh, A., Pasmant, E., Laurendeau, I., Parfait, B., Barbarot, S., Guillot, B., Combemale, P., Ferkal, S., Vidaud, M., Aubourg, P., et al. (2009). Unravelling the genetic basis of variable clinical expression in neurofibromatosis 1. Human Molecular Genetics *18*, 2768–2778.

Sakamoto, A., Yoshida, T., Yamamoto, H., Oda, Y., Tsuneyoshi, M., and Iwamoto, Y. (2007). Congenital pseudarthrosis of the tibia: analysis of the histology and the NF1 gene. Journal of Orthopaedic Science 12, 361–365.

Sakaue, M., and Sieber-Blum, M. (2015). Human epidermal neural crest stem cells as a source of Schwann cells. Development 142, 3188–3197.

Schindeler, A., Ramachandran, M., Godfrey, C., Morse, A., McDonald, M., Mikulec, K., and Little, D.G. (2008a). Modeling bone morphogenetic protein and bisphosphonate combination therapy in wild-type andNf1 haploinsufficient mice. Journal of Orthopaedic Research 26, 65– 74.

Schindeler, A., Morse, A., Harry, L., Godfrey, C., Mikulec, K., McDonald, M., Gasser, J.A., and Little, D.G. (2008b). Models of tibial fracture healing in normal and Nf1-deficient mice. Journal of Orthopaedic Research 26, 1053–1060.

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. The Lancet 379, 713–720.

Schwetz, V., Pieber, T., and Obermayer-Pietsch, B. (2012). MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: The endocrine role of the skeleton: background and clinical evidence. European Journal of Endocrinology 166, 959–967.

Seitz, S., Schnabel, C., Busse, B., Schmidt, H.U., Beil, F.T., Friedrich, R.E., Schinke, T., Mautner, V.F., and Amling, M. (2010). High bone turnover and accumulation of osteoid in

patients with neurofibromatosis 1. Osteoporosis International 21, 119–127.

Seki, T., Yuasa, S., Oda, M., Egashira, T., Yae, K., Kusumoto, D., Nakata, H., Tohyama, S., Hashimoto, H., Kodaira, M., et al. (2010). Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Terminally Differentiated Circulating T Cells. Cell Stem Cell 7, 11–14.

Shamblott, M.J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E.M., Littlefield, J.W., Donovan, P.J., Blumenthal, P.D., Huggins, G.R., and Gearhart, J.D. (1998). Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. Developmental Biology 6.

Sharafi, P., and Ayter, S. (2018). Possible modifier genes in the variation of neurofibromatosis type 1 clinical phenotypes. Journal of Neurogenetics 32, 65–77.

Sherman, D.L., and Brophy, P.J. (2005). Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. Nature Reviews Neuroscience 6, 683–690.

Shimizu, K., Ito, A., Yoshida, T., Yamada, Y., Ueda, M., and Honda, H. (2007). Bone tissue engineering with human mesenchymal stem cell sheets constructed using magnetite nanoparticles and magnetic force. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials 82B, 471–480.

Sieber-Blum, M., Grim, M., Hu, Y.F., and Szeder, V. (2004). Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle. Developmental Dynamics 231, 258–269.

Simoes-Costa, M., and Bronner, M.E. (2015). Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe. Development 142, 242–257.

Singh, A.M., Reynolds, D., Cliff, T., Ohtsuka, S., Mattheyses, A.L., Sun, Y., Menendez, L., Kulik, M., and Dalton, S. (2012). Signaling Network Crosstalk in Human Pluripotent Cells: A Smad2/3-Regulated Switch that Controls the Balance between Self-Renewal and Differentiation. Cell Stem Cell 10, 312–326.

Skoglund, B., and Aspenberg, P. (2007). Locally applied Simvastatin improves fracture healing in mice. BMC Musculoskeletal Disorders 8.

Skoglund, B., Forslund, C., and Aspenberg, P. (2002). Simvastatin Improves Fracture Healing in Mice. Journal of Bone and Mineral Research 17, 2004–2008.

Skuse, G. (1997). RNA processing and clinical variability in neurofibromatosis type I (NF1). Human Molecular Genetics 6, 1707–1712.

Smith, M.J., Isidor, B., Beetz, C., Williams, S.G., Bhaskar, S.S., Richer, W., O'Sullivan, J., Anderson, B., Daly, S.B., Urquhart, J.E., et al. (2015). Mutations in LZTR1 add to the complex heterogeneity of schwannomatosis. Neurology 84, 141–147.

Solter, D., and Knowles, B.B. (1975). Immunosurgery of mouse blastocyst. Proceedings of the National Academy of Sciences 72, 5099–5102.

Šošić, D., Brand-Saberi, B., Schmidt, C., Christ, B., and Olson, E.N. (1997). Regulation ofparaxisExpression and Somite Formation by Ectoderm- and Neural Tube-Derived Signals. Developmental Biology 185, 229–243.

Stadtfeld, M., and Hochedlinger, K. (2010). Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. Genes & Development 24, 2239–2263.

Stemple, D.L., and Anderson, D.J. (1992). Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. Cell 71, 973–985.

Stenderup, K. (2003). Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. Bone 33, 919–926.

Stevenson, D.A., Zhou, H., Ashrafi, S., Messiaen, L.M., Carey, J.C., D'Astous, J.L., Santora, S.D., and Viskochil, D.H. (2006). Double Inactivation of NF1 in Tibial Pseudarthrosis. The American Journal of Human Genetics 79, 143–148.

Stevenson, D.A., Schwarz, E.L., Viskochil, D.H., Moyer-Mileur, L.J., Murray, M., Firth, S.D., D'Astous, J.L., Carey, J.C., and Pasquali, M. (2008). Evidence of Increased Bone Resorption in Neurofibromatosis Type 1 Using Urinary Pyridinium Crosslink Analysis. Pediatric Research 63, 697–701.

Stewart, H.J.S., Turner, D., Jessen, K.R., and Mirsky, R. (1997). Expression and regulation of ?1?1 integrin in Schwann cells. Journal of Neurobiology 33, 914–928.

Taapken, S.M., Nisler, B.S., Newton, M.A., Sampsell-Barron, T.L., Leonhard, K.A., McIntire, E.M., and Montgomery, K.D. (2011). Karyotypic abnormalities in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells. Nature Biotechnology 29, 313–314.

Tachibana, M., Amato, P., Sparman, M., Gutierrez, N.M., Tippner-Hedges, R., Ma, H., Kang, E., Fulati, A., Lee, H.-S., Sritanaudomchai, H., et al. (2013). Human Embryonic Stem Cells Derived by Somatic Cell Nuclear Transfer. Cell 153, 1228–1238.

Tahaei, S.E., Couasnay, G., Ma, Y., Paria, N., Gu, J., Lemoine, B.F., Wang, X., Rios, J.J., and Elefteriou, F. (2018). The reduced osteogenic potential of Nf1 -deficient osteoprogenitors is EGFR-independent. Bone 106, 103–111.

Taiani, J.T., Krawetz, R.J., Yamashita, A., Pauchard, Y., Buie, H.R., Ponjevic, D., Boyd, S.K., Rancourt, D.E., and Matyas, J.R. (2013). Embryonic Stem Cells Incorporate into Newly Formed Bone and do Not Form Tumors in an Immunocompetent Mouse Fracture Model. Cell Transplantation 22, 1453–1462.

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.

Terpstra, L., Prud'homme, J., Arabian, A., Takeda, S., Karsenty, G., Dedhar, S., and St- Arnaud, R. (2003). Reduced chondrocyte proliferation and chondrodysplasia in mice lacking the integrin-linked kinase in chondrocytes. The Journal of Cell Biology 162, 139–148.

The Neurofibromatosis Institute, 5415 Briggs Avenue, La Crescenta, CA 91214, USA, and Riccardi, V.M. (2015). Current Utilization of Mast Cell Stabilizers for Preemptive Treatment of NF1 Neurofibromas. Neuro - Open Journal *2*, 67–73.

Thomson, J.A. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. Science 282, 1145–1147.

Tokuzawa, Y., Kaiho, E., Maruyama, M., Takahashi, K., Mitsui, K., Maeda, M., Niwa, H., and Yamanaka, S. (2003). Fbx15 Is a Novel Target of Oct3/4 but Is Dispensable for Embryonic Stem Cell Self-Renewal and Mouse Development. Molecular and Cellular Biology 23, 2699– 2708.

Toma, J.G., McKenzie, I.A., Bagli, D., and Miller, F.D. (2005). Isolation and Characterization of Multipotent Skin-Derived Precursors from Human Skin. Stem Cells 23, 727–737.

Trentin, A., Glavieux-Pardanaud, C., Le Douarin, N.M., and Dupin, E. (2004). Self-renewal capacity is a widespread property of various types of neural crest precursor cells. Proceedings of the National Academy of Sciences 101, 4495–4500.

Trovó-Marqui, A., and Tajara, E. (2006). Neurofibromin: a general outlook. Clinical Genetics 70, 1–13.

Uemura, T., Takamatsu, K., Ikeda, M., Okada, M., Kazuki, K., Ikada, Y., and Nakamura, H. (2012). Transplantation of induced pluripotent stem cell-derived neurospheres for peripheral nerve repair. Biochemical and Biophysical Research Communications 419, 130–135.

Upadhyaya, M., Spurlock, G., Thomas, L., Thomas, N.S.T., Richards, M., Mautner, V.-F., Cooper, D.N., Guha, A., and Yan, J. (2012). Microarray-based copy number analysis of neurofibromatosis type-1 (NF1)-associated malignant peripheral nerve sheath tumors reveals a role for Rho-GTPase pathway genes in NF1 tumorigenesis. Human Mutation *33*, 763–776.

Urbach, A. (2004). Modeling for Lesch-Nyhan Disease by Gene Targeting in Human Embryonic Stem Cells. Stem Cells 22, 635–641.

Utikal, J., Maherali, N., Kulalert, W., and Hochedlinger, K. (2009). Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells. Journal of Cell Science 122, 3502–3510.

Van Meter, M.E.M., Diaz-Flores, E., Archard, J.A., Passegue, E., Irish, J.M., Kotecha, N., Nolan, G.P., Shannon, K., and Braun, B.S. (2007). K-RasG12D expression induces hyperproliferation and aberrant signaling in primary hematopoietic stem/progenitor cells. Blood 109, 3945–3952.

Van Raamsdonk, C.D., and Deo, M. (2013). Links between Schwann cells and melanocytes in development and disease. Pigment Cell & Melanoma Research 26, 634–645.

Varela, C., Denis, J.A., Polentes, J., Feyeux, M., Aubert, S., Champon, B., Piétu, G., Peschanski, M., and Lefort, N. (2012). Recurrent genomic instability of chromosome 1q in neural derivatives of human embryonic stem cells. Journal of Clinical Investigation 122, 569– 574.

Varin, J., Poulain, L., Hivelin, M., Nusbaum, P., Laurendeau, I., Lantieri, L., Wolkenstein, P., Pasmant, E., Chapuis, N., and Parfait, B. (2016) Dual mTORC1/2 inhibition induces anti-proliferative effect in NF1-associated plexiform neurofibroma and malignant peripheral nerve sheath tumor cells**.** Oncotarget 15.

Viskochil, D. (1999). Neurofibromatosis 1. American Journal of Medical Genetics 89, v–viii.

Viskochil, D. (2002). Review Article : Genetics of Neurofibromatosis 1 and the NF1 Gene. Journal of Child Neurology 17, 562–570.

de Waegh, S.M., Lee, V.M.-Y., and Brady, S.T. (1992). Local modulation of neurofilament phosphorylation, axonal caliber, and slow axonal transport by myelinating Schwann cells. Cell 68, 451–463.

Wallace, M.R., Marchuk, D.A., Andersen, L.B., Letcher, R., Odeh, H.M., Saulino, A.M., Fountain, J.W., Nicholson, J., Mitchell, A.L., Brownstein, B.H., et al. (1990) Type 1 Neurofibromatosis Gene: Identification of a Large Transcript Disrupted in Three NF1 Patients. Sicence 249, 6.

Wang, A., Tang, Z., Park, I.-H., Zhu, Y., Patel, S., Daley, G.Q., and Li, S. (2011a). Induced pluripotent stem cells for neural tissue engineering. Biomaterials 32, 5023–5032.

Wang, W., Nyman, J.S., Ono, K., Stevenson, D.A., Yang, X., and Elefteriou, F. (2011b). Mice lacking Nf1 in osteochondroprogenitor cells display skeletal dysplasia similar to patients with neurofibromatosis type I. Human Molecular Genetics 20, 3910–3924.

Wang, Y., Kim, E., Wang, X., Novitch, B.G., Yoshikawa, K., Chang, L.-S., and Zhu, Y. (2012a). ERK Inhibition Rescues Defects in Fate Specification of Nf1-Deficient Neural Progenitors and Brain Abnormalities. Cell 150, 816–830.

Wang, Z., Oron, E., Nelson, B., Razis, S., and Ivanova, N. (2012b). Distinct Lineage Specification Roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in Human Embryonic Stem Cells. Cell Stem Cell 10, 440–454.

Warrington, N.M., Woerner, B.M., Daginakatte, G.C., Dasgupta, B., Perry, A., Gutmann, D.H., and Rubin, J.B. (2007). Spatiotemporal Differences in CXCL12 Expression and Cyclic AMP Underlie the Unique Pattern of Optic Glioma Growth in Neurofibromatosis Type 1. Cancer Research 67, 8588–8595.

Watson, M.A., Perry, A., Tihan, T., Prayson, R.A., Guha, A., Bridge, J., Ferner, R., and Gutmann, D.H. (2006). Gene Expression Profiling Reveals Unique Molecular Subtypes of Neurofibromatosis Type I-associated and Sporadic Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors. Brain Pathology *14*, 297–303.

Webster, H. deF., Martin, J.R., and O'Connell, M.F. (1973). The relationships between interphase Schwann cells and axons before myelination: A quantitative electron microscopic study. Developmental Biology *32*, 401–416.

Weiss, B., Bollag, G., and Shannon, K. (1999). Hyperactive Ras as a therapeutic target in neurofibromatosis type 1. American Journal of Medical Genetics 89, 14–22.

Weston, J.A. (1991). 6 Sequential Segregation and Fate of Developmentally Restricted Intermediate Cell Populations in the Neural Crest Lineage. In Current Topics in Developmental Biology, (Elsevier), pp. 133–153.

White, K.A., Swier, V.J., Cain, J.T., Kohlmeyer, J.L., Meyerholz, D.K., Tanas, M.R., Uthoff, J., Hammond, E., Li, H., Rohret, F.A., et al. (2018). A porcine model of neurofibromatosis type 1 that mimics the human disease. JCI Insight 3.

Wilmut, I., and Taylor, J. (2018). Cloning After Dolly. Cellular Reprogramming 20, 1–3.

Wimmer, K., Roca, X., Beiglböck, H., Callens, T., Etzler, J., Rao, A.R., Krainer, A.R., Fonatsch, C., and Messiaen, L. (2007). Extensive in silico analysis of NF1 splicing defects uncovers determinants for splicing outcome upon 5′ splice-site disruption. Human Mutation 28, 599–612.

Windebank, A., Wood, P., Bunge, R., and Dyck, P. (1985). Myelination determines the caliber of dorsal root ganglion neurons in culture. The Journal of Neuroscience 5, 1563– 1569.

Woodhoo, A., and Sommer, L. (2008). Development of the Schwann cell lineage: From the neural crest to the myelinated nerve. Glia 56, 1481–1490.

Woodhoo, A., Dean, C.H., Droggiti, A., Mirsky, R., and Jessen, K.R. (2004). The trunk neural crest and its early glial derivatives: a study of survival responses, developmental schedules and autocrine mechanisms. Molecular and Cellular Neuroscience 25, 30–41.

Woodhoo, A., Alonso, M.B.D., Droggiti, A., Turmaine, M., D'Antonio, M., Parkinson, D.B., Wilton, D.K., Al-Shawi, R., Simons, P., Shen, J., et al. (2009). Notch controls embryonic Schwann cell differentiation, postnatal myelination and adult plasticity. Nature Neuroscience 12, 839–847.

Wu, J., Williams, J.P., Rizvi, T.A., Kordich, J.J., Witte, D., Meijer, D., Stemmer-Rachamimov, A.O., Cancelas, J.A., and Ratner, N. (2008). Plexiform and Dermal Neurofibromas and Pigmentation Are Caused by Nf1 Loss in Desert Hedgehog-Expressing Cells. Cancer Cell *13*, 105–116.

Wu, J.Y. (2015). Pluripotent Stem Cells and Skeletal Regeneration—Promise and Potential. Current Osteoporosis Reports 13, 342–350.

Wu, X. (2006). Neurofibromin plays a critical role in modulating osteoblast differentiation of mesenchymal stem/progenitor cells. Human Molecular Genetics 15, 2837–2845.

Wu, S.M., and Hochedlinger, K. (2011). Harnessing the potential of induced pluripotent stem cells for regenerative medicine. Nature Cell Biology 13, 497–505.

Wu, J., Williams, J.P., Rizvi, T.A., Kordich, J.J., Witte, D., Meijer, D., Stemmer-Rachamimov, A.O., Cancelas, J.A., and Ratner, N. (2008). Plexiform and Dermal Neurofibromas and Pigmentation Are Caused by Nf1 Loss in Desert Hedgehog-Expressing Cells. Cancer Cell 13, 105–116.

Xin, X., Jiang, X., Wang, L., Stover, M.L., Zhan, S., Huang, J., Goldberg, A.J., Liu, Y., Kuhn, L., Reichenberger, E.J., et al. (2014). A Site-Specific Integrated Col2.3GFP Reporter Identifies Osteoblasts Within Mineralized Tissue Formed In Vivo by Human Embryonic Stem Cells: Col2.3GFP Reporter Identifies hESC Osteoblasts. Stem Cells Translational Medicine 3, 1125–1137.

Xu, Y., Liu, L., Li, Y., Zhou, C., Xiong, F., Liu, Z., Gu, R., Hou, X., and Zhang, C. (2008). Myelin-forming ability of Schwann cell-like cells induced from rat adipose-derived stem cells in vitro. Brain Research 1239, 49–55.

Yan, J., Chen, S., Zhang, Y., Li, X., Li, Y., Wu, X., Yuan, J., Robling, A.G., Karpur, R., Chan, R.J., et al. (2007). Rac1 mediates the osteoclast gains-in-function induced by haploinsufficiency of Nf1. Human Molecular Genetics 17, 936–948.

Yang, F.-C., Chen, S., Robling, A.G., Yu, X., Nebesio, T.D., Yan, J., Morgan, T., Li, X., Yuan, J., Hock, J., et al. (2006a). Hyperactivation of p21ras and PI3K cooperate to alter murine and human neurofibromatosis type 1–haploinsufficient osteoclast functions. Journal of Clinical Investigation 116, 2880–2891.

Yang, F.-C., Chen, S., Clegg, T., Li, X., Morgan, T., Estwick, S.A., Yuan, J., Khalaf, W., Burgin, S., Travers, J., et al. (2006b). Nf1+/– mast cells induce neurofibroma like phenotypes through secreted TGF-β signaling. Human Molecular Genetics 15, 2421–2437.

Yang, F.-C., Ingram, D.A., Chen, S., Zhu, Y., Yuan, J., Li, X., Yang, X., Knowles, S., Horn, W., Li, Y., et al. (2008). Nf1-Dependent Tumors Require a Microenvironment Containing Nf1+/–- and c-kit-Dependent Bone Marrow. Cell 135, 437–448.

Yang, L., Tsang, K.Y., Tang, H.C., Chan, D., and Cheah, K.S.E. (2014). Hypertrophic chondrocytes can become osteoblasts and osteocytes in endochondral bone formation. Proceedings of the National Academy of Sciences 111, 12097–12102.

Yilmaz, K., Ozmen, M., Bora Goksan, S., and Eskiyurt, N. (2007). Bone mineral density in children with neurofibromatosis 1. Acta Paediatrica 96, 1220–1222.

Ying, Q.-L., Nichols, J., Evans, E.P., and Smith, A.G. (2002). Changing potency by spontaneous fusion. Nature 416, 545–548.

Yoshiko, Y., Aubin, J.E., and Maeda, N. (2002). Stanniocalcin 1 (STC1) Protein and mRNA Are Developmentally Regulated During Embryonic Mouse Osteogenesis: the Potential of STC1 as an Autocrine/Paracrine Factor for Osteoblast Development and Bone Formation. Journal of Histochemistry & Cytochemistry 50, 483–491.

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.

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., Deshmukh, H., Payton, J.E., Dunham, C., Scheithauer, B.W., Tihan, T., Prayson, R.A., Guha, A., Bridge, J.A., Ferner, R.E., et al. (2011). Array-Based Comparative Genomic Hybridization Identifies CDK4 and FOXM1 Alterations as Independent Predictors of Survival in Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor. Clinical Cancer Research *17*, 1924–1934.

Yu, W.-M., Feltri, M.L., Wrabetz, L., Strickland, S., and Chen, Z.-L. (2006). Schwann Cell-Specific Ablation of Laminin γ1 Causes Apoptosis and Prevents Proliferation. The Journal of Neuroscience 23.

Yu, X., Chen, S., Potter, O., Murthy, S., Li, J., Pulcini, J., Ohashi, N., Winata, T., Everett, E., and Ingram, D. (2005). Neurofibromin and its inactivation of Ras are prerequisites for osteoblast functioning. Bone 36, 793–802.

Zhang, W., and Liu, H.T. (2002). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. Cell Research 12, 9–18.

Zhang, X., Yalcin, S., Lee, D.-F., Yeh, T.-Y.J., Lee, S.-M., Su, J., Mungamuri, S.K., Rimmelé, P., Kennedy, M., Sellers, R., et al. (2011). FOXO1 is an essential regulator of pluripotency in human embryonic stem cells. Nature Cell Biology 13, 1092–1099.

Zhang, Z., Zhang, Y., Gao, F., Han, S., Cheah, K.S., Tse, H.-F., and Lian, Q. (2017). CRISPR/Cas9 Genome-Editing System in Human Stem Cells: Current Status and Future Prospects. Molecular Therapy - Nucleic Acids 9, 230–241.

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, W., and Freed, C.R. (2009). Adenoviral Gene Delivery Can Reprogram Human Fibroblasts to Induced Pluripotent Stem Cells. Stem Cells 27, 2667–2674.

Zhou, Y., and Snead, M.L. (2008). Derivation of cranial neural crest-like cells from human embryonic stem cells. Biochemical and Biophysical Research Communications 376, 542–547.

Zhu, Y. (2001). Ablation of NF1 function in neurons induces abnormal development of cerebral cortex and reactive gliosis in the brain. Genes & Development 15, 859–876.

Zhu, Y. (2002). Neurofibromas in NF1: Schwann Cell Origin and Role of Tumor Environment. Science 296, 920–922.

Ziegler, L., Grigoryan, S., Yang, I.H., Thakor, N.V., and Goldstein, R.S. (2011). Efficient Generation of Schwann Cells from Human Embryonic Stem Cell-Derived Neurospheres. Stem Cell Reviews and Reports 7, 394–403.

Zwaka, T.P., and Thomson, J.A. (2003). Homologous recombination in human embryonic stem cells. Nature Biotechnology 21, 319–321.

université PARIS-SACLAY | ÉCOLE DOCTORALE Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué

Titre : Modélisation pathologique pour la neurofibromatose de Type 1. Développement d'un test d'étude et applications pour la découverte de molécules actives

Mots clés : neurofibromatose de type 1 | cellules souches induites à la pluripotence | ostéoblastes | CRISPR/Cas9 | cellules de Schwann | modélisation pathologique.

Résumé : La neurofibromatose de type 1 (NF1) représente la maladie génétique autosomale dominante la plus fréquente en France, après la mucovisidose, avec une incidence de 1 individu sur 3500. Il s'agit d'une pathologie multi-systémique présentant un tableau clinique varié. Parmi la pléthore de symptôme, sont comptées des manifestations neurocutanées telles que les taches « café-au-lait » (zone d'hyperpigmentation localisée) et les neurofibromes (tumeurs bénignes de la gaine périphérique de la myéline) mais également des défauts osseux et des troubles cognitifs. La pénétrance de NF1 est complète mais la manifestation et la sévérité des symptômes peuvent varier d'un individu à l'autre. Le gène *NF1* responsable de la maladie, localisé sur le chromosome 17, est un gène suppresseur de tumeur qui code pour la neurofibromine. Dans le but de développer un modèle cellulaire humain pertinent pour l'étude des défauts osseux associés à NF1, nous avons utilisé des cellules souches induites à la pluripotence porteuses de la mutation causale *NF1* (hiPS-NF1). Dans ces travaux, nous avons montré qu'une perte d'expression de la neurofibromine dans les ostéoblastes dérivés de hiPS-NF1 reproduisait le phénotype d'ostéogénèse réduite et qu'il était possible d'améliorer la capacité des hiPS-NF1 à se différencier en ostéoblastes à l'aide de molécules pharmacologiques. Toujours dans le but de proposer un modèle cellulaire humain le plus pertinent possible, nous avons développé des lignées isogéniques avec la technologie CRISPR/Cas 9 afin d'étudier l'impact d'une perte partielle ou totale de l'expression de la neurofibromine sur le phénotype osseux.

En parallèle, afin de pouvoir étudier un autre phénotype associé à NF1, un protocole de différenciation de cellules de Schwann sous culture définie en utilisant des facteurs de croissance et des molécules de signalisation, a partir des hiPS a été développé. Des cellules de Schwann-like ont été obtenues en 30 jours après engagement des cellules souches vers la crête neurale afin d'induire l'émergence de précurseurs de cellules de Schwann par l'action de molécules telles que le récepteur de type I du TGF-ß (SB431542), l'hereguline ß1, l'IGF1, le FGF2 et un activateur de WNT3a (CHIR99021). L'analyse par q-PCR montre une augmentation des marqueurs de différents stades de différenciation de la cellule de Schwann : crête neurale (*SOX10, ERBB3),* cellules de Schwann précurseurs (*MPZ, CAD19*) et cellules de Schwann immatures (*S100*) au bout de 30 jours de différenciation. Ces résultats ont été complétés par l'analyse protéique des cellules différenciées et par la mise en co-culture de ces cellules avec des motoneurones différenciés à partir d'hiPS. L'ensemble de ce travail a permis de valider la pertinence de l'utilisation des cellules souches pluripotentes porteuses de mutations dans la modélisation de pathologie génétique. Permettant à plus long terme la recherche de molécules actives par des approches de criblage pharmacologique ou par des approches de thérapie cellulaire.

Université Paris-Saclay
Espace Technologique / Immeuble Discovery
Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France

Title : Neurofibromatosis disease modelling. Development of a test study and applications for the discovery of active molecules

Keywords : neurofibromatosis type 1 | induced pluripotent stem cell | osteoblasts | CRISPR / Cas9 | Schwann cells | disease modeling.

Résumé : Neurofibromatosis type 1 (NF1) is an autosomal genetic disease with an incidence of 1 in 3,500 individuals. This is a multi-systemic disorder with a plethora of symptoms. Among NF1 related symptoms we find neurocutaneous manifestations such as "café-au-lait" spots (zone of localized hyperpigmentation) and neurofibromas (benign tumors of the peripheral sheath of myelin), but also bone defects and cognitive disorders. The penetrance of NF1 is complete but the manifestation and severity of symptoms may vary from one individual to another. The NF1 gene responsible for the disease, located on chromosome 17, is a tumor suppressor gene that encodes neurofibromin. In order to develop a relevant human cellular model for the study of bone defects associated with NF1, we used pluripotency-induced stem cells that carry the NF1 causal mutation (hiPS-NF1). In this work, we have shown that loss of neurofibromin expression in osteoblasts derived from hiPS-NF1 reproduces the reduced osteogenesis phenotype. We have also shown that pharmacological molecules can improve the ability of hiPS-NF1 to differentiate into osteoblasts.

In order to propose the most relevant human cell model, we have developed isogenic lines with CRISPR/Cas9 technology to study the impact of a partial or total loss of neurofibromin on the bone phenotype. Simultaneously, a Schwann cells differentiation protocol from hiPS was developed with culture defined medium using growth factors and signaling molecules. Schwann-like cells were obtained in 30 days by the use of molecules such as the type I receptor TGF-ß (SB431542), heregulin ß1, IGF1, FGF2 and activator of WNT3a (CHIR99021). The q-PCR analysis shows an increase in Schwann cell markers: neural crest (SOX10, ERBB3), precursor Schwann cells (MPZ, CAD19) and immature Schwann cells (S100). These results were confirmed by protein analysis of the differentiated cells and by the co-culture analysis of these cells with differentiated motoneurons from hiPS. All of this work validated the relevance of pluripotent stem cells in the modeling of genetic pathology.

Université Paris-Saclay
Espace Technologique / Immeuble Discovery
Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France