

# Automatisation de la différenciation des cellules souches pluripotentes humaines en cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien et modélisation des symptômes rétiniens associés à la mutation d'APC

NNT : 2018SACLAY048

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

École doctorale n°569 Innovation thérapeutique :  
du fondamental à l'appliqué  
Spécialité de doctorat: Biologie moléculaire et cellulaire

Thèse de doctorat

Thèse présentée et soutenue à Evry, le 13 décembre 2018, par

**Florian REGENT**

Composition du Jury :

Pr. Sylvain Fisson UEVE/INSERM U951 – Evry	Président
Dr. Vasiliki kalatzis INSERM U1051 – Montpellier	Rapporteur
Pr. John De Vos INSERM U1183 – Montpellier	Rapporteur
Dr. Odile Bronchain CNRS U9197 – Orsay	Examinateur
Dr. Emeline Nandrot CNRS U7210 – Paris	Examinateur
Pr. Christelle Monville UEVE/INSERM U861 – Evry	Directeur de thèse

# Table des matières

REMERCIEMENTS.....	4
INDEX DES ILLUSTRATIONS.....	6
INDEX DES TABLEAUX .....	7
ABREVIATIONS.....	8
RESUME.....	10
ABSTRACT.....	11
INTRODUCTION .....	12
I.    Organisation et fonction de la rétine .....	12
1.    Anatomie générale et fonctions principales des différentes structures de l'œil.....	12
2.    La rétine neurale et l'épithélium pigmentaire rétinien : deux tissus interdépendants.....	13
a.    L'épithélium pigmentaire rétinien.....	14
b.    La rétine neurale.....	22
II.    Embryologie de l'œil : De la spécification précoce du champ oculaire à la rétinogenèse. ....	28
1.    Spécification du champ oculaire et expression des « Eye Field Transcription Factors ».....	28
2.    Scission des champs oculaires.....	31
3.    Induction et régionalisation de la vésicule optique .....	32
4.    Progéniteurs rétiniens et spécification des différentes cellules de la rétine.....	36
III.    Les cellules souches pluripotentes humaines .....	42
1.    Les cellules souches embryonnaires humaines.....	42
a.    Obtention et dérivation .....	42
b.    Limites des hESCs.....	44
2.    Les cellules souches induites à la pluripotence.....	46
a.    Découverte .....	46
b.    Méthodes de reprogrammation.....	47
c.    Comparaison hESCs/hiPSCs.....	48
3.    Culture <i>in vitro</i> des cellules souches pluripotentes humaines.....	50
a.    De l'établissement des premières lignées à l'automatisation de la culture .....	50
b.    Contrôles qualités.....	51
4.    Utilisation des cellules souches pluripotentes pour le traitement et la modélisation de la DMLA et des rétinites pigmentaires.....	52
a.    Différenciation des CSPhs en cellules rétiniennes.....	53
b.    La thérapie cellulaire .....	59
c.    La modélisation pathologique.....	62
d.    CSPhs et édition du génome .....	72

IV. La Polypose Adénomateuse Familiale : une maladie multi-systémique avec des atteintes rétiniennes.....	76
1. Historique et description générale.....	76
2. Épidémiologie et diagnostique.....	77
3. Symptômes non rétiniens.....	79
a. Symptômes colorectaux.....	79
b. Autres symptômes gastro-intestinaux.....	79
c. Symptômes extra-intestinaux .....	80
4. Lésions pigmentées du fond de l'œil associées à la PAF .....	82
5. APC, une protéine multifonction.....	84
a. Organisation du gène APC et expression d'isoformes tissus-spécifiques.....	84
b. APC, une protéine d'échafaudage multi-domaine aux multiples partenaires .....	85
c. Les principales fonctions d'APC.....	86
6. Modélisation des défauts associés à la mutation d'APC .....	96
a. Les modèles murins .....	96
b. Les modèles cellulaires .....	100
OBJECTIFS.....	102
RESULTATS.....	104
I. Mise au point d'un protocole automatisé pour la différenciation des cellules de l'EPR .....	104
1. Résultats .....	104
2. Discussion et perspectives .....	131
II. Caractérisation du phénotype des cellules de l'EPR mutantes APC.....	133
1. Matériels et méthodes .....	133
d. Édition génétique avec la technologie CRISPR/Cas9 et sélection des clones mutants....	133
e. Caractérisation du phénotype mutant APC .....	135
2. Résultats .....	136
a. Génération d'une lignée d'hESCs mutante APC avec la technologie CRISPR/Cas9 .....	136
b. Pigmentation et prolifération anormales des cellules de l'EPR mutantes APC (résultats préliminaires).....	139
3. Discussion et perspectives .....	145
a. Hyperpigmentation des cellules de l'EPR mutantes APC.....	146
b. Défaut de prolifération des cellules de l'EPR mutantes APC .....	148
DISCUSSION GENERALE.....	150
I. Utilisation des CSPhs pour modéliser et traiter les rétinopathies .....	150
1. Différenciations rétiniennes des CSPhs : le plus dur reste à faire .....	150
2. Utilisation des CSPhs pour la thérapie cellulaire : leçons à tirer de la greffe des cellules de l'EPR.....	152

3. Problématiques liées à l'utilisation des CSPhs pour la modélisation pathologique.....	154
II. Intérêt des CSPhs pour la modélisation des symptômes non rétiniens associés à la PAF ....	158
CONCLUSION .....	161
ANNEXES .....	163
Annexe 1 : Human ESC-derived retinal epithelial cell sheets potentiate rescue of photoreceptor cell loss in rats with retinal degeneration .....	163
Annexe 2 : Liste des amorces utilisées.....	175
Annexe 3 : Liste des anticorps utilisés.....	176
BIBLIOGRAPHIE.....	177

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury et tout particulièrement le docteur Vasiliki Kalatzis et le professeur John De Vos qui en tant que rapporteurs ont dû prendre de leur temps pour relire et évaluer ce manuscrit dans sa globalité. Merci également au docteur Odile Brochain, au docteur Emeline Nandrot et au professeur Sylvain Fisson d'avoir accepté d'examiner ces travaux.

Merci au docteur Marc Peschanski de m'avoir permis d'effectuer cette thèse au sein d'I-STEM, dans des conditions de travail que peu de laboratoires peuvent fournir. Merci également au docteur Cécile Martinat de m'avoir accueilli dans son unité INSERM.

Je tiens à adresser un très grand remerciement au Professeur Christelle Monville qui en tant que directeur de thèse m'a accueilli au sein de son équipe et m'a encadré tout au long de ses quatre ans. Je sais que ça n'a pas toujours été évident, j'ai tendance à facilement m'éparpiller et tu as régulièrement dû recadrer cela. Tu as également fait preuve de beaucoup de patience lorsque j'ai pu faire preuve de maladresse donc pour tout ça merci encore.

Merci à toutes les personnes qui ont fait partie de l'équipe Rétinopathie aux cours de mon passage à I-Stem. Merci à Caroline qui m'a encadré lors de mon arrivée, j'espère que tu t'épanouis pleinement dans ta nouvelle vie. Merci à Alexandra pour l'aide que tu m'as apporté en culture. Merci à Walter pour ta disponibilité et ta gentillesse à toute épreuve. Et enfin je souhaite remercier tout particulièrement Karim pour ses innombrables conseils et toutes les discussions que l'on a pu avoir autour de mon projet. Si j'étais venu te voir plus souvent dès le départ je crois que ma thèse se serait révélée beaucoup moins compliquée ! J'essayerai à l'avenir de prendre exemple sur ta rigueur et ton calme olympien !

Merci également à Lise et Léa qui ont fourni un travail considérable sur l'automatisation de la différenciation des cellules de l'EPR. Je sais que mon manque d'organisation ne vous a pas facilité la tâche donc merci beaucoup !

Enfin, puisqu'une thèse est avant tout une course d'endurance où il ne faut pas lâcher prise, je me dois de remercier toutes les personnes d'I-STEM qui m'ont soutenu moralement et qui, sans forcément s'en rendre compte, m'ont aidé à tenir le coup dans les moments de doute que rencontre tout thésard.

Tout d'abord, un grand merci à Hélène. Merci de m'avoir fait découvrir l'escalade qui aura été ma principale échappatoire au cours de ma thèse. Merci pour tous ces bons moments passés au laboratoire puis au pied des falaises sans lesquels j'aurai déprimé bien plus que ce ne fut le cas

pendant ces quatre années. Bien sûr, il m'est impossible de parler d'escalade sans mentionner Gurvan alias « la machine » (et plein d'autres surnoms que je tairai ici^^). Merci pour toutes ces soirées escalade, jeux vidéo, échec ou tout simplement bière ! C'était parfois un peu dur le lendemain au labo mais sans ça je ne suis pas certain que j'aurais tenu jusqu'au bout !

Merci à Margot et Sylvain, ceux avec qui tout a commencé en stage de master. Sylvain, j'aurai aimé qu'on aille jusqu'au bout de la thèse ensemble mais je suis vraiment content que tu aies réussi à trouver un très bon poste aussi rapidement ! Quant à toi margot, pour être honnête je n'aurai jamais imaginé il y a quatre ans que tu en serais là aujourd'hui. Ton évolution au cours de ces années a vraiment été spectaculaire !

Merci également à tous les autres membres du U des thésards ! « Ui-ui » je parle de toi Valentin ! Merci à Vincent, même si discuter dix minutes avec toi s'est parfois révélé aussi stressant que la rédaction de ce manuscrit dans sa globalité^^, je me serais souvent senti seul le week-end au laboratoire sans toi. Merci à Déborah, te savoir en train de rédiger et souffrir en même temps que moi aura été d'un grand réconfort aux cours de ces dernières semaines ! J'espère qu'on pourra fêter ça ensemble comme il se doit une fois que tout sera terminé ! Merci également à Marie (même si tu n'étais pas dans ce fameux U), ta bonne humeur et tes fameux « titiiii !» m'ont remonté le moral plus d'une fois !

Je tiens également à remercier tous les membres du laboratoire que je n'ai pas cité précédemment mais qui m'ont soutenu à un moment ou à un autre au cours de ma thèse.

Au-delà des gens que j'ai rencontré lors de ces dernières années, d'autres amis de longue date m'ont aidé à tenir le coup moralement. Merci notamment à Jenny, Mégane, Mélisse et Tony. Je sais que je ne donne pas de nouvelles aussi souvent que je le devrais mais je suis très heureux que l'on ne se soit pas perdu de vue depuis le Lycée et se retrouver est toujours un plaisir !

Et le plus important pour la fin : la famille. Merci à ma sœur Emilie, venir te voir ainsi que toute ta petite famille (Nabil, Aliyah et Naël) a toujours été une bouffée d'oxygène pour moi et m'a permis d'oublier les soucis du quotidien. Même si je ne t'appelle pas aussi souvent que tu le souhaiterais j'espère que tu sais que tu peux compter sur moi à tout moment. Et pour finir, merci à mes parents sans qui rien n'aurait été possible. Vous m'avez poussé et soutenu tout au long de mes études, de mes premières leçons d'orthographe (qui ne sont malheureusement toujours pas assimilées...) jusqu'à l'écriture de ce manuscrit. Je sais que vous avez consenti beaucoup d'effort pour que je puisse en arriver là et je ne pourrais jamais assez-vous en remercier !

## INDEX DES ILLUSTRATIONS

Figure 1. Anatomie de l'œil humain .....	13
Figure 2. Fonctions de l'Epithélium pigmentaire rétinien.....	14
Figure 3. Le cycle visuel.....	18
Figure 4. La phagocytose des segments externes des photorécepteurs .....	19
Figure 5. Organisation cellulaire de la rétine .....	23
Figure 6. Les photorécepteurs cônes et bâtonnets .....	24
Figure 7. La phototransduction .....	25
Figure 8. Régulation de la mise en place du champ oculaire .....	31
Figure 9. Régionalisation de la vésicule optique .....	33
Figure 10. Régulation de la régionalisation de la vésicule optique par les tissus adjacents .....	34
Figure 11. De la vésicule à la cupule optique .....	35
Figure 12. Génération séquentielle des cellules rétiniennes .....	36
Figure 13. Le modèle de compétence .....	37
Figure 14. Exemple de facteur de transcription impliqués dans la différenciation des cellules rétiniennes. ....	38
Figure 15. Modèle de rétinogenèse stochastique .....	40
Figure 16. Déclin de la capacité de différenciation des cellules souches au cours du développement. ....	43
Figure 17. Exemple de contrôle qualité des CSPhs. ....	51
Figure 18. Edition du génome par le système CRISPR/Cas9.....	74
Figure 19. Colectomie d'un patient atteint de PAF présentant de nombreux adénomes tubuleux. ....	79
Figure 20. Corrélation génotypes-phénotypes des symptômes extra-intestinaux dans les cas de polyposes adénomateuses familiales .....	81
Figure 21. Différents types de LPFOs. ....	83
Figure 22. Organisation des multiples domaines d'APC .....	86
Figure 23. La voie Wnt/β-caténine .....	87
Figure 24. Répression de l'activité transcriptionnelle de la β-caténine par APC et CtBP .....	89
Figure 25. Récapitulatif des principaux modèles de souris mutantes APC .....	98
Figure 26. Stratégie utilisée pour la génération d'une lignée d'hESCs mutante APC. ....	133
Figure 27. Proportion de cellules RC-09 mutées 48h après transfection avec le plasmide permettant l'expression de la Cas9. ....	137
Figure 28. Sélection des clones mutés et identification de leurs mutations par séquençage. ....	137
Figure 29. Contrôle de la pureté et de l'intégrité génomique du clone A8. ....	138
Figure 30. Pluripotence du clone A8. ....	139
Figure 31. Caractérisation des lignées hESCs utilisées et des cellules de l'EPR différenciées à partir de ces lignées. ....	140
Figure 32. Hyperpigmentation des cellules de l'EPR mutantes APC.....	141
Figure 33. Confirmation du phénotype d'hyperpigmentation chez les cellules RC-09 APC+/-.....	142
Figure 34. Effet de l'activation de la voie Wnt/β-caténine sur la pigmentation des cellules de l'EPR. ....	143
Figure 35. Ralentissement de la prolifération des cellules de l'EPR mutantes APC. ....	144
Figure 36. Représentation schématique d'une puce microfluidique visant à reconstituer la barrière hémato-rétinienne.....	157

## INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1. Récapitulatif des sécrétions de l'EPR en conditions saines et pathologiques.....	21
Tableau 2. Liste des lignées d'hESCs mutantes dérivées à la suite d'un DPI.....	45
Tableau 3. Récapitulatif des principaux protocoles de différenciation des CSPhs en cellules de l'EPR publiés.....	55
Tableau 4. Récapitulatif des lignées hESCs utilisées.....	139

## ABREVIATIONS

A.R	Acide rétinoïque	CtBP	C-terminal binding protein
AA	Acide aminé	CXCR4	C-X-C Motif Chemokine Receptor 4
ABCA4	ATP binding cassette subfamily A 4	DAPT	N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester
ADN	Acide désoxyribonucléique	DKK1	Dickkopf WNT Signaling Pathway Inhibitor 1
APC	Adenomatous Polyposis Coli	DLG1	Discs Large MAGUK Scaffold Protein 1
ARN	Acide ribonucléique	DMLA	Dégénérescence maculaire liée à l'âge
ASEF	APC-Stimulated Guanine Nucleotide Exchange Factor 1	DPI	Dépistage préimplantatoire
ATOH7	Atonal BHLH Transcription Factor 7	DSS	Dextrane de Sulfate Sodique
ATP	Adénosine triphosphate	DVL	Dishevelled Segment Polarity Protein
bHLH	basic helix-loop-helix	EB1	End-Binding Protein 1
BMP	Bone morphogenetic protein	EFTFs	Eye field transcription factors
BUB1	Budding Uninhibited by Benzimidazoles 1	EGF	Epidermal growth factor
BUBR1	Budding Uninhibited by Benzimidazoles-related 1	EPR	Epithelium pigmentaire rétinien
CAs	Cellules amacrines	FAK	Focal adhesion kinase
CAS	CRISPR associated protein	FGF	Fibroblast growth factor
CBs	Cellules bipolaires	GABA	Acide $\gamma$ -aminobutyrique
CDC42	Cell Division Cycle 42	GAS6	Growth-Arrest-Specific protein 6
CFH	Complement factor H	GDP	Guanosine diphosphate
CGs	Cellules ganglionnaires	GEF	Guanine nucleotide exchange factors
CHs	Cellules horizontales	GMP	Guanosine monophosphate
CKI- $\alpha$	Casein Kinase 1 Alpha 1	GSK3- $\beta$	Glycogen synthase kinase 3 beta
Cl-	Chlore	GTP	Guanosine triphosphate
CLIP-170	Cytoplasmic Linker Protein 170	hESCs	Cellules souches embryonnaires humaines
CMs	Cellules de Müllers	hiPSCs	Cellules souches pluripotentes induites humaines
CNE	Couche nucléaire externe	HLA	Human leukocyte antigen
CNI	Couche nucléaire interne	HRM	High resolution melt
CNTF	Ciliary NeuroTrophic Factor	HSV-TK	Herpes simplex virus thymidine kinase
CNVs	Copy number variation	IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1
COX-2	Cyclooxygenase 2	InsP3	Inositol 1,4,5-triphosphate
CPE	Couche plexiforme externe	IQGAP1	IQ Motif Containing GTPase
CPI	Couche plexiforme interne	IRBP	Activating Protein 1
CPRs	Cellules progénitrices de la rétine	K+	Interstitial retinal binding protein
CRALBP	Cellular Retinaldehyde-Binding Protein-1	KIF3B	Potassium
CRBP	Cellular retinol binding protein	KSR	Kinesin Family Member 3B
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats	LEF	Knock-out serum replacement
crRNA	CRISPR RNA	LHX2	Lymphoid Enhancer Binding Factor
CRX	Cone-Rod Homeobox		LIM Homeobox
CSMs	Cellules souches mésenchymateuses		
CSPhs	Cellules souches pluripotentes humaines		

LPFOs	Lésions pigmentées du fond de l'œil	PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha
LRAT	Lecithin Retinol Acyltransferase	PIRC	Polyposis in the rat colon
LRP6	Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 6	PMEL17	Premelanosome Protein
MCI	Masse cellulaire interne	PP2	Protein phosphatase 2
MCT1/3	Monocarboxylate Transporter 1/3	PTF1	Pancreas Transcription Factor 1
mDIA1	Diaphanous Related Formin 1	qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
MITF	Microphthalmia-Associated Transcription Factor	RAX	Retina and Anterior Neural Fold Homeobox
MLH1	MutY DNA Glycosylase	RDH5	Retinol dehydrogenase 5
MMP	Matrix metalloproteinase	RDHL	Retinol dehydrogenase Homolog
Mom	Modifiers of min	RPE65	Retinal Pigment Epithelium-Specific 65 KDa Protein
MUTYH	MutY DNA Glycosylase	SEPs	Segments externes des photorécepteurs
Na+	Sodium	sgRNA	Single guide RNA
NAD	Nicotinamide adénine dinucléotide	SHH	Sonic Hedgehog
NES	Nuclear export signal	siRNA	small interfering RNA
NHEJ	Non-homologous end joining	SNPs	Single nucleotide polymorphism
Nks	Native Killers	SOX2	Sex Determining Region Y-Box 2
NLCAM	Neurolin-like cell adhesion molecule	SSEA3/4	Stage-specific embryonic antigen 3/4
NLS	Nuclear localization signal	SVF	Sérum de veau fœtal
NR2E1	Nuclear Receptor Subfamily 2 Group E Member 1	TBX3	T-Box3
OA1	Ocular albinism 1	TCF3	Transcription factor 3
OCT3/4	Octamer-binding transcription factor 3/4	TGF-β	Transforming Growth Factor β
OTX2	Orthodenticle Homeobox 2	TIMP1/3	Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 1/3
PAF	Polypose adénomateuse Familiale	TracrRNA	trans-activating crRNA
PAM	Polypose adénomateuse associée à MUTYH	TYRP1	Tyrosinase Related Protein 1
PARPs	Poly (ADP-ribose) polymérase	U.V	Ultraviolet
PAX 2/6	Paired Box 2/6	VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
PBs	Photorécepteurs bâtonnet	WT	Wild type
PCs	Photorécepteurs cônes	ZO1	Zona Occludens 1
PDE	Phosphodiesterase	β-TRCP	Beta-Transducin Repeat Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor		
PD-L1	Programmed death-ligand 1		
PEDF	Pigment Epithelium-Derived Factor		
PGE2	Prostaglandine E2		

## RESUME

Les premiers essais cliniques visant à greffer des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) dérivées de cellules souches pluripotentes humaines (CSPhs) chez des patients atteints de dégénérescence maculaire liée à l'âge ou de rétinites pigmentaires se sont révélés à la fois satisfaisants du point de vue de la tolérance et prometteurs du point de vue de l'efficacité. Toutefois, ils ont également pointé du doigt la nécessité d'un protocole de différenciation plus efficace, plus robuste et moins onéreux que ceux employés actuellement avant de pouvoir utiliser ce traitement en routine. Au cours de cette étude, nous avons mis au point un nouveau protocole de différenciation récapitulant les principales étapes de la rétinogenèse via l'utilisation séquentielle de seulement 3 composés (Nicotinamide, Activine A et CHIR99021). Ce protocole a permis d'automatiser la différenciation des cellules de l'EPR et permet donc d'envisager la production de ces cellules à grande échelle pour la mise au point d'un traitement accessible au plus grand nombre.

Dans un second temps, nous avons utilisé ce nouveau protocole de différenciation pour modéliser les atteintes rétiniennes associées à la Polyposé Adénomateuse Familiale (PAF). La PAF est une maladie héréditaire à transmission autosomique dominante causée par la mutation du gène suppresseur de tumeurs Adenomatous Polyposis Coli (APC). Cette pathologie se caractérise principalement par l'apparition de quelques centaines à plusieurs milliers d'adénomes dans le colon, mais certains patients présentent également des symptômes extra-intestinaux dont le plus courant est la formation de lésions pigmentées du fond de l'œil. Bien que presque toujours bénignes, la présence de ces lésions suggère un rôle d'APC dans le développement et l'homéostasie de l'EPR. La différenciation de CSPhs porteuses d'une mutation sur APC en cellules de l'EPR nous a ainsi permis de mettre en évidence un rôle nouveau pour cette protéine dans la régulation de mélanogénèse et de la prolifération de ces cellules.

## ABSTRACT

First attempts to transplant retinal pigment epithelial (RPE) cells derived from human pluripotent stem cells (hPSCs) in patients affected by age related macular degeneration or retinitis pigmentosa have shown both satisfactory safety results and promising efficacy results. However, they also highlighted the need for more robust and efficient differentiation protocols to treat large numbers of patients. In our study, we used only three compounds in a sequential manner (Nicotinamide, Activin A and CHIR99021) to develop a novel differentiation protocol that summarizes the main steps of retinogenesis. This protocol enabled us to automate RPE cells differentiation and, thus, should enable the large-scale production of these cells for the development of a treatment accessible to all.

Secondly, we used this new differentiation protocol to model retinal manifestations of Familial Adenomatous Polyposis Coli (FAP). FAP is an autosomal dominant inherited disease due to the mutation of the tumor suppressor gene Adenomatous Polyposis Coli (APC). This disease is mainly characterized by the development of hundreds to thousands of adenomas in the rectum and colon but also by various extra -intestinal manifestations. Among these manifestations, pigmented ocular fundus lesions are the most common. Although these lesions are almost always benign, they suggest a role for APC in the development and the homeostasis of the RPE. In this study, we differentiated hPSCs harboring APC mutations into RPE cells and described a new role for this protein in the regulation of the melanogenesis and the proliferation of these cells.

# INTRODUCTION

## I. Organisation et fonction de la rétine

L'œil est un organe complexe constitué de multiples structures, qui ensemble, permettent la phototransduction du signal lumineux en un signal électrique interprétable par le cortex visuel ou autrement dit « la vue ». Au cours de cette étude nous nous intéresserons exclusivement à l'une de ces structures et à son développement, la rétine. Cependant, puisque les différents tissus composant l'œil des vertébrés interagissent au cours du développement embryonnaire, il est important de bien comprendre l'anatomie générale de l'œil pour appréhender plus particulièrement les fonctions et le développement de la rétine.

### 1. Anatomie générale et fonctions principales des différentes structures de l'œil

La partie la plus externe de l'œil est appelée **la sclérotique**, il s'agit d'un tissu conjonctif blanc, dense et peu vascularisé. Elle a un rôle de protection contre les agressions mécaniques externes et permet de contenir la pression interne de l'œil.

Dans la continuité de la sclérotique on retrouve du côté antérieur de l'œil une première lentille transparente permettant l'entrée des rayons lumineux dans le globe oculaire, **la cornée**. Cette dernière en plus de filtrer les rayons U.V va avoir pour rôle de focaliser une première fois la lumière reçue sur le cristallin. Elle est, de plus, riche en fibres nociceptives induisant le clignement de l'œil et la sécrétion lacrymale lors d'un contact avec un objet.

La lumière va ensuite traverser une seconde lentille, **le cristallin**. Il s'agit d'un tissu épithélial transparent et anucléé qui en se bombant suite au relâchement du muscle ciliaire va permettre le phénomène d'accommodation, c'est à dire la mise au point de la vision en fonction de l'éloignement de l'objet regardé.

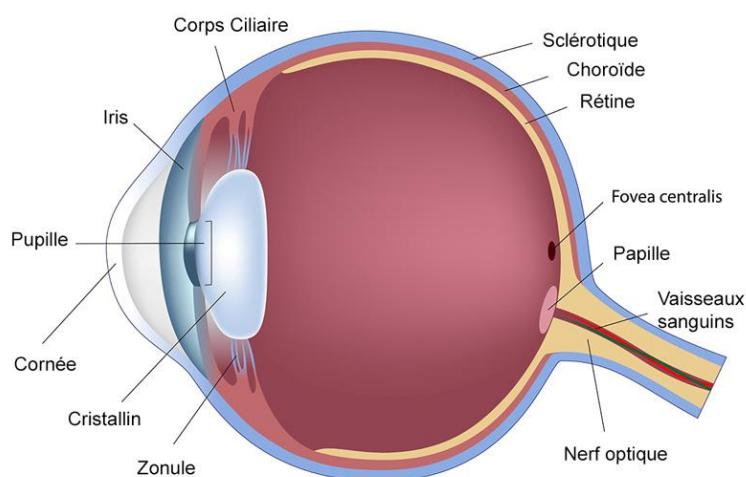
Sur sa face antérieure le cristallin est bordé par **l'iris**, une membrane circulaire et pigmentée responsable de la couleur de l'œil qui est elle-même perforée en son centre par **la pupille**. L'iris va jouer le rôle de diaphragme permettant de réguler la quantité de lumière pénétrant dans l'œil. Ainsi, en présence d'une lumière intense le muscle sphincter de l'iris va se contracter tandis que le muscle dilatateur va se relâcher entraînant une contraction de la pupille. A l'inverse en absence de lumière c'est la contraction du muscle dilatateur et le relâchement du muscle sphincter qui va entraîner la dilatation de cette dernière.

Entre la cornée et le cristallin se trouve la chambre antérieure de l'œil remplie par **l'humeur aqueuse**. Ces deux lentilles étant avasculaires afin d'être transparentes, l'humeur aqueuse va avoir pour rôle de leur apporter les éléments nutritifs nécessaires à leur bon fonctionnement. En plus de son rôle nourricier, l'humeur aqueuse du fait de son renouvellement permanent va permettre l'élimination des déchets et joue également un rôle dans le maintien de la pression intraoculaire.

A l'arrière du cristallin se trouve **l'humeur vitrée** (ou corps vitré) qui occupe 90% du volume de l'œil. L'humeur vitrée est constituée en très grande majorité d'eau (99%) et de collagène qui lui donne une consistance gélatineuse. Son rôle principal est de maintenir la rigidité du globe oculaire et d'absorber les éventuels chocs.

Enfin, à l'arrière du globe oculaire la sclérotique est tapissée sur sa face interne par deux tuniques. La plus externe est la **choroïde**, qui avec l'iris et le corps ciliaire forme la tunique vasculaire de l'œil. Il s'agit d'une membrane richement vascularisée permettant l'apport de nutriments vers la rétine. De plus, sa composition riche en mélanocytes lui confère une coloration brune et permet de limiter les réflexions indésirables de la lumière.

Sur la face interne de la choroïde repose notre tissu d'intérêt, la **rétine**. Elle est constituée d'un Epithélium Pigmentaire (EPR) empêchant la diffusion de la lumière dans l'œil et assurant le transport des nutriments depuis la choroïde vers la rétine neurale, qui est quant à elle en charge de la phototransduction du signal lumineux en message nerveux (**Figure 1**).



**Figure 1. Anatomie de l'œil humain** (Schéma provenant de <http://www.haute-vision.fr/glossaire/>).

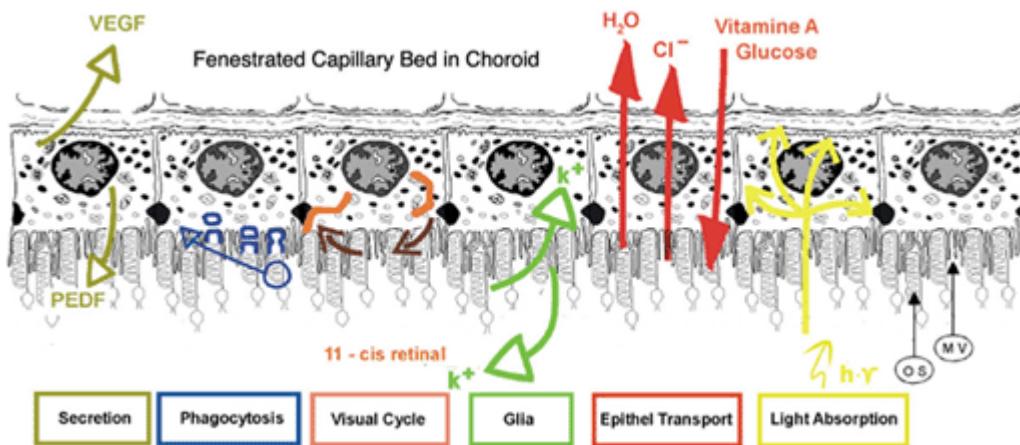
## 2. La rétine neurale et l'épithélium pigmentaire rétinien : deux tissus interdépendants

La rétine est une structure hautement conservée chez les vertébrés qui peut être décomposée en deux parties (i) la rétine neurale comprenant entre autres les photorécepteurs

sensibles à la lumière et (ii) une monocouche de cellules pigmentées (Lamb et al., 2007). L'interaction entre les photorécepteurs de la rétine neurale et les cellules pigmentées est essentielle au fonctionnement de ces premiers et débute dès l'embryogénèse. En effet, comme nous le verrons plus tard, le bon développement de l'une de ces structures dépend de celui de l'autre. De plus, cette dépendance est maintenue à l'âge adulte comme en témoigne certaines pathologies dues à la mutation de gènes exprimés par l'EPR conduisant à la dégénérescence des photorécepteurs et inversement. Ainsi la capacité des photorécepteurs à détecter la lumière dépend de leur interaction avec l'EPR.

#### *a. L'épithélium pigmentaire rétinien*

Chez les vertébrés, l'EPR est un épithélium monocouche, polarisé, constitué de cellules pigmentées et pavimenteuses jointes par des jonctions serrées. La membrane basale de ces cellules repose sur la membrane de Bruch qui permet l'interaction entre l'EPR et les choriocapillaires de la choroïde tandis que les microvillosités de leur membrane apicale font face à l'espace sous-rétinien et aux segments externes des photorécepteurs (SEPs) (Strauss, 2005). Ainsi l'EPR va jouer un rôle de soutien pour les photorécepteurs en remplissant de nombreuses fonctions.



**Figure 2. Fonctions de l'Epithélium pigmentaire rétinien (Strauß, 2016).**

#### *i. Absorption de la lumière et protection contre le stress oxydatif*

La fonction la plus évidente des cellules de l'EPR et dont on a longtemps pensé qu'elle était la seule est leur capacité à absorber la lumière grâce à la mélanine qu'elles synthétisent. L'EPR permet ainsi d'éviter la dispersion des photons non absorbés par les photorécepteurs afin d'améliorer la qualité optique de l'œil.

De ce fait, l'EPR est soumis à un stress oxydatif intense, résultant à la fois du stress photo-oxydatif causé par la quantité d'énergie lumineuse à laquelle il est exposé mais aussi par un surplus

d'oxygène provenant de la choroïde et non extrait par la rétine qui aboutit à la formation de radicaux libres. De plus, la photo-oxydation induisant des dommages importants aux segments externes des photorécepteurs, ces derniers doivent être renouvelés en permanence. Or comme nous le verront un peu plus loin, le processus de renouvellement passe par la phagocytose de ces segments par l'EPR, ce qui génère des radicaux libres supplémentaires. Afin de lutter contre ce stress et se protéger sois même ainsi que les tissus environnants, l'EPR possède 3 lignes de défenses. La première est la synthèse de la mélanine dans les mélanosomes qui, en présence de lumière se déplacent sous la membrane apicale afin de limiter le stress photo-oxydatif dans la rétine. Les deux autres sont la production en grande quantité de nombreux anti-oxydants non enzymatiques (glutathion, ascorbate,  $\alpha$ -tocophérol, caroténoïdes) et enzymatiques (supéroxyde dismutase et catalase) qui vont neutraliser les dérivés réactifs de l'oxygène. Cependant malgré ces mécanismes de protection certains dommages sont inévitables. C'est pourquoi ces cellules seraient également capables de rapidement repérer les lipides, les protéines ainsi que les acides nucléiques endommagés afin de les réparer ou de les remplacer (Boulton and Dayhaw-Barker, 2001; Plafker et al., 2012).

## *ii. Transport épithélial et régulation des échanges hémato-rétiniens*

Les cellules de l'EPR forment un épithélium extrêmement jointif. En effet, ces dernières sont reliées entre elles par des jonctions serrées au niveau de leur pôle apical, jonctions formées notamment par des protéines transmembranaires de la famille des claudines et des occludines (Rizzolo, 2014; Rizzolo et al., 2011). Ainsi l'EPR forme une barrière hémato-rétinienne permettant à la fois la mise en place du privilège immun de l'œil mais aussi un échange sélectif entre le sang et la rétine.

### Transport du sang vers la rétine

Le transport du sang vers la rétine est donc régulé par l'EPR et permet l'apport de nutriments aux photorécepteurs ainsi que l'apport d'autres métabolites propres à leurs fonctions. L'EPR assure notamment un transport conséquent de glucose vers la rétine grâce à l'expression des transporteurs GLUT1 et GLUT3 aussi bien au niveau de sa membrane basolatérale que de sa membrane apicale (Ban and Rizzolo, 2000). Plus récemment, il a été observé *in vitro* que le métabolite le plus massivement consommé par les cellules de l'EPR était la proline loin devant le glucose et la taurine. Ainsi, la proline pourrait être la source d'énergie préférentielle de ces cellules qui seraient en outre capable de transférer certains intermédiaires métaboliques dérivés de cet acide aminé, tel que le citrate, aux photorécepteurs afin de soutenir leurs fonctions (Chao et al., 2017). Toutefois cela reste à confirmer *in vivo*.

L'EPR assure également l'apport du 11-cis-retinal, futur initiateur de la cascade de phototransduction. Pour cela les cellules de l'EPR vont tout d'abord extraire le tout-trans-rétinol (vitamine A) du sang pour l'incorporer dans le cycle visuel (**Figure 2**) au cours duquel il sera successivement isomérisé et oxydé avant d'être transporté vers les photorécepteurs (Bessant et al., 2001).

De plus, la membrane plasmique des photorécepteurs étant très riche en acide docosahexaénoïque (ou acide gras 22:6ω3), le renouvellement constant de leurs segments externes nécessite un apport permanent de ce composé. Pour cela l'EPR va le capter directement dans le sang puis le stocker avant de le délivrer aux photorécepteurs en parallèle de la phagocytose des segments externes endommagés (Bazan et al., 1992) (**Figure 4**).

#### Transport de l'espace sous-rétinien vers le sang

Les transports allant de la rétine vers le sang sont également régulés par l'EPR et vont quant à eux principalement permettre de maintenir l'homéostasie ionique dans l'espace sous-rétinien et d'éliminer les déchets métaboliques et le surplus d'eau de la rétine.

En effet, l'activité métabolique importante de celle-ci conduit à l'accumulation d'eau dans l'espace sous-rétinien aggravée par la pression intraoculaire qui entraîne également un flux d'eau du corps vitré vers cette espace.

Afin de palier à cela l'EPR évacue en permanence l'eau de la rétine vers le flux sanguin de la choroïde à une vitesse estimée entre 1.4 et 11  $\mu\text{l} \times \text{cm}^{-2} \times \text{h}^{-1}$  (Edelman and Miller, 1991; Hughes et al., 1984; Tsuboi, 1987). L'énergie nécessaire à ce transport est produite grâce aux pompes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPases qui grâce à l'énergie générée par l'hydrolyse de l'ATP vont transporter du sodium et du potassium à l'encontre de leurs gradients de concentration. Dans l'EPR, à l'inverse de la majorité des épithéliums, ces pompes se situent à la membrane apicale des cellules (Gundersen et al., 1991) ce qui aboutit à une accumulation des ions  $\text{Na}^+$  dans l'espace sous-rétinien et à une accumulation intracellulaire des ions  $\text{K}^+$ . Dans le cas du  $\text{K}^+$ , l'équilibre est rétabli grâce au « canal potassique rectifiant entrant » Kir7.1 (Hughes and Takahira, 1996). En effet, le maintien d'une concentration constante en  $\text{K}^+$  dans l'espace sous-rétinien est extrêmement important pour permettre l'hyperpolarisation des photorécepteurs en réponse aux stimuli lumineux.

Ainsi l'activité des pompes  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPases aboutit simplement à une faible concentration intracellulaire en  $\text{Na}^+$  par rapport à l'espace sous rétinien. Ce gradient de  $\text{Na}^+$  va permettre au cotransporteur  $\text{Na}-\text{K}-2\text{Cl}$  de faire entrer des ions chlorures dans la cellule qui vont ensuite être évacués de l'autre côté par la membrane basale de l'EPR qui possède une grande conductance pour ces ions (Blaug et al., 2003; Hartzell et al., 2008; Weng et al., 2002). Ce transport transépithélial des

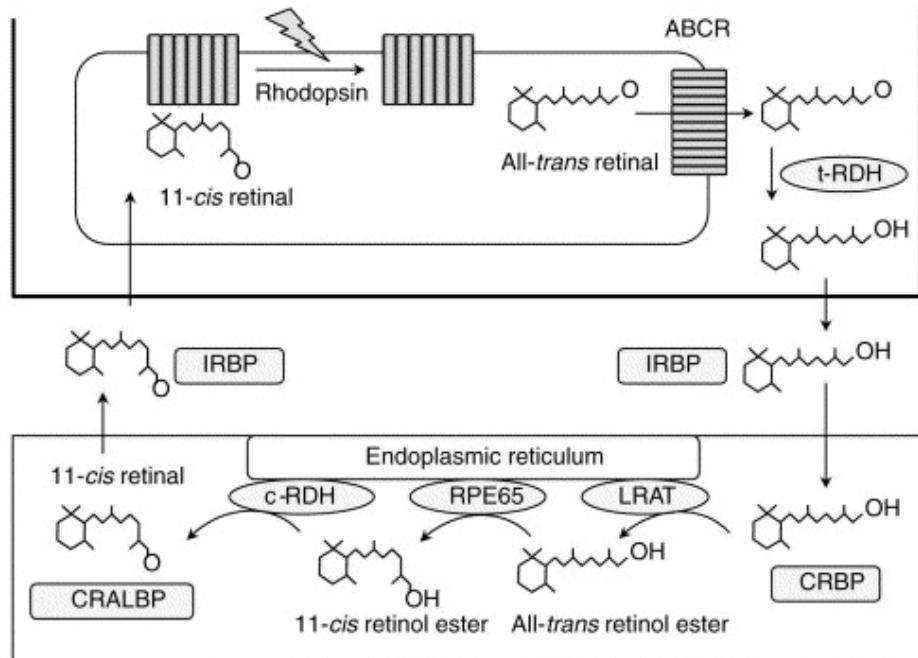
ions chlorures induit une force osmotique conduisant le transport de l'eau à travers des aquaporines telle que l'aquaporine 1 (Stamer et al., 2003).

En plus de l'eau, les cellules de l'EPR vont également évacuer les déchets métaboliques produits par la rétine, en particulier l'acide lactique, vers la circulation sanguine. L'absorption de l'acide lactique est effectuée grâce au transporteur MCT1 (Monocarboxylate transporter 1) au niveau de la membrane apicale des cellules de l'EPR tandis que son élimination dans le sang se fait grâce au transporteur MCT3 ancré dans leurs membranes basales (Hamann et al., 2003; Philp et al., 2003).

### *iii. Cycle visuel et recyclage du rétinol*

Le point de départ de la phototransduction est l'absorption d'un photon par le chromophore de la rhodopsine et des iodopsines, le 11-cis-retinal (**Figure 7**). Cette absorption induit un changement de conformation du rétinal qui passe alors à l'état tout-trans. Par conséquent, afin de pouvoir être de nouveau sensible aux photons le rétinal doit être ré-isomérisé. Cependant, les photorécepteurs n'exprimant pas les enzymes nécessaires à cette fonction, le tout-trans-rétinal est transféré dans l'EPR où il est ré-isomérisé puis délivré de nouveau aux photorécepteurs. C'est ce que l'on appelle le cycle visuel. Pour les bâtonnets ce cycle fait exclusivement appel aux cellules de l'EPR. En revanche, pour les cônes une partie du recyclage du rétinal serait également effectué par les cellules de Müller (Wang and Kefalov, 2011).

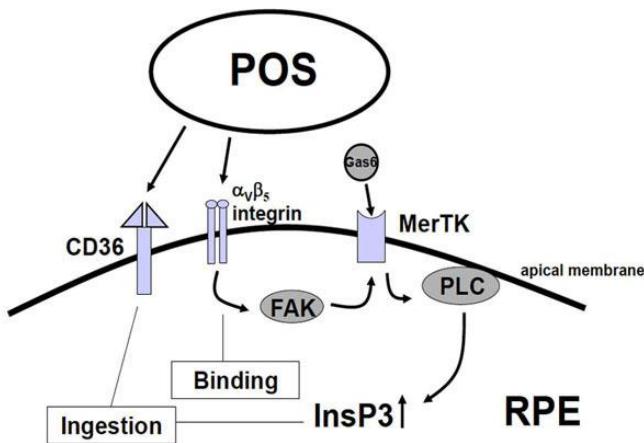
Concernant la voie passant par l'EPR, le cycle débute par le transfert du tout-trans-rétinal de l'espace intra-discal des segments externes des photorécepteurs vers le cytosol grâce au transporteur ABCA4 (ATP-binding cassette protein) (Molday et al., 2000; Weng et al., 1999). Le tout-trans-rétinal est alors réduit en tout-trans-rétinol par une rétinol-déhydrogénase avant d'être relargué dans l'espace sous-rétinien où il se lie à IRBP (interstitial retinal binding protein) afin d'être transporté vers l'EPR. Une fois dans l'EPR le tout-trans-retinol est pris en charge par CRBP (cellular retinol binding protein) qui va le transférer vers un complexe enzymatique constitué de LRAT (lecithin:retinol transferase), RPE65 (RPE protein with 65 kDa) et RDH5 (11-cis-retinol dehydrogenase). Le tout-trans-retinol va alors être tour à tour estérifié par LRAT (Batten et al., 2004), ré-isomérisé par RPE65 grâce à l'énergie dégagée par l'hydrolyse de la fonction ester (Jin et al., 2005; Moiseyev et al., 2005) et enfin oxydé par RDH5 afin d'être reconvertis en 11 cis-retinal (Parker and Crouch, 2010). Le rétinal est alors immédiatement associé à CRALBP (cellular retinaldehyde-binding protein) (Tang et al., 2013) qui induit son relargage dans l'espace sous-rétinien, où celui-ci est à nouveau pris en charge par IRBP, puis restitué aux photorécepteurs (**Figure 3**).



**Figure 3. Le cycle visuel** (Bessant et al., 2001).

#### iv. La phagocytose des segments externes des photorécepteurs

Les segments externes des photorécepteurs sont soumis à un stress photo-oxydatif important leur induisant des dommages irréversibles. Pour pallier cela, les extrémités des segments endommagés sont relarguées dans l'espace sous rétinien, puis phagocytées par l'EPR afin d'être renouvelées depuis la base par les photorécepteurs (Nandrot and Dufour, 2010). Ce cycle qui suit un rythme circadien présente un pic d'activité dans la matinée sous l'effet de la lumière et nécessite que l'EPR et les photorécepteurs soient cordonnés afin de maintenir la longueur des segments. Trois récepteurs principaux régulant cette activité de phagocytose ont été identifiés : l'intégrine  $\alpha V\beta 5$ , le récepteur tyrosine-kinase MERTK et le récepteur transmembranaire CD36. Suite à sa liaison avec un débris de segment externes, l'intégrine  $\alpha V\beta 5$  va enclencher une cascade de signalisation aboutissant à la phosphorylation de MERTK par la kinase d'adhésion focale FAK (Finnemann, 2003; Finnemann and Silverstein, 2001; Finnemann et al., 1997). GAS6 (Growth-Arrest-Specific protein 6) va alors pouvoir se lier à MERTK (D'Cruz et al., 2000; Gal et al., 2000) ce qui va avoir pour effet d'activer la voie de la phospholipase C menant à la synthèse d'inositol 1,4,5-triphosphate (insP3) et à l'augmentation de la concentration intracellulaire de calcium (Mustafi et al., 2013). Cette augmentation semble jouer un rôle important dans la phase d'internalisation des SEPs bien que les mécanismes reliant ces deux évènements restent à ce jour mal compris. CD36 interviendrait également dans la régulation de ce phénomène mais par un mécanisme indépendant de l'intégrine  $\alpha V\beta 5$  et de MERTK (Finnemann and Silverstein, 2001). Une fois internalisés, les débris des segments externes sont conduits aux lysosomes afin d'être digérés (Figure 4).



**Figure 4. La phagocytose des segments externes des photorécepteurs (Strauss, 2011).**

Au cours des dernières années plusieurs ligands facilitant le processus de phagocytose en agissant comme des signaux « manges-moi » ont également été découverts (Caberoy et al., 2012; Chen et al., 2016; Guo et al., 2015). Cependant pour certains d'entre eux les récepteurs associés à cette activité demeurent inconnus. Ainsi les mécanismes permettant la communication et la coordination entre l'EPR et les photorécepteurs demeurent largement incompris.

#### v. Sécrétion de l'EPR

Afin de réguler les différents tissus qui l'entourent, l'EPR sécrète de nombreux facteurs de croissance tels que différents FGFs (Fibroblast Growth Factors), TGF-β (Transforming Growth Factor), IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1), PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), PEDF (Pigment Epithelium-Derived Factor) et CNTF (Ciliary NeuroTrophic Factor) ainsi que d'autres molécules de signalisation telles que l'ATP, FAS-L (Fas-ligand) et certaines métalloprotéases matricielles (MMP) ainsi que leurs inhibiteurs tissulaires (TIMP1, TIMP3) (Araújo et al., 2018; Strauss, 2005).

L'EPR étant un épithélium hautement polarisé la plupart de ces protéines vont être sécrétées de manière unidirectionnelle et vont jouer un rôle important dans l'intégrité et le bon fonctionnement de la choroïde ou de la rétine. (**Tableau 1**)

#### Sécrétions apicales

Les **MMPs** ainsi que leurs inhibiteurs **TIMPs** sont principalement sécrétés par l'EPR du côté apical (Padgett et al., 1997). Elles y joueraient le même rôle qu'un peu partout dans le corps en participant au renouvellement et à la maintenance de la matrice extracellulaire des photorécepteurs. Matrice dont l'un des composants majeurs, **l'acide hyaluronique** (deS Senanayake P et al., 2001), est également sécrété par l'EPR. De plus, les MMPs pourraient être impliquées dans la dégradation de l'extrémité des segments externes des photorécepteurs avant leurs phagocytoses. On retrouve

également certaines MMPs et TIMPs du côté basal de l'EPR et notamment TIMP-3 qui limite l'angiogenèse induite par le VEGF (Qi et al., 2003) afin d'éviter la néovascularisation de la choroïde.

L'EPR sécrète également le **PEDF** préférentiellement du côté apical (Becerra et al., 2004). Ce dernier va y avoir un effet neuroprotecteur pour les photorécepteurs en inhibant l'apoptose induite par le glutamate ainsi que l'hypoxie et va participer au maintien de l'environnement non angiogénique de l'EPR.

En cas de stress trop important l'EPR peut également sécréter l' **$\alpha$ B cristalline** en direction de la rétine où elle sera récupérée par les photorécepteurs (Sreekumar et al., 2010). L' $\alpha$ B cristalline étant une protéine chaperonne capable d'inhiber l'activité protéolytique de la caspase 3 et d'activer les mécanismes de réparation de l'ADN, elle fournit alors une protection efficace aux photorécepteurs contre le stress oxydatif.

D'autres facteurs ayant un effet neuroprotecteur tels que le FGF2 ou le CTNF vont aussi être exprimés par l'EPR en cas de blessure ou de dommages subis par la rétine (Cao et al., 1997).

### Sécrétions basales

La sécrétion basale du VEGF est sans aucun doute l'une des fonctions de l'EPR la plus étudiée. En effet, les traitements anti-VEGF étant actuellement les seuls permettant de lutter contre la forme exsudative de la DMLA, de nombreuses équipes s'y sont intéressées. En condition non pathologique sa sécrétion est finement régulée et va permettre de moduler la prolifération des cellules endothéliales au niveau des choriocapillaires. Cependant en cas de dérégulation, la quantité de VEGF sécrétée peut dépasser un certain seuil et ce dernier va alors induire une angiogenèse anormale aboutissant à la néovascularisation de la choroïde observée dans les formes tardives de DMLA humides (Homayouni, 2009).

D'autres protéines sécrétées par l'EPR vont également participer au maintien et au renouvellement des choriocapillaires telles que TIMP-3 ou encore la Cystatine C dont la mutation homozygote prédispose au développement de la forme humide de la DMLA à un âge précoce (Paraoan et al., 2010) .

L'EPR serait également capable de réguler le flux sanguin au niveau de la choroïde via la sécrétion basale d'Endothéline 1 (Narayan et al., 2004). Cependant ce facteur pouvant à la fois avoir un effet vasoconstricteur ou à l'inverse vasodilatateur selon qu'il se fixe respectivement à son récepteur  $ET_A$  ou  $ET_B$ , son effet exact dans ce contexte reste inconnu.

Protein	Main functions	Links/potential links to AMD	Polarity
$\alpha$ B Crystallin	Molecular chaperone, cytoprotection	Possible AMD biomarker, maybe involved in Drusen formation	Apical
BDNF	Neurotrophic growth factor	Protective role for the photoreceptors possibly lost during AMD	Unknown
CFH	Inhibitor of the complement pathway	Gene variants implicated as a major AMD risk factor	Unknown
CNTF	Neurotrophic growth factor	May provide protection against neurodegenerative diseases, such as AMD	Unknown
Cystatin C	Cysteine protease inhibitor	Variant B isoform associated with increased risk of "wet" AMD	Basal
Endothelin I	Vasoconstriction/vasodilation	Mis-signalling associated with retinopathies with breakdown of blood-retinal barrier	Basal
Fibulin 3/5	ECM protein involved in elastogenesis (fibulin 5)	Variant isoform of fibulin 5 associated with increased risk of AMD	Unknown
FGF 2	Growth factor involved in mitogenesis, angiogenesis and cell survival	Role in choroidal neovascularization	Unknown
FGF 5	Growth factor involved in mitogenesis, angiogenesis and cell survival	Potential functional role in AMD pathophysiology	Basal
HB-EGF	Mitogenic growth factor	Indirect role in choroidal neovascularization via influence on VEGF expression	Unknown
HGF	Growth factor involved in growth, motility and morphogenesis	Protection against oxidative stress, a process frequently linked with AMD progression	Unknown
Hyaluronan	Major component of ECM	Possible role in choroidal neovascularization via interaction with CD44 receptor	Apical
IGF-I	Growth factor involved in growth and development	Role in choroidal neovascularization	Unknown
LIF	Cytokine involved in differentiation	May aid photoreceptor survival during periods of stress, such as AMD	Unknown
MMP-2 and MMP-9	Zinc-dependent endopeptidase involved in ECM degradation	Activity within the Bruch's membrane altered in AMD, possible contribution to progression of "wet" AMD	Apical
NGF	Neurotrophic growth factor	Protection against oxidative stress, a process frequently linked with AMD progression	Unknown
PEDF	Growth factor with neurotrophic and anti-angiogenic properties	Incorrect expression/localization promotes vascularization in late-stage AMD	Apical
TGF- $\beta$	Growth factor involved in proliferation and differentiation	Can cause senescence-associated changes in RPE, a process associated with early AMD	Apical
TIMP-I	Inhibitor of matrix metalloproteinases	Activity of target molecules (MMP's) altered in AMD, possible contribution to progression of "wet" AMD	Apical
Tropoelastin	Involved in formation of elastin fibres (such as in Bruch's membrane)	Potential functional role in AMD-related changes in the Bruch's membrane	Unknown
VEGF	Angiogenic growth factor	Incorrect expression/localization promotes vascularization role in late-stage AMD	Basal

**Tableau 1. Récapitulatif des sécrétions de l'EPR en conditions saines et pathologiques (Kay et al., 2013).**

#### *vi. Privilège immun*

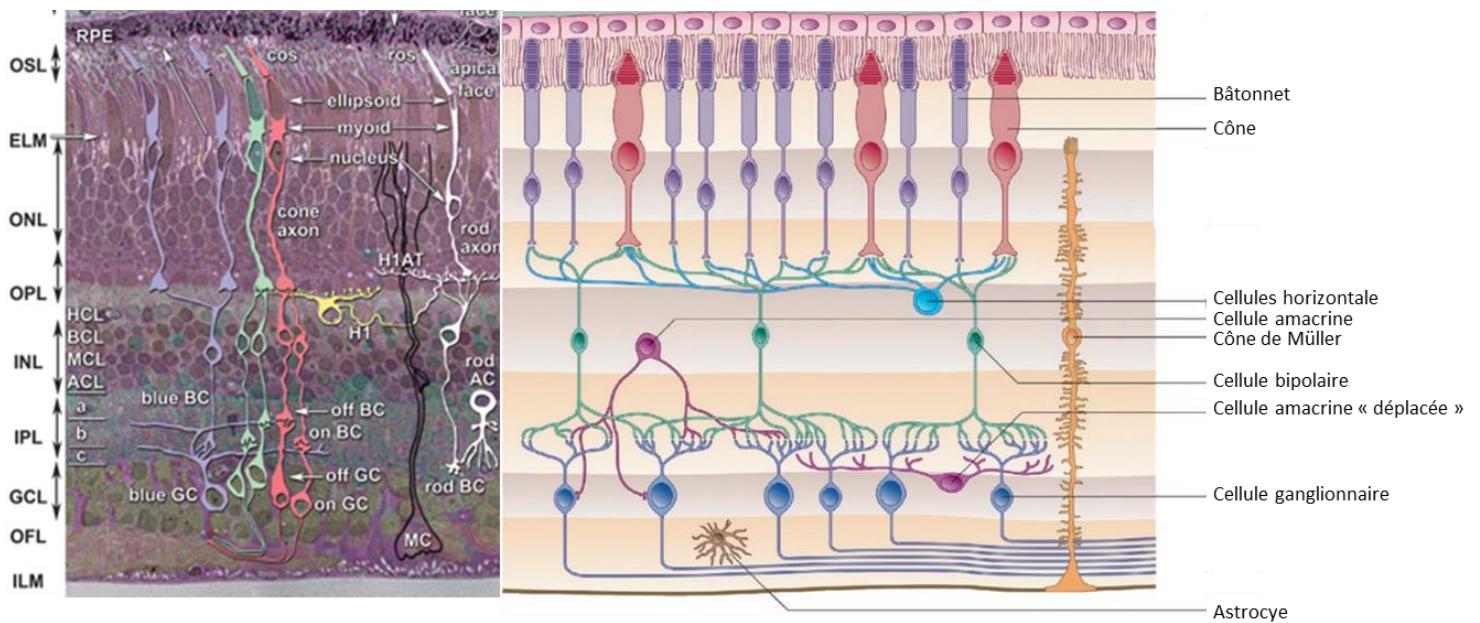
L'intérieur de l'œil est une zone immuno-privilégiée séparée du système sanguin. Comme évoqué précédemment l'EPR participe à ce privilège en formant une barrière physique entre ces deux compartiments. Mais le rôle de l'EPR dans la suppression de la réponse immunitaire à l'intérieur de l'œil ne s'arrête pas là. En effet, il a été démontré que ces cellules étaient capables de communiquer avec certains acteurs de la réponse immunitaire afin de supprimer leur activité. L'EPR est notamment capable d'inhiber l'activité des lymphocytes T4 et T8 (Farrokh-Siar et al., 1999) via l'expression à sa surface de FAS-L et de PD-L1 (Sugita et al., 2009) mais également via la sécrétion de CTLA-2 $\alpha$  (Sugita et al., 2008) et de la thrombospondine (Zhou and Caspi, 2010).

En condition normale, l'EPR va également sécréter le facteur H du complément (CFH) permettant ainsi d'inhiber le complément et de protéger les tissus environnants. Ainsi, le polymorphisme du gène CFH est aujourd'hui considéré comme un facteur de risque de la DMLA (Edwards et al., 2005). Mais malgré ces quelques éléments la manière dont l'EPR interagit avec le système immunitaire demeure méconnue.

Comme nous venons de le voir l'EPR remplit un nombre important de fonctions indispensables à la vision et notamment à la survie et l'entretien des photorécepteurs. Ainsi, la perturbation d'une seule de ces fonctions due à une mutation peut avoir des répercussions dramatiques sur la vue et aboutir à des pathologies rétiennes. Certaines de ces mutations, comme celles touchant les gènes *RPE65* ou *CRALBP*, peuvent par exemple perturber le cycle visuel tandis que d'autres vont bloquer la phagocytose des segments externes des photorécepteurs comme celles touchant le gène *MERTK*. Quoi qu'il en soit ces mutations aboutissent toutes au dysfonctionnement des photorécepteurs et bien souvent à leur dégénérescence.

#### *b. La rétine neurale*

Du fait de son accessibilité, la rétine neurale est sans doute la partie la plus étudiée et la mieux caractérisée du système nerveux central. Il s'agit d'une structure laminaire pouvant être décomposée en 3 couches contenant les noyaux des 7 types cellulaires majoritaires de la rétine : les photorécepteurs cônes et bâtonnets (PC/PB), les cellules bipolaires (CB), les cellules horizontales (CH), les cellules amacrines (CA), les cellules de Müller (CM) et les cellules ganglionnaires (CG). Ces 3 couches nucléaires sont séparées par 2 couches « plexiformes » au niveau desquelles se forment les connexions synaptiques entre ces différentes cellules (Hildebrand and R. Fielder, 2011; Marc, 2008; Masland, 2012) (**Figure 5**).

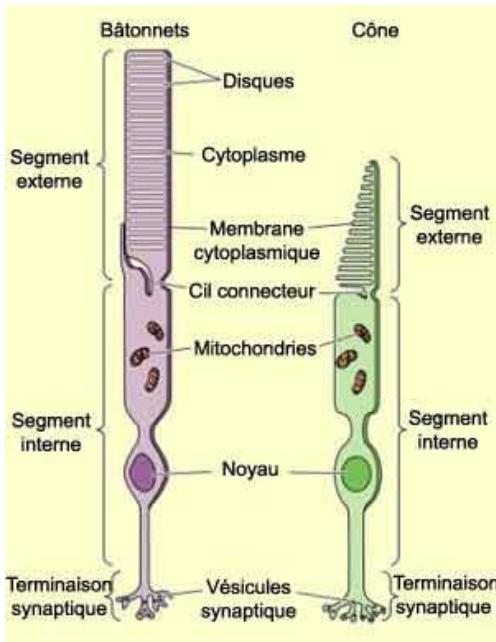


**Figure 5. Organisation cellulaire de la rétine** (Schéma modifié à partir de Hildebrand and R. Fielder, 2011; Marc, 2008).

### i. La couche nucléaire externe

La couche nucléaire externe (CNE) contient les noyaux des **photorécepteurs**, les cellules responsables de la phototransduction du signal lumineux en signal électrique. Il existe 2 types de photorécepteurs, les cônes et les bâtonnets, qui diffèrent dans leurs fonctions, leurs nombres, ainsi que leurs localisations dans la rétine. La rétine humaine compte approximativement 4 à 5 millions de cônes principalement localisés dans la fovéa, où les bâtonnets sont absents, et 77 à 107 millions de bâtonnets qui prédominent dans la rétine périphérique hors de la fovéa (Curcio et al., 1990). Les cônes permettent la détection des couleurs et la vision photopique (diurne). Chez l'Homme, il existe 3 sous types : Les cônes rouges (ou L pour long wavelength sensitive) qui sont majoritaires (environ 63%), les cônes verts (M) moins nombreux (environ 32%) et les cônes bleus (S) beaucoup plus rares (environ 5%). Les bâtonnets quant à eux permettent la vision scotopique (nocturne et en faible luminosité) et sont beaucoup plus sensibles que les cônes. Une fois adaptés à l'obscurité ces derniers sont capables de détecter un photon lumineux unique (Hildebrand and R. Fielder, 2011).

Tous les photorécepteurs conservent cependant une structure commune et sont constitués d'un segment externe, d'un segment interne contenant la machinerie cellulaire nécessaire à leur activité métabolique importante, d'un noyau, d'un axone ou fibre interne et d'une terminaison synaptique (**Figure 6**).



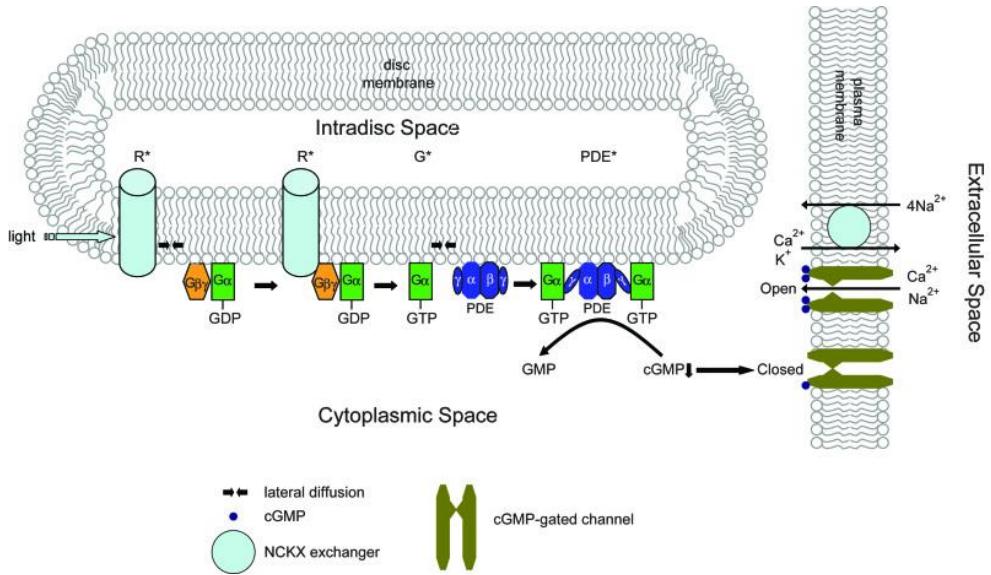
**Figure 6. Les photorécepteurs cônes et bâtonnets** (Image provenant de [http://lecerveau.mcgill.ca/flash/d/d\\_02/d\\_02\\_m/d\\_02\\_m\\_vis/d\\_02\\_m\\_vis.html](http://lecerveau.mcgill.ca/flash/d/d_02/d_02_m/d_02_m_vis/d_02_m_vis.html)).

Au niveau du segment externe, les repliements de la membrane plasmique forment plusieurs centaines de disques plats dans lesquels sont ancrés les pigments visuels. Ces pigments sont constitués d'un chromophore, le 11-cis-retinal, lié de manière covalente à une protéine transmembranaire plus large appelée opsine. Bien que ce complexe soit commun à tous les pigments visuels, de légères différences dans la composition moléculaire des opsines permettent de modifier le spectre d'absorption du rétinal et modifient ainsi l'excitabilité des différents photorécepteurs selon la longueur d'onde du signal lumineux reçu.

La suite de la cascade de phototransduction quant à elle repose sur un mécanisme commun à tous les photorécepteurs. Elle met en jeu un second message, le GMPc, qui fait le lien entre les pigments ancrés dans la membrane des segments externes et l'activité de canaux cationiques permettant l'hyperpolarisation des photorécepteurs, ces derniers étant majoritairement dépolarisés dans l'obscurité.

Schématiquement, l'absorption d'un photon par le 11-cis-retinal va induire son isomérisation vers l'état tout-trans entraînant un changement de conformation de la molécule d'opsine auquel il est lié. Le pigment ainsi activé va alors se lier à la transducine, une protéine G présente à la surface interne de la membrane plasmique des disques. Cette liaison va permettre de catalyser l'échange d'un GDP en GTP au niveau de la transducine induisant la libération de sa sous-unité  $\alpha$  qui va alors activer la GMPc phosphodiésterase (PDE). Cette enzyme catalysant la conversion du GMP cyclique en 5'-GMP, ceci aboutit à une diminution importante de la concentration

intracellulaire en GMPc et va induire la fermeture des canaux cationiques GMPc-dépendant et l'hyperpolarisation des photorécepteurs. Cette hyperpolarisation va alors bloquer le relâchement du glutamate par les photorécepteurs aux niveaux de leurs terminaisons synaptiques dans la couche plexiforme externe (Fu, 2010) (Figure 7).



**Figure 7. La phototransduction (Fu, 2010).**

### *ii. La couche plexiforme externe*

C'est au niveau de la couche plexiforme externe (CPE) que les photorécepteurs vont former des connexions synaptiques avec les cellules bipolaires et horizontales de la couche nucléaire interne. Il s'agit du premier niveau de traitement du signal lumineux reçu. Les signaux individuels envoyés par chaque photorécepteur y sont intégrés et organisés de manière à former des champs de réception concentriques permettant la mise en place d'un antagonisme ON/OFF entre le centre et la périphérie de ces champs. Ce signal est ensuite transmis à la couche plexiforme interne par les cellules bipolaires.

### *iii. La couche nucléaire interne*

La couche nucléaire interne (CNI) contient les noyaux des interneurones chargés de connecter les photorécepteurs avec les cellules ganglionnaires ainsi que les noyaux des cellules gliales. On dénombre 4 types cellulaires principaux dans la CNI : les cellules bipolaires, les cellules horizontales, les cellules amacrines et les cellules de Müller.

**Les cellules bipolaires** sont responsables de la transmission du message nerveux des photorécepteurs vers les cellules ganglionnaires. On en dénombre plusieurs sous-types pouvant être

classifiés selon leur morphologie, leur capacité à former des connexions avec les cônes ou les bâtonnets ainsi qu'en fonction de leur réponse au glutamate. En effet les cellules bipolaire « OFF » possèdent des synapses dites conservatrices du signal. Ainsi, en absence de lumière ces dernières vont se dépolariser en réponse au glutamate relâché par les photorécepteurs auxquels elles sont connectées. A l'inverse elles s'hyperpolarisent à la suite d'une stimulation lumineuse des photorécepteurs car ces derniers ne libèrent plus de glutamate. Les cellules bipolaires « ON » quant à elles vont inverser le signal émis par les photorécepteurs auxquels elles sont connectées et vont donc s'hyperpolariser lorsque ces derniers ne sont pas stimulé et relâcher du glutamate en cas de stimulation lumineuse (Wässle, 2004).

**Les cellules horizontales** assurent l'interconnexion de plusieurs photorécepteurs et vont ainsi permettre l'intégration et la modulation des signaux envoyés par ces derniers dans la couche plexiforme externe via la libération de neurotransmetteurs inhibiteurs comme le GABA (Cueva et al., 2002; Jellali et al., 2002). Il existe deux types principaux de cellules horizontales appelées HI et HII. Les cellules HI sont capables de former des connexions synaptiques avec les cônes via leurs dendrites ainsi que des connexions avec les bâtonnets grâce à leurs axones. Les cellules HII quant à elles n'interagissent qu'avec les cônes (Kolb et al., 1980, 1994).

**Les cellules amacrines** jouent un rôle semblable aux cellules horizontales mais projettent du côté de la couche plexiforme interne où elles modulent les signaux transmis par les cellules bipolaires aux cellules ganglionnaires. On dénombre plus d'une trentaine de sous-types différents de cellules amacrines classées selon leurs morphologies et leurs stratifications dendritiques (MacNeil and Masland, 1998; MacNeil et al., 1999; Masland, 2001). La plupart des cellules amacrines sécrètent des signaux inhibiteurs de type Gabaergiques mais bon nombre d'entre elles sécrètent également d'autres neurotransmetteurs tel que la glycine, la sérotonine ou encore la dopamine (Kolb, 2009). La fonction spécifique de chacun des sous-types de cellules amacrines demeurent à ce jour mal compris.

**Les cellules de Müller** sont les principales cellules gliales de la rétine. Elles s'étendent sur toute son épaisseur et jouent un rôle dans le maintien de sa structure ainsi qu'un rôle de soutien pour les cellules environnantes en remplissant de nombreuses fonctions. Elles interviennent notamment dans le maintien de la concentration en  $K^+$  dans les deux couches plexiformes et dans le recyclage de certains neurotransmetteurs relâchés par les photorécepteurs et les interneurones, tels que le GABA et le glutamate (Newman and Reichenbach, 1996).

#### iv. *La couche plexiforme interne*

C'est au niveau de la couche plexiforme interne (CPI) que se forment les connexions entre les cellules bipolaires, les cellules amacrines et les cellules ganglionnaires. La CPI forme une structure

pluristratifiée pouvant être divisée en 5 parties constituées de branchements spécifiques entre différents sous type cellulaires. De manière simplifiée, ces strates forment 2 couches distinctes permettant de séparer les signaux ON et OFF provenant des cellules bipolaires. Ainsi les connexions entre les cellules ganglionnaires et bipolaires de types OFF se forment dans les strates les plus externes proche de la CNI (sous couche-a) tandis que les connexions entre les cellules ganglionnaires et bipolaires de types ON se font dans les strates les plus internes à proximité de la couche des cellules ganglionnaires (sous-couche-b) (Kolb, 2007).

v. *La couche des cellules ganglionnaires*

Comme son nom l'indique cette couche contient les noyaux des cellules ganglionnaires mais aussi ceux d'autres types cellulaires tels que quelques cellules amacrines, des astrocytes, des cellules endothéliales et des péricytes.

**Les cellules ganglionnaires** sont responsables de la transmission de l'information visuelle de la rétine vers le cerveau. Il en existe plus d'une vingtaine de sous-type dont 2 majoritaires, les cellules naines et parasols, qui représentent plus de 80% des 1,2 millions de cellules ganglionnaires de la rétine humaine. Chacun de ces sous-types peut-être ON ou OFF selon que la cellule projette ses dendrites dans la souche a ou b de la CPI. Les axones des cellules ganglionnaires se réunissent quant à eux au niveau de la papille optique pour former le nerf optique (Field and Chichilnisky, 2007).

## II. Embryologie de l'œil : De la spécification précoce du champ oculaire à la rétinogenèse.

Chez les vertébrés, le développement embryonnaire de l'œil est un phénomène hautement conservé pouvant être décomposé en plusieurs étapes clefs. Ce processus débute au cours de la gastrulation avec la mise en place du champ oculaire. Les facteurs sécrétés par la ligne médiane ventrale vont ensuite induire la séparation de ce champ en deux, chacune de ces parties donnant naissance à une vésicule optique par évagination des parois latérales du diencéphale lors de la neurulation. Au cours de cette évagination, la vésicule optique se retrouve en contact étroit avec l'ectoderme de surface induisant la formation de la placode cristalline. Les facteurs sécrétés par cette dernière ainsi que par le mésenchyme péri-oculaire vont alors induire la formation de trois territoires distincts dans la vésicule optique. La portion la plus dorsale de la vésicule formera l'épithélium pigmentaire rétinien, la partie la plus latérale en contact direct avec la placode donnera naissance à la rétine neurale tandis que la partie la plus ventrale formera la tige optique. Les interactions réciproques entre la placode cristalline et la vésicule optique vont alors induire le repliement sur elle-même de cette dernière de sorte que la rétine neurale et l'épithélium pigmentaire rétinien présomptifs se retrouvent superposés. On parle alors de cupule optique. De son côté la placode cristalline se détache totalement de l'ectoderme de surface afin de former le cristallin et la partie de l'ectoderme de surface restant en contact avec la vésicule optique forme l'épithélium de la cornée (**Figure 11**) (Fujimura, 2016; Graw, 2010; Sinn and Wittbrodt, 2013; Zagózewski et al., 2014).

Comme nous allons le voir chacune de ces étapes est régulée par des facteurs extrinsèques et/ou intrinsèques précis, qu'il est important de comprendre dans le but de récapituler le développement embryonnaire de l'œil à l'aide de cellules souches pluripotentes humaines (CSPhs).

### 1. Spécification du champ oculaire et expression des « Eye Field Transcription Factors »

Le champ oculaire apparaît au cours de la gastrulation et sa mise en place est liée à la spécification du neuroectoderme le long de l'axe antéro-postérieur. En effet, après l'induction neurale provoquée par les voies FGF et IGF et par la répression des voies WNT et BMP, le tube neural va être subdivisé en plusieurs territoires distincts : Le télencéphale, le diencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale. Cette spécification repose sur la sécrétion de facteurs postérieurs tels que l'acide rétinoïque (A.R) et les molécules sécrétées des familles WNT, BMP et Nodal qui vont former un gradient le long de l'axe antéro-postérieur (Agathon et al., 2003; Muñoz-Sanjuán and H. Brivanlou, 2001; Piccolo et al., 1999). Parmi ces signaux, la voie WNT semble jouer un rôle prépondérant puisqu'il a été démontré dans différents modèles tel que le zebrafish mutant *headless*

(*TCF3*) ou encore *Masterblind/Axin1*, que l'augmentation ectopique des signaux WNT aboutissait à une absence de formation des parties les plus antérieures du cerveau (Heisenberg et al., 2001; Kim et al., 2000). A l'inverse la suppression de ces signaux conduit à une extension postérieure du télencéphale.

L'interaction entre ces différents gradients va ainsi permettre la mise en place des différents territoires de la plaque neurale et notamment celle du champ oculaire au niveau du futur diencéphale. Ce dernier est caractérisé par l'expression d'un ensemble de facteurs de transcription regroupés sous l'appellation « Eye field transcription factors (EFTFs) ». Parmi ces gènes on retrouve notamment *OTX2*, *RAX*, *SIX3* et *PAX6* qui ensemble forment un réseau transcriptionnel complexe (Zuber, 2010 ; Zuber et al., 2003).

L'EFTF exprimé le plus précocement est *OTX2*. En effet ce dernier est retrouvé partout dans le cerveau antérieur dès l'embryogénèse précoce (Simeone et al., 1993). Il semble donc être l'un des premiers acteurs de la mise en place du réseau transcriptionnel de l'œil. Il a notamment été démontré qu'*OTX2* était capable de se fixer sur un élément non codant appelé « CNS1 » situé environ 2 Kbs en amont du promoteur de *RAX*. Une fois fixé sur cette séquence, *OTX2* interagit de manière directe avec *SOX2* pour induire l'expression de *RAX* qui en retour réprime la sienne (Danno et al., 2008).

*RAX* joue un rôle prépondérant dans le développement précoce de l'œil comme le montre le phénotype de la souris « eyeless » qui présente une mutation dans le promoteur de ce gène (Chase, 1944; Tucker et al., 2001). Bien qu'il soit conservé chez tous les vertébrés, le nombre d'orthologues peut varier d'une espèce à l'autre. Ainsi, on ne retrouve qu'un seul orthologue de *RAX* chez la souris tandis que le zebrafish et le poisson *medaka* en compte 3 (*Rx1/Rx2/Rx3*). De la même manière, la fonction globale de ce gène semble conservée d'une espèce à l'autre puisque sa mutation aboutit systématiquement à l'absence de formation de l'œil. Cependant, des différences inter-espèces semblent tout de même exister. Chez le *medaka* par exemple, la mutation des gènes *Rx* bloque l'évagination de la vésicule optique mais ne semble pas affecter la mise en place du champ oculaire (Winkler et al., 2000), démontrant une indépendance entre la spécification des progéniteurs rétiniens et les événements morphologiques aboutissant à la formation de la vésicule optique. Chez la souris en revanche, la mutation du gène *Rax* inhibe totalement la mise en place du territoire oculaire et semble donc intervenir plus précocement dans la spécification des progéniteurs rétiniens (Zhang et al., 2000).

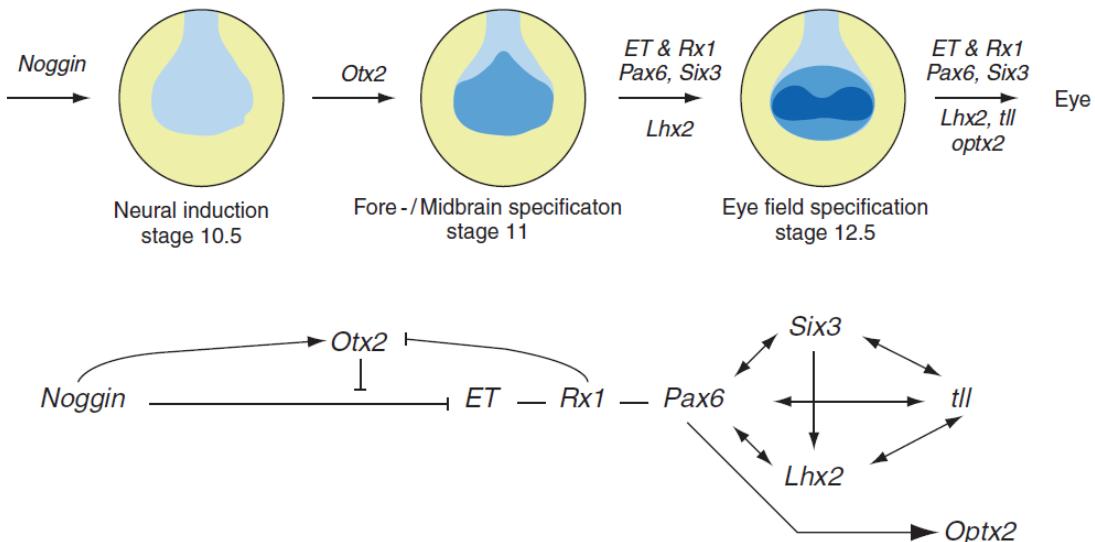
Parmi les EFTFs intervenant très tôt dans la spécification du champ oculaire, on retrouve également *SIX3*. Des expériences de perte de fonction réalisées chez le *medaka* et la souris ont

montré qu'une perte de l'expression de ce gène inhibait la formation des structures antérieures du cerveau et donc de l'œil (Carl et al., 2002; Lagutin et al., 2003). A l'inverse, il a également été démontré que l'expression ectopique de *Six3* pouvait induire à elle seule la formation d'une cupule optique au niveau du mésencéphale (Loosli et al., 1999). Ainsi *Six3* jouerait un rôle majeur dans la mise en place du champ oculaire en participant à la mise en place d'un gradient WNT dans le cerveau antérieur via l'inhibition de l'expression de *Wnt1*.

Mais le gène régulant le développement oculaire précoce le plus connu est probablement *PAX6*. En effet, ce gène étant hautement conservé à la fois chez les vertébrés et les invertébrés (Mathers and Jamrich, 2000), et son expression étant suffisante pour induire la formation ectopique de l'œil dans certains tissus « compétents » (Halder et al., 1995), il a rapidement été avancé qu'il s'agissait d'un gène régulateur clef du développement oculaire.

La souris *Lhx2*<sup>-/-</sup> ayant un phénotype similaire à la souris *small eye*, porteuse d'une mutation sur *Pax6* (Hill et al., 1992; Porter et al., 1997), plusieurs équipes se sont intéressées à l'interaction entre ces deux EFTFs. En effet, dans les deux cas, la mutation de l'un de ces gènes empêche la progression de la vésicule optique vers le stade de cupule, suggérant une possible régulation directe entre ces deux facteurs de transcription. Pourtant, il a été mis en évidence que l'inactivation de l'un de ces gènes n'avait pas d'effet sur l'expression de l'autre dans la vésicule optique démontrant que bien que tous les deux soient essentiels au même stade du développement oculaire, leur expression était indépendante l'une de l'autre. Plus tard Tétreault et al. démontrèrent que *PAX6* et *LHX2* coopéraient de manière synergique afin d'induire l'expression de *SIX6* expliquant au moins en partie la similitude des phénotypes observés dans les 2 souris mutantes (Tétreault et al., 2009).

Au fil du temps, de nombreuses expériences supplémentaires de gain et perte de fonction ont été réalisées et ont impliqué un nombre croissant de gènes dans la mise en place du territoire oculaire. Parmi toutes ces études celle de Zuber menée en 2003 (Zuber et al., 2003) sur le xénope montra en particulier que l'expression combinée de *Otx2*, *Tbx3*, *Pax6*, *Six3*, *Rx1*, *Tll* (homologue de *NR2E1*) et *Six6* était à la fois nécessaire et suffisante à la mise en place du champ visuel. De plus, Zuber posa les bases des interactions entre ces différents facteurs de transcription (**Figure 8**) bien que des études postérieures vinrent contredire certaines de ses affirmations comme le fait qu'*OTX2* ne régulait pas directement l'expression de *RAX*.



**Figure 8. Régulation de la mise en place du champ oculaire (Zuber et al., 2003).**

## 2. Scission des champs oculaires

Après la mise en place d'un champ oculaire unique en position centrale, ce dernier se sépare en deux lors de la mise en place de la ligne médiane ventrale. Les mécanismes précis induisant cette scission demeurent mal compris bien qu'il ait été mis en évidence que les facteurs de croissance de la famille FGF, SHH et TGF- $\beta$  sécrétés par le mésoderme axial jouent un rôle prépondérant dans ce phénomène. En effet, chez le zebrafish, la mutation de gènes apparentés à Nodal (membre de la famille TGF- $\beta$ ) conduit à un phénotype « cyclope » tout comme la mutation de SHH chez la souris (Chiang et al., 1996; Rebagliati et al., 1998).

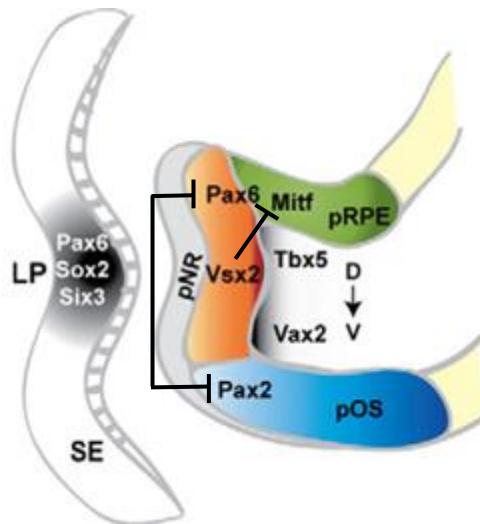
Ces facteurs agiraient à la fois sur la différenciation des cellules axiales du champ visuel en inhibant par exemple l'expression de *Pax6* (Li et al., 1997) mais semblent aussi jouer sur la migration des cellules avoisinantes comme celle des futures cellules hypothalamiques qui, en migrant vers une position plus antérieure, traverseraient le champ oculaire en son centre (Varga et al., 1999).

SIX3 semble également jouer un rôle important dans ce processus en induisant directement l'expression de SHH par la ligne médiane ventrale au niveau du diencéphale. En retour SHH maintient l'expression de Six3 dans cette zone (Geng et al., 2008). Ainsi, une haploinsuffisance de SIX3 perturbe cette boucle de régulation positive et conduit à un phénotype semblable à la perte de SHH chez la souris à savoir une holoprosencéphalie accompagnée de la formation d'un œil unique en position centrale.

### 3. Induction et régionalisation de la vésicule optique

À la suite de cette division, les deux champs optiques nouvellement formés vont s'étendre latéralement jusqu'à induire l'évagination des parois latérales du diencéphale et vont ainsi former les vésicules optiques. Les études menées chez le *medaka* semblent montrer que cette évagination est due à une migration latérale des cellules du champ visuel plutôt qu'à une prolifération massive de ces dernières et soulignent le rôle de RAX dans ce processus. En effet, Rembold et al. ont démontré qu'en cas de mutation de *Rx3* les progéniteurs rétiniens normalement sensés migrer latéralement vont au contraire se regrouper vers la ligne médiane de la même manière que les autres cellules du cerveau antérieur, aboutissant à l'absence de formation de vésicules optiques (Rembold et al., 2006). Ainsi les cellules du champ visuel présenteraient des capacités migratoires différentes des cellules avoisinantes et cette différence serait dépendante de l'expression de *RAX*. Dans cet article, les auteurs proposent un modèle en 2 étapes où dans un premier temps les progéniteurs rétiniens montreraient une convergence plus lente vers la ligne médiane que les autres cellules du cerveau antérieur et formeraient ainsi un large domaine latéral, puis dans un second temps ces progéniteurs migreraient latéralement de manière individuelle entraînant l'évagination des vésicules optiques. Depuis, plusieurs protéines agissant en aval de RAX telles que la protéine d'adhésion NLCAM (Brown et al., 2010) et le récepteur de chimiokine CXCR-4 (Bielen and Houart, 2012) ont été identifiées afin d'expliquer cette différence de capacité migratoire.

Au cours de son évagination la vésicule optique est régionalisée en 3 compartiments distincts, chacun exprimant des facteurs de transcription spécifiques. Ainsi, la région la plus dorsale destinée à former l'EPR commence à exprimer *MITF* tandis que la partie la plus distale qui formera la rétine neurale se met à exprimer *VSX2* (CHX10) (Liu et al., 1994) et que la région ventrale exprime *PAX2*. Du fait de leurs répressions mutuelles ces facteurs jouent un rôle intrinsèque dans le maintien des frontières entre ces 3 régions. En effet, les études menées chez la souris ont démontré d'une part la capacité de *VSX2* à réprimer l'expression de *MITF* (Horsford et al., 2005) assurant ainsi la démarcation entre l'EPR et la rétine neurale, et d'autre part la capacité de *PAX6* et de *PAX2* à se réprimer mutuellement de manière directe (Schwarz et al., 2000), assurant de ce fait la démarcation entre la rétine neurale et la future tige optique (**Figure 9**).



**Figure 9. Régionalisation de la vésicule optique (Yun et al., 2009).**

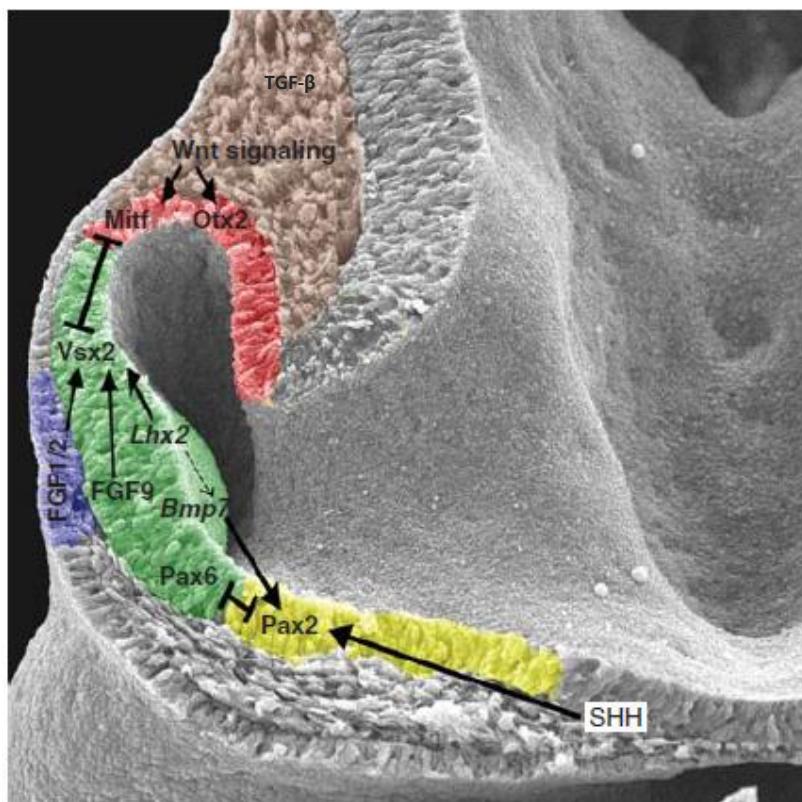
Parmi les facteurs régissant la mise en place de cette régionalisation, LHX2 semble jouer un rôle prépondérant. En effet, comme dit précédemment, chez la souris la mutation de ce gène bloque la progression de la vésicule optique vers le stade cupule. Plus précisément, il semblerait que LHX2 joue un rôle dans la régionalisation dorso-ventrale de la vésicule optique et ce, au moins en partie via la régulation des signaux BMPs sécrétés par les progéniteurs rétiniens eux-mêmes (Yun et al., 2009).

L'expression de ces différents facteurs de transcription et donc la régionalisation de la vésicule optique le long des axes antéro-postérieur et dorso-ventral est également régulée par des facteurs extrinsèques sécrétés par les tissus environnants. Par exemple, au cours de son évagination la partie la plus distale de la vésicule optique vient en contact étroit avec l'ectoderme de surface. L'interaction entre ces deux tissus va induire d'une part un épaississement de l'ectoderme de surface au niveau de la zone de contact pour former la placode cristalline et d'autre part l'expression de VSX2 dans la future rétine neurale sous l'effet des molécules de la familles FGF sécrétées par cette dernière (Nguyen and Arnheiter, 2000).

En parallèle, les signaux TGF- $\beta$  sécrétés par le mésenchyme péri-oculaire réprimeraient l'expression de VSX2 dans la région dorsale de la vésicule optique évitant ainsi la répression de MITF et d'autres marqueurs spécifiques de l'EPR tel que *WNT13* et *MMP115* (Fuhrmann, 2010; Fuhrmann et al., 2000). La voie Wnt/ $\beta$ -Caténine semble également jouer un rôle prépondérant lors de la régionalisation de la vésicule optique et la spécification de l'EPR. En effet, cette voie de signalisation est fortement activée dans l'EPR en cours de différenciation et la mutation de la  $\beta$ -Caténine dans la vésicule optique résulte en une transdifférenciation des cellules de l'EPR en progéniteurs de la rétine neurale (Westenskow et al., 2009). L'origine des ligands WNT responsables de cette régulation est cependant longtemps restée floue, ces derniers pouvant à la fois être sécrétés par le mésenchyme péri-oculaire et/ou par l'ectoderme de surface et/ou par l'EPR lui-même en réponse au signaux TGF-

β. En 2015, Carpenter et al. apportèrent un premier élément de réponse en démontrant que plusieurs ligands de la famille WNT étaient exprimés à la fois par l'ectoderme de surface et le mésoderme péri-oculaire mais que de manière surprenante seuls les ligands sécrétés par l'ectoderme de surface étaient nécessaires au développement de l'œil (Carpenter et al., 2015).

La partie ventrale de la vésicule optique serait quant à elle spécifiée par les signaux SHH en provenance de la ligne médiane. En effet, en plus de présenter un défaut de scission du champ oculaire et un phénotype « cyclope » les souris porteuses de mutation sur *Shh* présentent également une expansion de la zone d'expression de *Pax6* au détriment de *Pax2* (Chiang et al., 1996) (**Figure 10**).

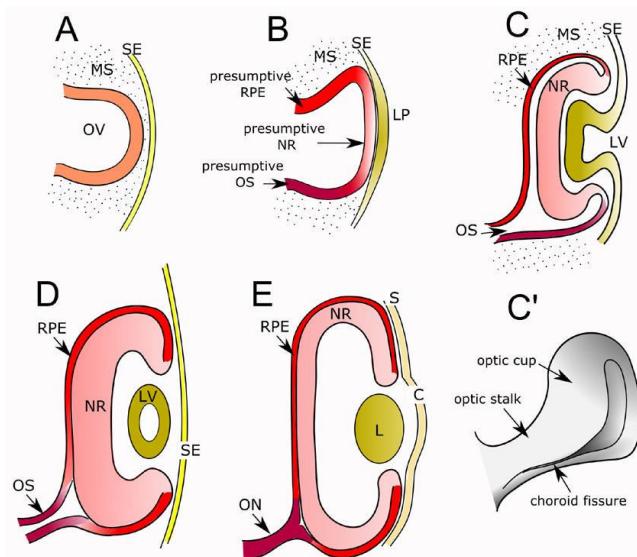


**Figure 10. Régulation de la régionalisation de la vésicule optique par les tissus adjacents**  
(Heavner and Pevny, 2012).

En parallèles de cette spécification, une invagination coordonnée de la placode cristalline et de la vésicule optique va aboutir au repliement de la partie dorsale de cette dernière sur elle-même et à la formation d'une cupule optique bistratifiée. Le futur EPR forme alors la couche externe de la cupule et les progéniteurs de la rétine neurale la couche interne. Par la suite, une seconde invagination au niveau de la partie ventrale de la vésicule optique va aboutir à la formation de la fissure optique (Adler and Canto-Soler, 2007). L'absence d'invagination ventrale chez les embryons de souris simples ou multiples mutant pour les enzymes Raldh1, 2 et 3 tend à montrer un rôle

prépondérant de la voie de l'A.R dans ce processus. Dans cette étude, les auteurs soulignent le fait que les embryons mutants ne présentent pas de défaut de régionalisation de la vésicule optique le long de l'axe dorso-ventral mettant ainsi en évidence le rôle spécifique de l'A.R dans la régulation des mouvements morphogénétiques de la rétine plutôt que dans la régionalisation de cette dernière (Molotkov et al., 2006) (Figure 11).

Comme nous venons de le voir, de nombreuses études menées dans différents modèles tendent à montrer que la régionalisation et les mouvements morphogénétiques permettant de passer de la vésicule optique à la cupule sont finement régulés et dépendent des signaux extérieurs sécrétés par les tissus qui l'entourent. Cette hypothèse est également appuyée par les études menées chez les embryons de souris porteurs de mutation sur le gène *Tcfap2a*. Chez ces embryons, la vésicule optique se positionne mal par rapport aux tissus avoisinants et présentent à la fois des défauts de régionalisation et d'invagination (Bassett et al., 2010).

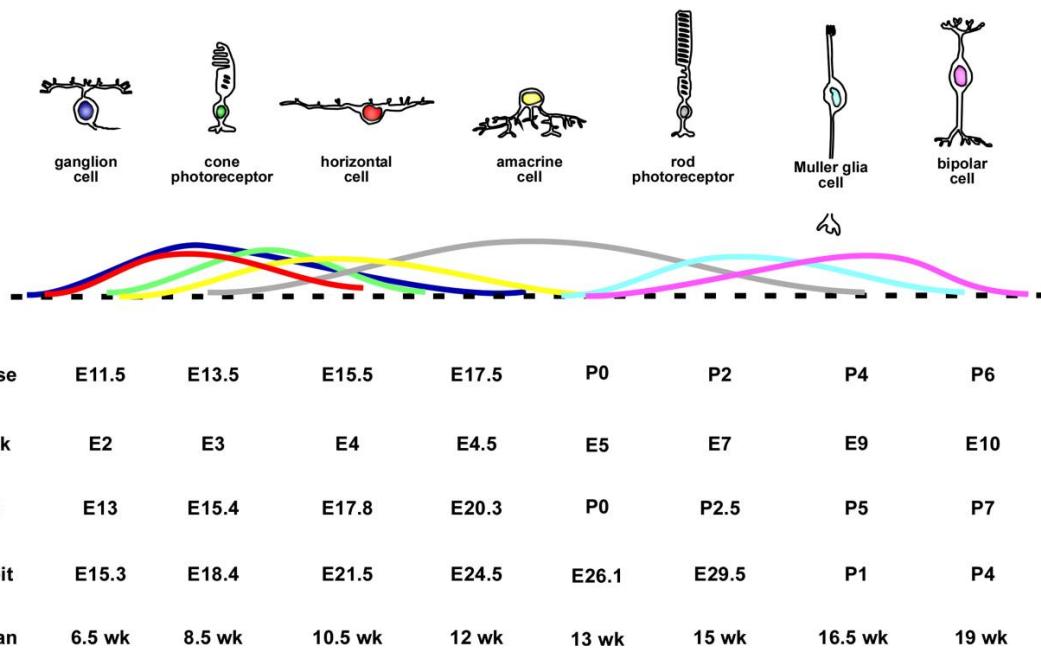


**Figure 11. De la vésicule à la cupule optique (Adler and Canto-Soler, 2007).**

Pourtant, l'importance des signaux envoyés par les tissus adjacents dans la maturation de la cupule optique demeure un débat ouvert. En effet, en 2011, Eiraku et son équipe publièrent que dans le cadre d'une culture en 3 dimensions, un épithélium rétinien dérivé de cellules souches embryonnaires (ESCs) de souris était capable de se régionaliser et de se replier spontanément pour former une structure semblable à une cupule optique. Ils démontrent ainsi qu'*in vitro* a minima, les progéniteurs rétiniens étaient capables de s'autoorganiser en suivant un programme intrinsèque (Eiraku et al., 2011).

#### 4. Progéniteurs rétiniens et spécification des différentes cellules de la rétine.

Au moment de la formation de la cupule optique, la rétine neurale est constituée d'un pool de cellules progénitrices (CPRs) capables de se différencier en chacun des 7 types cellulaires principaux constituant la rétine adulte (PC/PB/CH/CB/CA/CM/CG). L'apparition de ces différents types cellulaires se fait de manière séquentielle au cours du développement et débute par la génération des cellules ganglionnaires, suivie par celle des cônes, des cellules horizontales et de la plupart des cellules amacriennes tandis que la majorité des bâtonnets, des cellules bipolaires et des cellules de Müller sont produites dans un troisième temps. Il est tout de même important de noter que bien que commençant de manière séquentielle le timing d'apparition de ces différents types cellulaires se chevauche largement (**Figure 12**) (Young, 1985).



**Figure 12. Génération séquentielle des cellules rétiniennes** (Martins and Pearson, 2008).

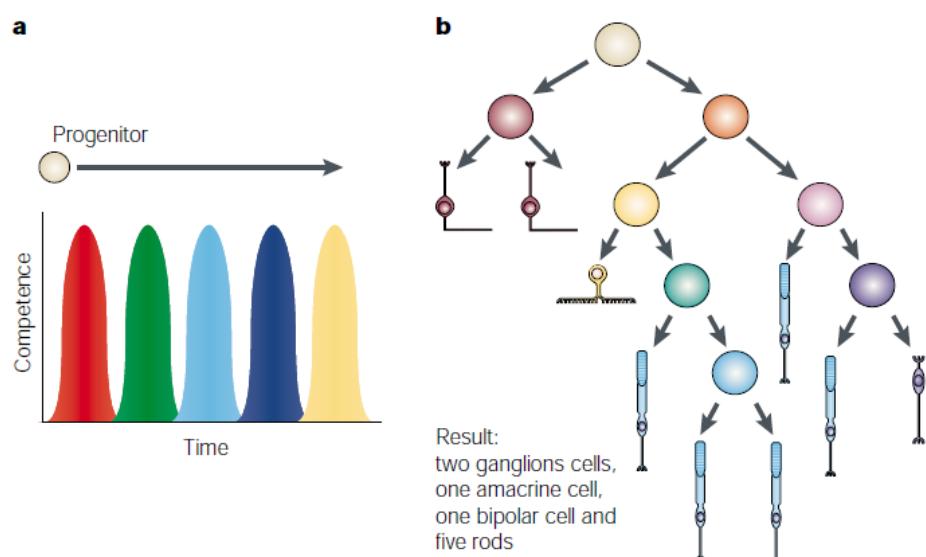
Les facteurs régulant ce timing ont été très largement étudiés mais demeurent encore mal compris. Les premières études visant à suivre individuellement le devenir des CPRs précoces ont tout d'abords démontré que ces dernières étaient multipotentes, écartant la possibilité que différents pools de progéniteurs prédestinés à générer certains sous-types existaient dès ce stade. Dès lors, une hypothèse attrayante était que le devenir de ces progéniteurs au cours du temps était régulé par des signaux extrinsèques émis par leur environnement. Cette théorie est en partie exacte puisque plusieurs facteurs de croissance tel que ceux de la famille FGF, TGF et EGF semblent avoir un rôle dans la différenciation rétinienne bien que leur effet soit dépendant du timing auquel ils sont appliqués (Lillien, 1995; Lillien and Cepko, 1992). Cependant, les travaux menés par la suite et

notamment ceux de réagrégation de progéniteurs prélevés à différent stade du développement (Belliveau and Cepko, 1999; Belliveau et al., 2000) ont démontré que moduler l'environnement avait un impact limité sur le devenir des CPRs et ne permettait pas de générer des types cellulaires précoces tels que des photorécepteurs de type bâtonnet à partir de progéniteurs tardifs.

Les chercheurs ont alors imaginé un modèle dans lequel les CPRs passeraient de manière irréversible par différents stades de compétence au cours du temps. Ainsi au cours de ces stades, des facteurs intrinsèques limiteraient la capacité de différenciations des CPRs à quelques sous-types rétiniens. Ce modèle a donc été appelé « le modèle de compétence » (Cepko, 2014; Cepko et al., 1996) (**Figure 13**).

Dans celui-ci, les facteurs extrinsèques jouent un rôle limité et ne permettent que de contrôler la proportion des cellules produites simultanément par des progéniteurs d'un même stade. SHH par exemple interviendrait dans le rétrocontrôle exercé par les CGs sur les CPRs pour limiter leur propre production (Zhang and Yang, 2001).

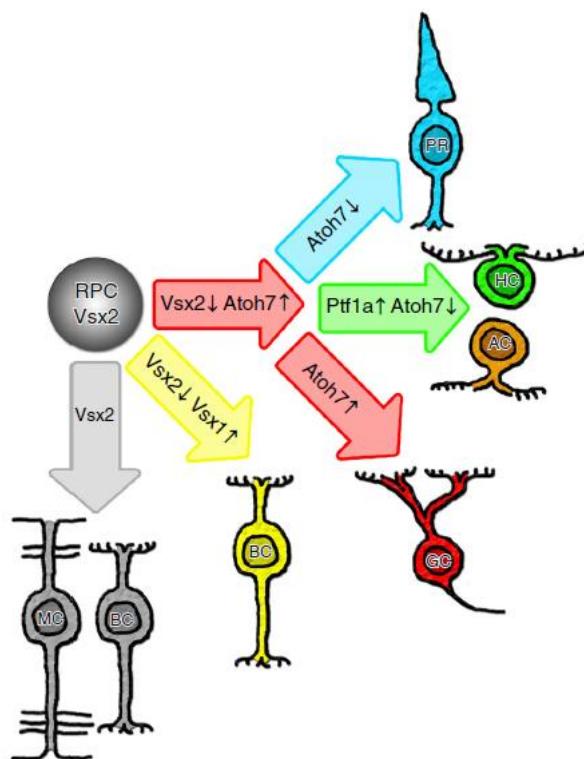
Au cours des dernières années, les facteurs intrinsèques intervenant dans la rétinogenèse ont été intensément recherchés. Cela a permis l'identification d'un grand nombre de facteurs de transcription impliqués dans chaque stade de ce processus, en partant du maintien de la multipotence des CPRs jusqu'à la différenciation tardive des cellules de Müller. Les facteurs de transcription des familles bHLH et Homeobox notamment semblent jouer un rôle prépondérant dans ces différentes étapes (Ohsawa and Kageyama, 2008).



**Figure 13. Le modèle de compétence (Livesey et Cepko, 2001).**

Bien qu'au vu de leur nombre il soit impossible de décrire la fonction de chacun d'entre eux, une hiérarchie globale et très simplifiée peut être soulignée. Au temps le plus précoce, une balance

entre l'expression de *PAX6* et *SOX2* ainsi que l'expression de *VSX2* maintient l'ensemble des CPRs au stade multipotent (Matsushima et al., 2011). Puis la diminution de l'expression de *VSX2* dans la plupart des CPRs, à l'exception de ceux destinés à donner naissance aux cellules de Müller et aux cellules bipolaires, va permettre l'expression de facteurs clefs dans la différenciation des autres types cellulaires réprimés jusqu'alors. L'un de ces facteurs le mieux caractérisé est *ATOH7* qui est à la fois nécessaire et suffisant à la différenciation des CPRs en cellules ganglionnaires. Ainsi, chez la souris la perte de son expression aboutit à une augmentation de la proportion de photorécepteurs de type bâtonnet tandis que sa surexpression est suffisante pour induire la production de cellules ganglionnaires en plus grande proportion chez le xénope. Il a également été démontré que la répression de l'expression de *Atoh7* par *Ptf1* en réponse à l'expression de *FoxN4* était nécessaire à la différenciation des cellules horizontales et amacrines (Boije et al., 2014) (Figure 14).



**Figure 14. Exemple de facteur de transcription impliqués dans la différenciation des cellules rétiniennes. (Boije et al., 2014)**

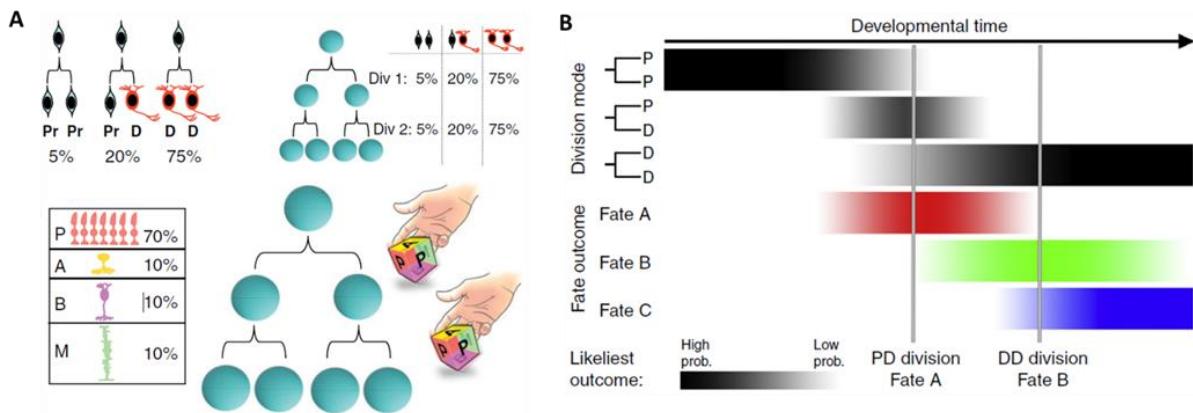
Ainsi, ces facteurs de transcription jouent un rôle important dans la détermination et le maintien de l'identité des cellules rétiniennes. Cependant, la plupart de ceux identifiés jusqu'à présent ne sont exprimés par ces dernières qu'une fois sorties du cycle cellulaire et engagées vers la différenciation d'un type cellulaire en particulier. Ce ne sont donc pas eux qui déterminent l'état de compétence des CPRs. Autrement dit, les facteurs qui induisent le passage des CPRs d'un stade de compétence à un autre et en régulent le timing restent encore à déterminer.

Chez la drosophile, une suite de facteurs de transcription séquentiellement exprimés contrôlant l'identité temporelle des neuroblastes a clairement été identifiée et comprend les gènes *Seven UP*, *Hunchback*, *Krüppel*, *Pdm1*, *Pdm2* et *Castor*. Une hypothèse serait qu'une telle séquence contrôle l'identité temporelle des CPRs chez les vertébrés. Mais bien qu'un orthologue de *Hunchback* nommé *Ikaros* ait été identifié chez la souris et soit capable de biaiser la différenciation des CPRs tardifs vers des types cellulaires précoce, une véritable séquence de facteurs peine à être identifiée (Elliott et al., 2008).

C'est dans ce contexte qu'une autre hypothèse est née. Le devenir des CPRs serait en réalité stochastique. Cette idée, qui à l'origine découlait de la simple observation que les CPRs à un même stade était à la fois hétérogène au niveau de leur taille et de leur transcriptome (Trimarchi et al., 2008), a ensuite été confortée par des expériences de traçage cellulaire permettant de suivre le devenir individuel des progéniteurs, corrélées à des modélisations mathématiques. Ces expériences ont permis dans une première étude de démontrer que chaque progéniteur avait un destin aléatoire et qu'aucun schéma de division ou de différenciation précis au cours du temps n'existe au niveau individuel. Le destin d'un progéniteur ne dépendrait que d'une certaine probabilité partagée par tous les CPRs de donner l'un ou l'autre des types cellulaires de la rétine et non pas du passage de ces derniers par différents stades de compétence strictes. De plus, dans cette étude menée sur des cellules de rats, les auteurs se sont intéressés au mode de division choisi par les CPRs, à savoir symétrique (Progéniteur/Progéniteur « P/P » ou Différentiée/Différentiée « D/D ») ou asymétrique (P/D), au cours du temps. Ils y démontrent que ce choix est aléatoire et suggèrent que la probabilité de s'orienter vers l'un ou l'autre de ces modes est fixe au cours du temps (75% D/D ; 20% P/D ; 5% P/P). Cependant, selon les auteurs eux même ce modèle ne permet pas d'expliquer l'ordre d'apparition séquentielle des cellules au cours du développement bien qu'ils suggèrent que chez certains vertébrés cet ordre soit moins strict (Gomes et al., 2011) (**Figure 15a**).

L'année suivante, la publication de He et al. vint appuyer cette théorie stochastique là aussi à l'aide d'expériences de traçage cellulaire mais en y ajoutant une légère touche de déterminisme. En effet, ils démontrent que la probabilité des CPRs à s'engager dans un mode de division plutôt qu'un autre n'est pas fixe au cours du temps et que ces derniers passent par 3 étapes au cours desquelles leur capacité proliférative diminue. Chez le zebrafish, les CPRs passeraient par une première phase d'amplification avec une forte probabilité de division symétrique P/P, dans un second temps les modes de division P/D et D/D ont lieu de manière simultanée et finalement dans une dernière phase les divisions D/D sont largement majoritaires. En parallèle, les auteurs décrivent également un lien entre le mode de division et le type cellulaire produit, permettant ainsi d'expliquer l'ordre d'apparition des cellules au cours du développement. La plupart des cellules ganglionnaires seraient

générées au cours d'une division asymétrique (P/D) expliquant leur apparition plus précoce tandis que les cellules amacrines ne montreraient aucune préférence et que les photorécepteurs, les cellules bipolaires et les cellules horizontales seraient plutôt générées lors d'une différenciation terminale (D/D). Ce modèle, bien que simple, explique donc à la fois l'ordre d'apparition des cellules dans la rétine tout en assumant son aspect aléatoire (He et al., 2012) (**Figure 15b**).



**Figure 15. Modèle de rétinogenèse stochastique** (Bassett and Wallace, 2012; Boije et al., 2014). (A) Reconstruction *in vitro* de la rétinogenèse chez le rat. Les auteurs suggèrent un modèle entièrement stochastique basé sur des probabilités fixes au cours du temps pour chaque CPRs de donner naissance à l'un ou l'autre des sous types cellulaires étudiés. (B) Suivi *in vivo* de la rétinogenèse chez le zebrafish. Cette fois les auteurs proposent un modèle mêlant stochasticité et déterminisme où la différenciation des CPRs serait biaisée par leur mode de division et où ce mode de division évoluerait au cours du temps.

Une perspective intéressante désormais va être de déterminer si des mécanismes précis génèrent cet stochasticité. Ces mécanismes pourraient par exemple faire intervenir la voie Notch dont le rôle dans le maintien de la multipotence des CPRs a déjà été mis en évidence. En effet, un gradient apico-basal de Notch est observé dans l'épithélium rétinien et une fois cet épithélium établi les noyaux des CPRs vont entamer des migrations le long de cet axe appelées migrations intercinétiques (Del Bene et al., 2008). Or, il a été démontré que les mouvements lors de ces migrations étaient très largement aléatoires (Norden et al., 2009). Ainsi, les CPRs pourraient être aléatoirement plus ou moins exposés au signaux Notch générant une stochasticité dans le choix entre prolifération ou différenciation.

En conclusion, la rétinogenèse est un phénomène complexe, dont la régulation fait intervenir une multitude de facteurs et de mécanismes dont certains n'ont même pas été abordés ici. Ainsi, ce processus est encore largement incompris et des questions posées il y a de cela deux décennies

comme la part jouée par les facteurs extrinsèques ou encore la part exacte de déterminisme et de stochasticité dans le devenir des CPRs demeurent sans réponse.

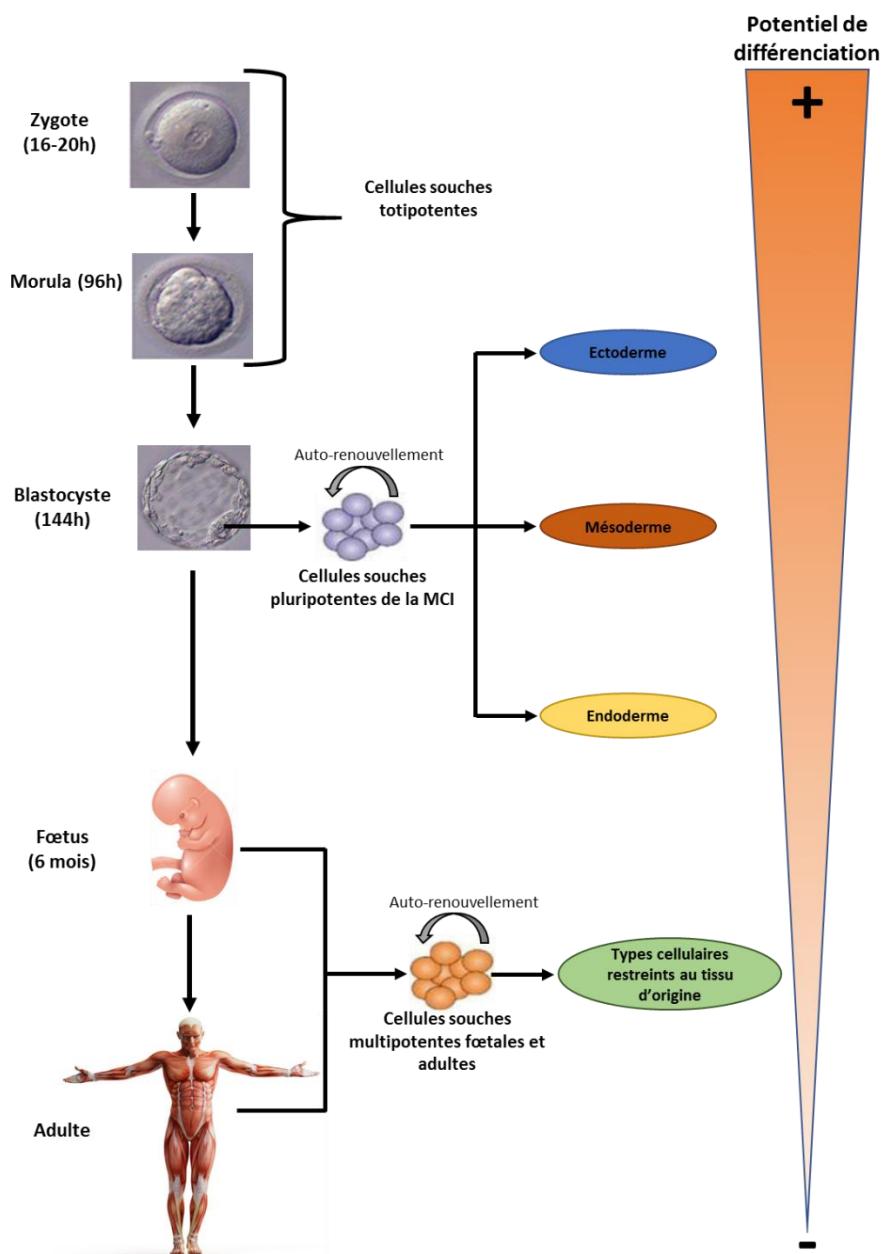
### III. Les cellules souches pluripotentes humaines

Depuis maintenant plusieurs années, les 2 principales caractéristiques des cellules souches pluripotentes humaines (CSPhs), à savoir leur capacité d'auto-renouvellement et leur capacité théorique à se différencier en n'importe quels types cellulaires de l'organisme, ont fait de ces dernières une ressource biologique précieuse non seulement pour des applications de thérapies cellulaires mais également pour la création de nouveaux modèles pathologiques humains. En effet, contrairement à l'utilisation de lignées cellulaires primaires ou immortalisées, la capacité d'auto-renouvellement de ces cellules permet en théorie d'avoir accès à une quantité illimitée de matériel biologique sans avoir recours à des modifications génétiques pouvant interférer avec les mécanismes étudiés. De plus, pour peu que l'on arrive à les diriger vers le destin cellulaire voulu, ces cellules permettent de travailler sur des tissus difficiles d'accès chez l'homme comme la rétine. Enfin, les CSPhs offrent une occasion unique d'étudier les mécanismes gouvernant la prolifération et la différenciation des différents tissus et organes au cours du développement humain. A l'heure actuelle deux sources de CSPhs principales existent : les cellules souches embryonnaires (hESCs) qui sont dérivées à partir de la masse cellulaire interne d'embryon au stade blastocyste et les cellules souches induites à la pluripotence (hiPSCs) qui sont obtenues par reprogrammation de cellules somatiques adultes.

#### 1. Les cellules souches embryonnaires humaines

##### *a. Obtention et dérivation*

Au cours du développement, la capacité de différenciation des cellules embryonnaires va peu à peu être restreinte jusqu'à l'obtention de cellules spécialisées. Après la fécondation et jusqu'au 4<sup>ème</sup> jour du développement, l'œuf fécondé va se diviser pour atteindre le stade de morula. Jusqu'à ce stade les cellules qui le composent sont considérées comme totipotentes car encore capables de donner naissance à toutes les cellules de l'organisme y compris celles formant les structures extra-embryonnaires tels que le placenta et le cordon ombilical. C'est entre le 5<sup>ème</sup> et le 6<sup>ème</sup> jour du développement que les blastomères composant l'embryon vont commencer à se différencier pour former le blastocyste. Les cellules les plus externes vont alors se resserrer pour former le trophectoderme qui donnera naissance à la plupart des structures extra-embryonnaires tandis que les cellules centrales vont former la masse cellulaire interne (MCI). C'est également à ce moment qu'apparaît une cavité, appelée blastocèle, remplie de liquide sécrété par le trophectoderme. A ce stade, les cellules de la MCI sont dites pluripotentes car en mesure de donner naissance à un organisme entier à l'exception de certaines structures extra-embryonnaires (**Figure 16**). Les hESCs utilisées en laboratoire sont donc dérivées au stade blastocyste à partir des cellules de la MCI.



**Figure 16. Déclin de la capacité de différenciation des cellules souches au cours du développement.**

(Modifié à partir de <http://svt.ac-dijon.fr>)

Les premières lignées de cellules souches embryonnaires ont été obtenues en 1981 par Evans et Kaufman à partir de blastocystes de souris (Evans and Kaufman, 1981). Grâce aux travaux menés précédemment, les auteurs de ce papier ont déterminé que le timing idéal pour établir une lignée de cellules souches pluripotentes à partir d'un embryon était de récupérer le blastocyste peu après l'implantation. Cependant, puisqu'il était difficile de récolter les embryons à ce moment précis et qu'à ce stade la MCI est encore composée de peu de cellules, les auteurs eurent l'idée d'induire la diapause des blastocystes juste avant l'implantation par ovariectomie. Ceci leur permit de récolter des blastocystes toujours arrêtés au même stade avec une masse cellulaire interne plus importante

qu'ils remirent en culture pendant 4 jours afin de séparer la MCI du trophectoderme. Ils cultivèrent ensuite les cellules obtenues sur des fibroblastes mitomycinés servant de cellules nourricières et rapportèrent la capacité des lignées ainsi établies à proliférer sur un grand nombre de passages sans anomalie caryotypique. De plus, les auteurs démontrèrent la capacité de ces cellules à se différencier vers les 3 feuillets embryonnaires à la fois *in vitro* et *in vivo* après inoculation chez la souris.

À la suite de cette publication, des lignées d'ESCs furent dérivées à partir de nombreux autres organismes mais ce n'est que près de 20 ans plus tard, en 1998, que les premières lignées de cellules souches embryonnaires humaines furent établies par Thomson et al. (Thomson et al., 1998). Pour cela cette équipe a utilisé, avec le consentement éclairé des familles, des embryons humains surnuméraires au stade morula issue de fécondation *in vitro*. Ces embryons ont été cultivés *in vitro* jusqu'au stade blastocyste afin d'en isoler les cellules de la MCI pour les ensemencer sur une couche de fibroblastes embryonnaires de souris dont la prolifération avait été inactivée par irradiation. Depuis cette première réussite les conditions de dérivations des hESCs ont été améliorées de manière significative par l'ajout de cytokines et/ou de petites molécules au cours du procédé permettant d'améliorer la culture *in vitro* des embryons (Kawamura et al., 2012). De plus, plusieurs équipes ont désormais mis au point des conditions de dérivations xeno-free compatibles avec les applications cliniques (Tannenbaum et al., 2012).

Enfin, des lignée d'hESCs mutantes ont également été dérivées à partir d'embryons écartés de tout projet parental à la suite d'un dépistage préimplantatoire (DPI) ayant révélé la présence d'une mutation responsable d'une maladie incurable (Ben-Yehudah et al., 2012; Mateizel et al., 2006).

#### *b. Limites des hESCs*

Une première limite concernant l'utilisation des hESCs est le peu de lignées mutantes disponibles. En effet le DPI ne concerne qu'un nombre restreint de pathologies et limite donc l'utilisation des hESCs à la modélisation de ces dernières. Ainsi, en 2012 Ben-Yehudah et al. recensaient « seulement » 150 lignées d'hESCs mutantes dans le monde (Ben-Yehudah et al., 2012) (**Tableau. 2**). Cette limite est toutefois désormais contre balancée par l'avènement des nouvelles techniques d'ingénierie génétique et notamment la technique CRISPR/Cas9 qui permet d'insérer relativement facilement une mutation dans le gène voulu et permet ainsi d'envisager la modélisation de nouvelles pathologies à partir d'hESCs.

Mais le principal frein à l'utilisation des hESCs demeure bien évidemment le débat éthique que soulève l'utilisation de cellules prélevées sur un embryon humain et les contraintes juridiques qui en découlent. En France, l'utilisation à l'origine interdite de ces lignées a été régulièrement

débattue depuis le début des années 2000 ce qui a abouti à la création de la loi de bioéthique le 6 août 2004. Tout en maintenant l'interdiction, cette loi a permis à certaines équipes d'obtenir des dérogations renouvelables d'une durée de 5 ans permettant l'utilisation de ces cellules à condition que les travaux menés soient « *susceptibles de permettre des progrès thérapeutiques majeurs et ne puissent pas être poursuivis par une méthode alternative d'efficacité comparable, en l'état des connaissances scientifiques* » (2006). Par définition cette loi nécessite donc l'existence d'une commission capable de juger la pertinence des travaux scientifiques menés ainsi que les conditions d'utilisation et de stockage des hESCs. C'est en partie dans ce but que fut créée l'agence de la biomédecine la même année. Par la suite, la loi de bioéthique fut révisée en 2013 et l'interdiction d'utilisation de cellules souches dérivées d'embryon fut levée. Cependant les conditions d'autorisation demeurent très proches de celles permettant auparavant d'obtenir une dérogation. Cette loi risque toutefois d'être très bientôt de nouveau modifiée puisque cette année (2018) se tiennent les états généraux de la bioéthique.

Country	Disease	Country	Disease	Country	Disease
Australia	Huntington's disease	France	Huntington's disease Fabry syndrome Fragile X syndrome Multiple endocrine neoplasia type 2a Cystic fibrosis Spinocerebellar ataxia type 2 X-linked myotubular myopathy Adenomatous polyposis of the colon Charcot–Marie–Tooth type 1A	Iran	Chromosomal aberrations
Australia	Chromosomal aberrations Huntington's disease Myotonic dystrophy Fragile X syndrome Von Hippel–Lindau disease Charcot–Marie–Tooth Syndrome Infantile neuroaxonal dystrophy	Israel	Myotonic dystrophy type 1 Cystic fibrosis Male hemophilia A-carrier Female carrier of fragile X permutation	Turkey	HLA mismatched Beta-thalassemia Chromosomal aberrations
Belgium	Marfan syndrome Facioscapulohumeral muscular dystrophy Spinocerebellar ataxia Fragile X syndrome ● Myotonic dystrophy type 1 Charcot–Marie–Tooth type 1A Cystic fibrosis Osteogenesis imperfecta Huntington's disease	Israel	Fragile X Sachtre–Chotzen syndrome Gaucher Androgen insensitivity carrier Torsion dystonia DMD Myotonic dystrophy Chromosomal aberrations	The UK	Huntington's disease Cystic fibrosis
				The USA	Chromosomal aberrations
				The USA	Chromosomal aberrations Hemoglobin alpha; HBA Cystic fibrosis Fanconi anemia Spinal muscular atrophy type 1; SMA1 Sandhoff disease
					Albinism, ocular, type 1; OAI Adenoleukodystrophy; ALD
					Duchenne and Becker muscular dystrophy Fragile X

**Tableau 2. Liste des lignées d'hESCs mutantes dérivées à la suite d'un DPI (Ben-Yehudah et al., 2012).**

Malgré cet encadrement très strict, l'utilisation des hESCs continue de soulever de nombreux débats et certaines associations considérant l'embryon comme une personne à part entière dès la fécondation attaquent systématiquement en justice les autorisations de travail décernées par l'agence de la biomédecine, compliquant encore un peu plus l'emploi de ces cellules dans la recherche.

## 2. Les cellules souches induites à la pluripotence

### a. Découverte

C'est en 2006 que le Pr. Yamanaka révolutionna la recherche dans le domaine des cellules souches pluripotentes en démontrant pour la première fois que des cellules somatiques adultes pouvaient être reprogrammées afin de recouvrer des capacités d'auto-renouvellement et de différenciation similaires à celles des cellules souches embryonnaires. Il nomma ces cellules reprogrammées « cellules souche induites à la pluripotence » (Takahashi and Yamanaka, 2006).

Pourtant, l'idée que les cellules somatiques adultes conservent tous les éléments nécessaires à la pluripotence remonte à bien plus loin. En effet, au début des années 60s le Dr. Gurdon eut l'idée de transplanter le noyau d'une cellule mature dans un œuf énucléé de xénopé. Sur 700 transplantations seulement 10 engendrèrent le développement de têtards normaux (Gurdon, 1962). Ce chiffre, bien que faible, permit tout de même de démontrer que le noyau de cellules différenciées conservait l'information nécessaire au développement d'un individu entier bien qu'une partie de cette information soit probablement réprimée.

Il a donc fallu attendre plus de 50 ans après cette première démonstration pour que grâce aux travaux menés durant ce laps de temps, l'équipe du Pr. Yamanaka dresse une première liste de 24 gènes capables d'induire le retour à la pluripotence de cellules somatiques adultes, en l'occurrence des fibroblastes de souris. Par la suite, en éliminant un à un chacun de ces facteurs ils réduisirent cette liste à 10 gènes essentiels avant de finalement la restreindre aux 4 facteurs suivants : Klf4, Sox2, C-Myc et Oct3/4. Dans ce papier, les auteurs démontrent que la seule expression de ces 4 facteurs à l'aide de vecteurs rétroviraux permet de reprogrammer une petite proportion ( $\pm 0.02\%$ ) de fibroblastes adultes en cellules souches pluripotentes ayant la même morphologie et exprimant les mêmes marqueurs que les ESCs. De plus, ils démontrent également que ces cellules possédaient la capacité d'auto-renouvellement et étaient capables de se différencier *in vitro* vers les 3 feuillets embryonnaires et de prendre part au développement de la plupart des tissus, y compris la lignée germinale, lorsqu'elles étaient réintroduites dans un embryon au stade blastocyste (Takahashi and Yamanaka, 2006).

L'année suivante, deux équipes dont celle de Yamanaka obtinrent les mêmes résultats à partir de fibroblastes humains (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007). La seconde équipe, celle de Thomson, utilisa néanmoins un cocktail de facteurs légèrement différent en remplaçant C-Myc et Klf4 par Lin28 et Nanog pour une efficacité équivalente. Cette découverte, qui valut le prix Nobel de Médecine de 2012 au Dr. Gurdon et au Pr. Yamanaka, ouvrit immédiatement de nouvelles perspectives dans les domaines de la thérapie cellulaire et de la modélisation pathologique. En effet,

grâce aux connaissances acquises au cours des 20 années précédentes sur la culture et la différenciation des cellules souches embryonnaires, il fut rapidement possible de différentier les hiPSCs obtenues à partir de fibroblastes de patients en une grande variété de types cellulaires ce qui permit de créer de nouveaux modèles d'étude humains pour de nombreuses pathologies. Mieux encore, il est devenu envisageable de tester l'effet de composés pharmaceutiques sur les cellules d'un patient qui *in fine* recevrait lui-même le composé sélectionné, ouvrant la voie à une médecine plus personnalisée que jamais. D'un autre côté, ces cellules rendirent envisageable la réalisation de greffes autologues écartant tout risque de rejet bien qu'une telle procédure reste difficile à mettre en place de nos jours car longue et couteuse.

#### *b. Méthodes de reprogrammation*

Depuis la démonstration initiale réalisée sur des fibroblastes, la reprogrammation de nombreux autres types cellulaires tels que des kératinocytes, des hépatocytes, des lymphocytes ou encore des cellules pancréatiques a été testée. Si théoriquement toutes les cellules somatiques sont reprogrammables, il s'est avéré que le type cellulaire ainsi que le stade de différenciation des cellules utilisées pouvait influer sur l'efficacité du procédé. Ainsi, l'efficacité de reprogrammation des kératinocytes seraient 100 fois supérieurs à celles des fibroblastes tandis qu'elle serait 300 fois supérieures pour des cellules souches hématopoïétiques que pour des lymphocytes (Aasen et al., 2008; Eminli et al., 2009). A l'heure actuelle, du fait de leurs facilités d'accès et de culture, les fibroblastes ainsi que les cellules hématopoïétiques sont probablement les types cellulaires de départ les plus utilisés pour la génération d'hiPSCs.

Le principal défaut des premiers protocoles décrits concerne la manière d'apporter les facteurs de reprogrammation aux cellules somatiques. En effet, l'utilisation de vecteurs lentiviraux ou rétroviraux implique que les 4 transgènes soient intégrés au génome avec le risque que ces derniers s'insèrent dans une zone importante où soient réactivés ultérieurement. Pour pallier à cela de nombreuses recherches ont été effectuées afin de trouver des méthodes de reprogrammation non intégratives qui se sont finalement révélées tout aussi efficace. Parmi les méthodes les plus courantes de nos jours on retrouve notamment l'utilisation du virus Sendai et l'utilisation d'édosomes dérivés du virus d'Epstein-Barr transfectés par électroporation (Ban et al., 2011; Chhabra, 2017; Fusaki et al., 2009; Yu et al., 2009).

D'un autre côté plusieurs équipes ont cherché à améliorer l'efficacité de la reprogrammation via l'ajout de petites molécules ou de cytokines dans le milieu de culture. L'ajout d'inhibiteur d'histones désacétylases (HDAC) et d'autres composés jouant sur la structure de la chromatine notamment semble permettre d'améliorer de manière significative cette efficacité tout en se

substituant à l'utilisation des facteurs autres que Sox2 et Oct4 (Feng et al., 2009). Ce type d'étude a ainsi permis d'augmenter l'efficacité de la reprogrammation tout en diminuant le nombre de transgènes à utiliser. Certaines équipes ont même décrit des protocoles permettant de reprogrammer des cellules somatiques sans usage d'ADN exogène via l'utilisation de miRNAs, de protéines ou de petites molécules (Anokye-Danso et al., 2011; Hou et al., 2013; Ma et al., 2017). Cependant ces méthodes demeurent à ce jour moins utilisées que celles faisant appel au virus Sendai et aux épisomes.

### *c. Comparaison hESCs/hiPSCs*

Comme dit précédemment, l'utilisation d'hiPSCs au lieu d'hESCs présente de nombreux avantages. Tout d'abord, elle permet de s'affranchir des questions éthiques qui entourent l'utilisation de cellules dérivées d'embryons bien qu'elle soulève d'autres débats comme celui du clonage humain. Au-delà des questions éthiques, l'utilisation des hiPSCs permet de modéliser un vaste nombre de pathologies en prélevant simplement les fibroblastes d'un patient. La possibilité d'avoir accès au tableau clinique de ce dernier permet en outre d'avoir des informations complémentaires pouvant se révéler utiles lors de la modélisation de sa pathologie. De plus, les hiPSCs ont apporté la possibilité de réaliser des greffes autologues ne nécessitant pas l'utilisation d'un traitement immunosupresseur. Cependant avant d'envisager de complètement remplacer les hESCs par les hiPSCs dans le milieu de la recherche une question importante doit être résolue : A quel point les hiPSCs et les hESCs sont-elles semblables ?

Depuis maintenant plus de 10 ans, de très nombreuses équipes se sont penchées sur cette question sans qu'une réponse définitive n'ai pu être apportée. S'il est évident que les hiPSCs possèdent un certain nombre des caractéristiques essentielles des hESCs tels que l'auto-renouvellement, la pluripotence, la morphologie et dans une certaine mesure le profil d'expression génique, certaines équipes ont tout de même fait état de différences entre ces 2 types cellulaires notamment au niveau épigénétique et de la stabilité génomique.

En effet, en plus des anomalies génétiques fréquemment retrouvées chez les hESCs à haut passage telles que la trisomie 12 et 17 ou l'instabilité du locus 20q11.21, plusieurs équipes ont rapporté que les mécanismes mis en jeu au cours de la reprogrammation des hiPSCs engendraient une instabilité génomique. Cette instabilité se caractérise par l'apparition de CNVs (copy number variation) qui, de manière inquiétante, implique régulièrement des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs (Gore et al., 2011; Hussein et al., 2011). Il est tout de même à noter que ces anomalies sont le plus souvent détectées uniquement à bas passage et tendent à disparaître par la suite probablement à cause d'un désavantage sélectif. Cependant cette instabilité génomique peut

s'avérer problématique notamment pour les applications à visée clinique. Ainsi après la greffe autologue de cellules de l'EPRs dérivées d'hiPSCs chez un premier patient, l'équipe du Dr. Takahashi a dû suspendre son essai clinique à la suite de la détection de 3 délétions génomiques dans la lignée hiPSC dérivée à partir des cellules du second patient. Ces délétions, indétectables dans les fibroblastes d'origine, ont poussé l'équipe à changer de stratégie et à opter pour des greffes allogéniques permettant de limiter le nombre de lignées hiPSCs utilisées, facilitant ainsi le control qualité de ces dernières (Mandai et al., 2017a). Toutefois, une étude récente comparant les anomalies génétiques causées par trois méthodes de reprogrammation différentes (vecteurs rétroviraux, virus Sendai et ARNm synthétiques) tend à montrer que les anomalies engendrées par ces procédés demeurent peu fréquentes et le plus souvent bénignes (Bhutani et al., 2016).

Concernant les différences épigénétiques entre iPSCs et ESCs plusieurs équipes ont rapporté des résultats contradictoires. Comme nous l'avons vu auparavant la modification de la chromatine semble être un processus important dans la reprogrammation des cellules somatiques puisque l'utilisation d'inhibiteurs de HDAC ainsi que de composés jouant sur la méthylation de l'ADN améliore son efficacité. Ainsi au cours de ce processus les iPSCs acquièrent un profil hypométhylé semblable à celui des ESCs. Cependant certaines études ont tout de même fait état de différences épigénétiques et cela tout particulièrement chez les iPSCs à bas passage (Kim et al., 2010; Polo et al., 2010). Ceci a conduit à l'idée que ces dernières conservaient une mémoire épigénétique spécifiques du type cellulaire d'origine caractérisée par le retrait incomplet de zones de méthylation de l'ADN. Bien qu'il semblerait que ces marques résiduelles soient peu à peu éliminées au cours des passages, cette mémoire épigénétique pourrait tout de même affecter le potentiel de différenciation des iPSCs en favorisant le retour de ces dernières vers leur type cellulaire d'origine et en diminuant à l'inverse leur potentiel de différenciation vers d'autres lignages. Ce serait notamment le cas pour les iPSCs générées à partir de sang de cordon qui se différencieraient plus facilement en cellules hématopoïétiques que les iPSCs dérivées de kératinocytes (Kim et al., 2011).

D'un autre côté, certaines études n'ont observé que très peu de différences entre les ESCs et les iPSCs que ce soit au niveau de la méthylation de l'ADN ou de l'expression globale des gènes (Choi et al., 2015; Guenther et al., 2010) tandis que des variations du potentiel de différenciation ont également été observées entre différentes lignées d'ESCs (Osafune et al., 2008). L'expression de gènes spécifiques selon le laboratoire d'origine des cellules a même été rapportée suggérant qu'au moins une partie de ces variations étaient dues aux conditions de culture (Newman and Cooper, 2010). De plus, il a été démontré que les variations transcriptomiques observées entre différentes lignées d'hiPSCs étaient pour la plupart dues à des différences de fond génétique plutôt qu'aux cellules d'origine utilisées pour générer ces dernières (Rouhani et al., 2014).

Il est donc difficile à l'heure actuelle de savoir si les différences rapportées entre des iPSCs obtenues à partir de types cellulaires différents sont dues à la conservation d'une mémoire épigénétique provenant des cellules d'origine ou sont plutôt dues à des différences dans les méthodes de reprogrammation et/ou de culture de ces dernières.

Ainsi, en attendant que cette question soit tranchée les hESCs demeurent les cellules pluripotentes humaines de références. Cependant il est clair que du fait de leur facilité d'accès l'utilisation des hiPSCs tend à se généraliser que ce soit dans le cadre de la thérapie cellulaire ou de la modélisation pathologique.

### 3. Culture *in vitro* des cellules souches pluripotentes humaines

#### a. *De l'établissement des premières lignées à l'automatisation de la culture*

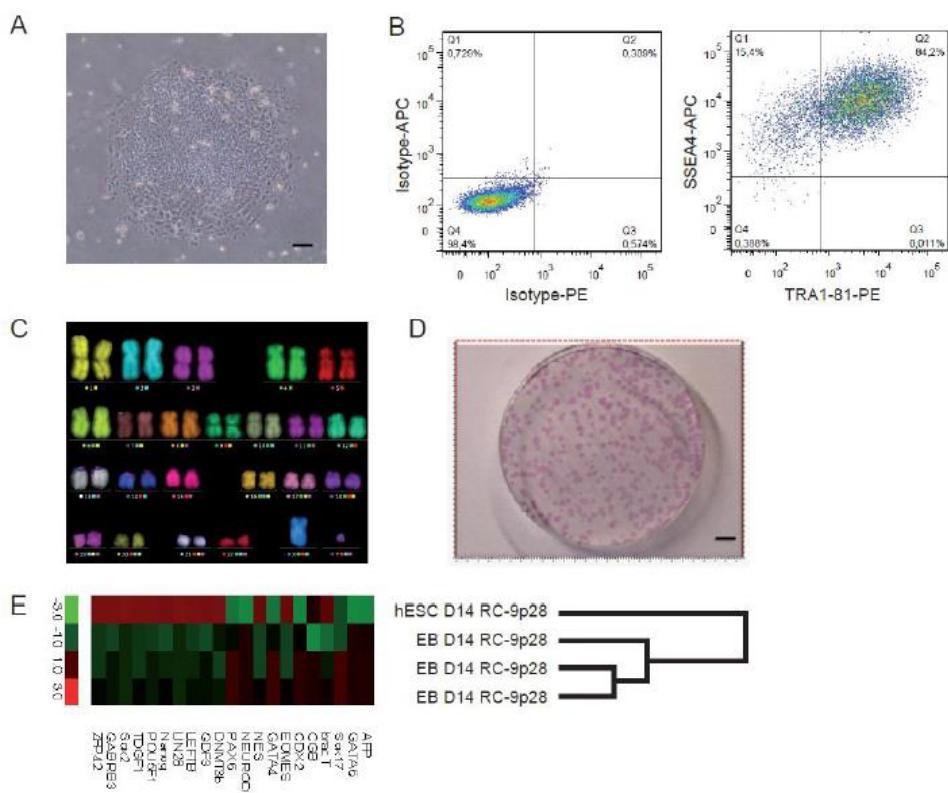
La culture des CSPhs est de loin plus complexe que celle de lignées primaires ou immortalisées et repose sur la capacité à maintenir ces cellules au stade indifférencié. Dans un effort de standardisation visant à atteindre des conditions de culture totalement définies permettant l'utilisation des CSPhs en clinique, les méthodes de culture de ces cellules ont considérablement évolué depuis l'établissement des premières lignées d'hESCs. Par exemple, la première génération de milieu de culture contenait généralement du sérum de veau fœtal (SVF) qui fut rapidement remplacé par du KSR (Knock-out serum replacement) de composition connue, supplémenté avec du FGF2 (Fibroblast Growth Factor 2). Plus récemment ce type de milieu tend à son tour à être remplacé par des milieux commerciaux optimisés pour la culture en condition feeder-free. Car en effet la composition du milieu de culture n'est pas la seule chose qui ait changé au fil des ans et depuis maintenant quelques années l'utilisation de fibroblastes embryonnaires de souris comme cellules nourricières a été remplacée par des coatings constitués de matrice extracellulaire ou de matrices synthétiques dont la composition est totalement définie et donc adaptée aux applications cliniques.

Enfin, le mode de passage des CSPhs a également quelque peu évolué. En effet, bien que le passage manuel soit toujours préconisé afin de limiter les risques d'apparition d'aberrations chromosomiques tout en permettant la sélection des colonies que l'on souhaite amplifier sur des critères morphologiques, l'utilisation de petites molécules tel que le Y-27632 (Rock inhibitor) a apporté la possibilité de passer ces cellules de manière enzymatique (Watanabe et al., 2007), ouvrant du même coup la porte à l'automatisation de la culture des CSPhs. Ainsi, ces dernières années plusieurs équipes ont rapporté la possibilité d'utiliser des automates tels que le Cell Host (Hamilton) ou le Compact Select (Sartorius) afin de maintenir, passer et différentier des CSPhs vers divers types cellulaires telles que des cellules souches mésenchymateuses et neurales (Konagaya et al., 2015;

Paull et al., 2015; Soares et al., 2014; Terstegge et al., 2004). L'automatisation a entre autres permis à ces équipes de réduire la variabilité de la culture de ces cellules (Archibald et al., 2016) et devrait, dans les années à venir, s'étendre à la différenciation d'autres types cellulaires avec pour objectif final la production à grande échelle dans des conditions de bonnes pratiques de fabrication de dérivées de CSPhs pour des usages cliniques.

#### b. Contrôles qualités

Au cours de la culture des CSPhs deux points doivent être régulièrement contrôlés : le maintien de la pluripotence et de la capacité de différenciation ainsi que le maintien d'un caryotype normal. A l'heure actuelle aucun control qualité « standard » n'existe réellement et chaque laboratoire possède ses propres critères.



**Figure 17. Exemple de contrôle qualité des CSPhs.** (A) Photographie en contraste de phase d'une colonie d'hESCs présentant une morphologie caractéristique des CSPhs. (B) Contrôle de l'expression des marqueurs de pluripotence SSEA4 et TRA1-81 par cytométrie en flux. (C) Caryotype réalisé par mFISH ne montrant aucune anomalie chromosomique. (D) Coloration positive de l'activité phosphatase alcaline des CSPhs. (E) Mesure de l'expression de marqueurs de pluripotence et des 3 feuillets embryonnaires chez des hESCs non différenciées et après 14 jours de différenciation en corps embryonnaires (Ben M'Barek et al., 2017).

Afin de vérifier que les CSPhs en culture demeurent bien à l'état indifférencié il est par exemple possible de contrôler l'expression de certains marqueurs de surface ou de facteurs de transcription par cytométrie en flux, immunofluorescence ou qPCR. Parmi les marqueurs de surface le plus couramment contrôlés on retrouve SSEA3, SSEA4, TRA1-60 ou encore TRA1-81 tandis que concernant les facteurs de transcription l'expression de Nanog et Oct3/4 est souvent vérifiée. De plus, la vérification de l'activité alcaline phosphatase est généralement considérée comme un bon indicateur de l'état indifférencié d'une cellule (Chhabra, 2017; Martí et al., 2013).

En parallèle, il est également nécessaire de contrôler la capacité de différenciation des CSPhs vers les 3 feuillets embryonnaires. Pour cela deux approches sont possibles : la différenciation *in vitro* via la formation de corps embryonnaires en condition de culture non adhérente ou la formation de tératomes *in vivo* suite à l'injection des CSPhs chez des souris immunodéficientes.

Enfin, il est extrêmement important de vérifier le caryotype de ces cellules puisque l'apparition d'aberrations chromosomiques est un défaut couramment observé à haut passage. Pour cela plusieurs techniques sont envisageables. La plus couramment utilisée demeurent probablement le M-FISH (Multiplex fluorescence *in situ* hybridization) mais des méthodes plus sensibles telles que le génotypage basé sur la détection des SNPs (single nucleotide polymorphism) ou encore le séquençage complet du génome sont désormais souvent employées (Lund et al., 2012) (**Figure 17**).

#### 4. Utilisation des cellules souches pluripotentes pour le traitement et la modélisation de la DMLA et des rétinites pigmentaires.

Les rétinites pigmentaires représentent un groupe de maladies génétiquement hétérogènes impliquant des mutations dans plus de 80 gènes différents (Bravo-Gil et al., 2017). Au vu de cette diversité il apparaît difficile de créer des modèles animaux pertinents pour chacune de ces maladies. Ainsi, des modèles alternatifs, de préférence humains au vu de l'organisation spécifique de notre rétine, sont nécessaires. Dans ce contexte, les CSPhs offrent une opportunité unique de modéliser ces pathologies dont les mécanismes demeurent souvent méconnus.

D'un autre côté, l'œil présente de nombreux avantages faisant de lui l'organe idéal pour effectuer les premiers essais de thérapie cellulaire à partir de CSPhs. Tout d'abord, sa petite taille en comparaison avec d'autres organes permet la production de greffons avec une quantité raisonnable de cellules. De plus, bien que l'étendue du privilège immun de l'œil ne soit pas tout à fait définie et ne permette pas de totalement se passer d'immunosuppression, il pourrait tout de même limiter les risques de rejet. Enfin, il y est possible de suivre régulièrement le devenir du greffon via des méthodes non invasives comme la réalisation d'un fond d'œil.

C'est pourquoi, comme nous allons le voir, de très nombreuses équipes se sont mis à la recherche de protocoles permettant la différenciation des CSPhs vers les différents types cellulaires de la rétine.

*a. Différenciation des CSPhs en cellules rétinien*nes

*i. Différenciation en cellules de l'EPR*

Il s'agit de la différenciation rétinienne la mieux caractérisée. Il a initialement été découvert qu'en absence de FGF2 les CSPhs se différencient de manière spontanée en cellules de l'EPR (Buchholz et al., 2009; Klimanskaya et al., 2004). Malgré une efficacité très faible, cette méthode permet l'obtention d'une population cellulaire casi-pure via une sélection manuelle des zones pigmentées lors du premier passage. Cependant, ces zones n'apparaissent généralement qu'environ 4 semaines après le retrait du FGF2 et entre 8 et 12 semaines de culture sont nécessaires pour qu'elles deviennent suffisamment larges pour être disséquées, faisant de la différenciation spontanée une méthode longue et fastidieuse. C'est pourquoi au cours des dernières années plusieurs groupes se sont basés sur les études développementales menées chez le xénope, le zebrafish et la souris pour accélérer et améliorer l'efficacité de la différenciation des cellules de l'EPR. La plupart des protocoles publiées à ce jour sont récapitulés dans le **tableau 3** mais seuls ceux ayant permis une amélioration conséquente de la vitesse et/ou de l'efficacité de différenciation par rapport aux protocoles précédents seront développés ici. Une première avancée considérable a été effectuée en 2009 lorsque Idelson et al. démontrent que l'utilisation séquentielle de la Nicotinamide (forme amide de la vitamine B3) et de l'Activine A (membre de la famille TGF- $\beta$ ) permettait d'obtenir près de 40% de cellules pigmentées en « seulement » 6 semaines (Idelson et al., 2009). Toutefois, ce protocole comme beaucoup d'autres publiés au même moment requiert la formation de corps embryonnaires qui de par leur hétérogénéité sont difficilement compatible avec une production à grande échelle. De plus, les mécanismes via lesquels la Nicotinamide améliore la différenciation neurale et rétinienne reste à ce jour mal compris bien que Buchholz et al. aient suggéré que cela passait en partie par l'inhibition de PARPs (Poly(ADP-ribose) polymérase) (Buchholz et al., 2013).

À la suite de cela, un nombre croissant de cytokines et de petites molécules furent employées dans le but d'optimiser la différenciation des cellules de l'EPR. Les voies de signalisation ciblées varient d'un protocole à l'autre mais l'inhibition des voies BMP et Activine via l'utilisation de Noggin, de SB431542 et/ou de LDN193189 est régulièrement utilisée afin d'engager la différenciation neuroectodermique. Par la suite, l'utilisation d'inhibiteurs de la voie Wnt tel que DKK-1 permettrait de conférer à ces progéniteurs une identité plus antérieure correspondant à la région où se forme le

champ oculaire. Ainsi, en 2006 Lamba et al. utilisèrent une combinaison de cytokines comprenant entre autres Noggin, DKK-1 et IGF1, un autre inducteur connu de la formation de l'œil, pour obtenir près de 80% de progéniteurs rétiniens en 3 semaines de différenciation (Lamba et al., 2006). En combinant ce protocole avec les inducteurs de l'EPR préalablement identifiés tels que la nicotinamide et l'activine A, Buchholz et al. décrivirent en 2013 l'un des protocoles le plus rapide et le plus efficace publié à ce jour avec l'obtention de 78% de cellules exprimant le marqueur de pigmentation PMEL17 après seulement 14 jours de différenciation (Buchholz et al., 2013). Un an plus tard, la même équipe publia que l'utilisation du CHIR99021, une petite molécule activatrice de la voie WNT/β-caténine, à la fin du processus de différenciation en augmentait encore l'efficacité, permettant ainsi de s'affranchir de la sélection manuelle des zones pigmentées (Leach et al., 2015).

En 2015, Maruotti et al. utilisèrent quant à eux une approche totalement différente ne s'appuyant pas sur les études développementales pour optimiser la spécification des CSPhs en cellules de l'EPR. Ils réalisèrent un criblage à haut débit basé sur la mesure, par qPCR, de l'expression de 3 marqueurs de l'EPR (OTX2, PMEL17 et MITF) afin d'identifier des petites molécules améliorant l'efficacité de différenciation au jour 15. Ce criblage aboutit à l'identification de la chetomin qui, en combinaison avec le nicotinamide, leur permit d'obtenir plus de 60% de cellules exprimant PMEL-17 après 35 jours de différenciation (Maruotti et al., 2015). Il est à noter que ce type d'approche non biaisée présente l'avantage de permettre l'identification de composés dont l'efficacité n'aurait pas été soupçonnée autrement. Cependant les mécanismes impliqués sont alors inconnus ce qui nécessite un plus ample travail de caractérisation.

Malgré la publication de ces méthodes de différenciation à la fois rapides et efficaces, plusieurs équipe continuèrent de publier de nouveaux protocoles au cours des dernières années, suggérant que ceux précédemment décris n'avaient pas fonctionné entre leurs mains (Choudhary et al., 2017; Iwasaki et al., 2016; Lidgerwood et al., 2016). De manière cohérente avec cette observation, il a été rapporté que pour un même protocole l'efficacité de différenciation était variable d'une lignée d'hESCs à une autre (Lane et al., 2014). Les raisons de cette variabilité restent cependant à déterminer. A cela vient s'ajouter que pour un protocole donné, les différenciations réalisées à partir d'hiPSCs semblent généralement moins efficaces que celles faites à partir d'hESCs (Buchholz et al., 2013; Zhu et al., 2013). Là encore, les raisons expliquant cette différence ne sont pas clairement établies mais la mémoire épigénétique des hiPSCs, abordée précédemment, pourrait être une explication. Ainsi, la recherche de facteurs permettant de combler cette différence entre hESCs et hiPSCs pourrait se révéler nécessaire à l'avenir.

	Culture condition		Efficiency			
	References	hPSCs type	Media supplementation	% of RPE	Quantification methods	Functional assays
Suspension culture	Osakada et al., 2008	hESC	Lefty A and Dkk1 (20 days) / <i>Transitioned to adherent culture</i>	37,4	Pigmented cells (day 60)	Phagocytosis
	Hirami et al., 2009	hiPSC		29,8	MITF <sup>+</sup> /PAX6 <sup>+</sup> (day 35)	/
	Osakada et al., 2009	hESC and hiPSC	CKI-7 and SB431542 (21 days) / <i>Transitioned to adherent culture</i>	32,5 (hESC) / 29,0 (hiPSC)	MITF <sup>+</sup> (day 30)	Phagocytosis
	Idelson et al., 2009 [11]	hESC	NIC (1 week) / <i>Transitioned to adherent culture</i> / NIC, activin A (weeks 3–4)	33,4	Pigmented cells (week 6)	Transplantation into RCS rat, phagocytosis, PEDF/VEGF secretion
	Krohne et al., 2012 [35]	hiPSC		/		
	Kokkinaki et al., 2011	hiPSC	NIC, activin A (week 3–4) / <i>Transitioned to adherent culture</i> / NIC (3–5 weeks)	37	Pigmented cells (week 8–9)	Phagocytosis, basal VEGF secretion, electrophysiology
Adherent culture	Zahabi et al., 2012	hiPSC	Noggin or SB431542, bFGF (day 0–6) / all-trans-retinoic acid, bFGF (day 6–12) / Shh, bFGF (day 12–18)	57,4	MITF <sup>+</sup> (day 60)	/
	Buchholz et al., 2013	hESC and hiPSC	Noggin, IGF1, Dkk1, NIC (day 0–2) / supplemented with bFGF (day 2–4) / IGF1, Dkk1, activin A (day 4–6) / activin A, VIP, SU5402 (day 6–14)	78,5 (hESCs) / 63 (hiPSCs)	PMEL <sup>+</sup> (day 14)	Phagocytosis
	Leach et al., 2015	hESC	Same than above + CHIR99021, activin A, SU5402 (day 8–14)	97,77	PMEL <sup>+</sup> (day 14)	Phagocytosis, PEDF/ VEGF secretion
	Maruotti et al., 2015	hESC and hiPSC	NIC and Chetomin (day 0–14)	60,8	PMEL <sup>+</sup> (day 35)	Phagocytosis, VEGF secretion, transplantation into albino NOD-SCID mice
	Lane et al., 2014	hESC	Dorsomorphin (day 0–10)	17,7 foci/cm <sup>2</sup>	Pigmented foci	/
3D aggregates and retinal organoids culture	Meyer et al., 2009 [56]	hESC and hiPSC	NIM (N2, heparin) (day 0–16) / <i>Transitioned to adherent culture</i> / NIM and RDM (+ B27)	25 (hESC)	MITF <sup>+</sup> cells (day 40)	
	Zhong et al., 2014 [59]	hiPSC		19	MITF <sup>+</sup> cells (day 28)	
	Zhu et al., 2013	hESC and hiPSC	<i>Embedded in Matrigel</i> , NIM (N2B27, day 0–5) / <i>transitioned to adherent culture</i> / Activin A (day 6–30)	95,7 (hESCs) / 48,0 (hiPSC)	Pigmented cells (day 30)	Phagocytosis, transepithelial electrical resistance, transplantation into RSC rat
	Nakano et al., 2012	hESC	Matrigel, IWR1, FBS, SAG (day 0–18); CHIR99021 (day 15–18)	/		
	Reichman et al., 2014	hiPSC	NIM (N2, until day 14) / <i>Transitioned to adherent culture</i> / NIM (N2, until day 15–30)	/		Phagocytosis

Tableau 3. Récapitulatif des principaux protocoles de différenciation des CSPhs en cellules de l'EPR publiés (Modifié à partir de Leach and Clegg, 2015).

## *ii. Différenciation en progéniteurs de la rétine neurale et en photorécepteurs*

Les protocoles de différenciation permettant de se diriger vers la rétine neurale peuvent être classés en 2 catégories principales. Ceux passant par une étape intermédiaire de corps embryonnaires puis par une phase de culture en adhérence et ceux passant par la formation d'organoides appelés « optic cup » qui, comme leur nom l'indique, vise à récapituler la complexité de la cupule optique.

Quoi qu'il en soit, puisque l'EPR et la rétine neurale dérivent de progéniteurs communs avant la régionalisation de la vésicule optique, les premières étapes de différenciation sont semblables à celles décrites un peu plus haut. Ainsi, comme mentionné précédemment, c'est en 2006 que Lamba et al. décrivirent un protocole permettant d'obtenir plus de 80% de progéniteurs rétiniens exprimant PAX6 et VSX2 après 3 semaines de différenciation grâce à l'inhibition conjointe des voies WNT et BMP. Dans ce même article, les auteurs ont également recherché l'expression de marqueurs plus spécifiques de certains types cellulaires de la rétine au sein de leurs progéniteurs et ont observé qu'il s'agissait en majorité de précurseurs de cellules ganglionnaires et amacrines. Ainsi, à ce stade seulement 12% des cellules exprimaient CRX, un marqueur des photorécepteurs immatures, tandis que presque aucune cellules n'exprimaient de marqueurs des photorécepteurs matures tels que l'opsine S ou la rhodopsine (<0.01%) (Lamba et al., 2006).

Peu après, Osakada et al. publièrent un protocole leur permettant d'obtenir 35% de progéniteurs rétiniens en 35 jours via l'utilisation de DKK-1 et de Lefty-A, un antagoniste de Nodal. Bien que moins efficace que celui de Lamba, ce protocole permit aux auteurs de rechercher des facteurs induisant la différenciation terminale des progéniteurs rétiniens en photorécepteurs. Ainsi, grâce à l'utilisation de taurine et d'A.R ils parvinrent à obtenir environ 20% de cellules exprimant CRX à J170. Plus remarquable encore, à J200 les auteurs observèrent 8,5% de cellules exprimant la Rhodopsine, 8,9% de cellules exprimant l'opsine M/L et 9,4% de cellules exprimant l'opsine S démontrant ainsi qu'il était possible d'obtenir *in vitro* des photorécepteurs matures à partir de CSPhs (Osakada et al., 2008). L'année suivante la même équipe démontra qu'il était également possible d'obtenir des résultats similaires en remplaçant DKK-1 et Lefty-A par les petites molécules CKI-7 et SB431542 plus facilement transférables en clinique (Osakada et al., 2009).

Puisque d'un côté le protocole de Lamba permettait une différenciation plus efficace des CSPhs en progéniteurs rétiniens et que de l'autre le protocole d'Osakada induisait leur maturation en photorécepteurs, Mellough et al. eurent l'idée de combiner les deux. Ceci leur permit d'obtenir près de 60% de cellules exprimant la rhodopsine à J45 bien que ces dernières soient rapidement perdues au cours de la culture (Mellough et al., 2012).

Mais le protocole qui à l'heure actuelle permet la différenciation en photorécepteurs matures la plus efficace est sans doute celui publié par Zhou et al. en 2015. Dans cet article, les auteurs démontrent que l'utilisation d'un facteur multifonctionnel appelé COCO (DAND5) bloquant à la fois les voies WNT, BMP, Activine et Nodal permet d'obtenir 70% de cellules exprimant l'Opsine S en seulement 4 à 5 semaines de culture. Cette surreprésentation de cône bleue peut paraître surprenante aux vues de leur nombre relativement faible dans la rétine adulte, mais elle va dans le sens d'études précédentes suggérant qu'il s'agit de la différenciation par défaut des précurseurs de photorécepteurs (Zhou et al., 2015).

Enfin, au cours des dernières années plusieurs méthodes permettant la génération d'organoides appelés « optic cup », récapitulant assez fidèlement les différentes étapes du développement de la rétine ont été décrit. Ce type de structure en plus de fournir un excellent modèle de la rétinogénèse humaine présente l'avantage de permettre l'obtention de tous les types cellulaires de la rétine dont les cellules de l'EPR et les photorécepteurs.

C'est en 2011 qu'Eiraku et al. rapportèrent pour la première fois que des corps embryonnaires de souris, placés dans un milieu de différenciation rétinien supplémenté avec 2% de matrigel pour soutenir la formation de structure 3D, étaient capable de s'autoorganiser afin de former dans un premier temps une structure semblable à une vésicule optique. Par la suite et sans aucun signal extérieur, cette vésicule se replie sur elle-même de manière spontanée pour former une cupule bistratifiée récapitulant ainsi les mouvements morphogénétiques observés lors du développement de la rétine *in vivo* (Eiraku et al., 2011).

Très rapidement, la même équipe adapta ce protocole aux cellules humaines et des résultats équivalents furent obtenus. Pour cela toutefois quelques modifications notables durent être apportées. En effet, avec les ESCs de souris la différenciation rétinienne était obtenue sans ajout de cytokine via l'utilisation d'un milieu appauvri en KSR (2%). Cependant, ce milieu ne convenait pas à la formation de corps embryonnaires à partir d'hESCs, les auteurs décidèrent de le remplacer par un milieu riche en KSR (20%) tout en se servant d'IWR1, un inhibiteur de la voie WNT pour contrer l'effet postérieurisant de ce dernier. Dans cette étude, il est également démontré que l'utilisation du SAG, un agoniste de SHH, à un timing précis permet d'accroître l'efficacité de la différenciation rétinienne (Nakano et al., 2012).

Deux ans plus tard, Zhong et al. publièrent un protocole simplifié permettant l'obtention d'« optic cup » contenant pour la première fois des photorécepteurs matures capables de répondre à un stimuli lumineux (Zhong et al., 2014).

En parallèle, plusieurs équipes ont rapporté des variantes du protocole de Nakano et al. permettant d'obtenir des structures parfois moins organisées mais de manière plus robuste tout en se passant de composé tel que le matrikel dont la composition non définie ne permet pas d'envisager des applications cliniques. En 2014 notamment, Reichman et al. publièrent un protocole permettant la génération de structures de type neuro-rétine à partir de culture en 2 dimensions qui par la suite peuvent être récoltées et cultivées en conditions non adhérente afin d'induire leur maturation. Au cours de cette maturation les auteurs rapportent l'apparition séquentielle des 7 types cellulaires de la rétine neurale de manière semblable à ce qui est observé *in vivo*. De plus, conformément à ce qui avait été décrit précédemment, l'inhibition de la voie Notch via l'utilisation de DAPT permet de promouvoir la différenciation des progéniteurs rétiniens présent dans ces structures en photorécepteurs (Reichman et al., 2014). Dernièrement, la même équipe a publié une version xéno-free de leur protocole de différenciation répondant aux critères de bonne pratique de fabrication (Reichman et al., 2017).

Plus récemment encore, Ovando-Roche et al. ont démontré que l'utilisation de bioréacteurs permettait d'améliorer la différenciation et la maturation des « optic cups » et représentait donc une option intéressante pour la standardisation et le scale up de la production de cellules rétiniennes (Ovando-Roche et al., 2018).

Pour conclure, au cours des dernières années la différenciation des CSPhs en cellules rétiniennes a connu de grandes avancées avec notamment l'apparition des « optic cups » récapitulant les grandes étapes de la rétinogénèse *in vitro*. Cependant, à l'heure actuelle il reste difficile d'isoler une population cellulaire pure à partir de ces structures. Or, si dans le cadre de la modélisation pathologique ceci ne représente pas un réel problème et peut même être vu comme un avantage permettant d'étudier l'interaction entre les différents types cellulaires de la rétine dans un contexte pathologique, cela représente un obstacle pour les applications de thérapies cellulaires. Pour pallier à cela deux approches sont envisageables. La première consiste à mettre au point des techniques de tri cellulaire basées sur l'expression de marqueurs de surface spécifiques permettant l'isolement et la remise en culture de chacun des types cellulaires de la rétine à partir d'« optic cups ». Cette stratégie semble notamment adaptée aux types cellulaires présents en abondance dans ces structures et a déjà été appliquée afin d'isoler des progéniteurs de photorécepteurs (Gagliardi et al., 2018; Lakowski et al., 2018). Toutefois cela apparaît plus difficilement réalisable, ou en tout cas avec un faible rendement, pour les types cellulaires sous-représentés tel que les cellules de Müller. La seconde option consiste évidemment à optimiser la différenciation des progéniteurs rétiniens vers un type cellulaire en particulier. Toutefois cela risque de prendre encore de nombreuses années

puisque comme nous l'avons vu précédemment, les mécanismes régissant cette différenciation demeurent largement incompris et ferait intervenir une part non négligeable de stochasticité.

### *b. La thérapie cellulaire*

Pour l'heure, les seules cellules rétiniennes dérivées de CSPhs à avoir été greffées chez l'homme sont les cellules de l'EPR. Deux stratégies principales ont été employées afin de transplanter ces cellules dans l'espace sous-rétinien des patients : la greffe de cellules en suspension et celle d'un épithélium déjà polarisé reposant ou non sur un support. Bien que dernièrement la greffe sous forme d'épithélium semble devenir l'option privilégiée, chacune de ces deux approches présentent des avantages et des inconvénients. La première permettant une chirurgie moins invasive tandis que la seconde aurait tendance à promouvoir la survie et la fonctionnalité des cellules greffées.

En 2011, les cellules de l'EPR furent le second type cellulaire dérivé d'hESCs à être greffées chez l'homme par Schwartz et al. Pour cet essai  $5 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$  ou  $1,5 \times 10^5$  cellules en suspension furent injectées dans la région péricentrale de la macula de 9 patients atteints de la forme sèche de la DMLA et de 9 patients atteints de la maladie de Stargardt. Après près de 4 ans de suivi aucun effet secondaire important associé à la présence des cellules ou à la chirurgie n'a été observé chez ces patients et une légère amélioration de la vision a même été constatée chez certains d'entre eux (Schwartz et al., 2012, 2015, 2016). En 2015, Song et al. rapportèrent des résultats similaires suite à la greffe de 4 patients coréens avec les mêmes cellules (Song et al., 2015).

Par la suite, Takahashi et al. développèrent une approche autologue visant à greffer des cellules de l'EPR dérivées d'hiPSCs sous la forme de feuillets ne reposant sur aucun support. Pour cela, l'équipe eut l'idée de cultiver les cellules de l'EPR sur un insert recouvert de collagène jusqu'à formation de l'épithélium puis de traiter l'ensemble avec de la collagénase pour séparer les cellules de l'insert. Un premier patient fut greffé avec succès en utilisant cette méthode mais comme mentionné précédemment l'essai fut arrêté avant la greffe du second patient rendant difficile toute conclusion sur la sûreté et l'efficacité d'une telle procédure (Mandai et al., 2017a). Désormais le Dr Takahashi s'est orienté vers une approche allogénique et a entamé un nouvel essai clinique. Cependant, un premier cas de patient ayant subi des effets indésirables (apparition d'une membrane épirétinienne) nécessitant le retrait du greffon fut rapporté en début d'année par la presse.

De son côté, l'équipe du Dr. Coffey développa une troisième approche visant à greffer des cellules de l'EPR dérivées d'hESCs sous la forme d'un épithélium reposant sur une membrane synthétique (Polytéraphthalate d'éthylène). Les résultats obtenus sur deux patients atteints de la forme humide de la DMLA après la greffe de ce produit de thérapie cellulaire ont été rapportés en début d'année. Après 12 mois de suivi les auteurs ont observé 3 effets indésirables liés à la chirurgie

et au traitement immunsupresseur mais aucun lié à la présence du greffon en lui-même et rapporte une amélioration significative de la vision chez ces deux patients (da Cruz et al., 2018). En parallèle, l'équipe du Dr. Clegg utilisa une approche similaire pour greffer 4 patients atteint de la forme sèche de la DMLA avec, encore une fois, des résultats encourageants puisque 6 mois après la greffe aucun effet secondaire lié aux greffons où à la procédure chirurgicale n'a été rapporté et que 2 des 4 patients présentent une amélioration de la vision (Kashani et al., 2018).

Enfin, en collaboration avec l'Institut de la Vision, nous avons élaboré une approche alternative permettant la culture et la greffe de cellules de l'EPR dérivées d'hESCs reposant sur un morceau de membrane amiotique. L'utilisation de ce support biologique présente de nombreux avantages comme ses propriétés anti-inflammatoires (Niknejad et al., 2008) et antimicrobiennes et représente une solution plus physiologique que l'utilisation de matériaux synthétiques pour remplacer la membrane de Bruch qui est parfois détériorée chez les patients atteints de DMLA. Dans une publication parue en 2017, nous avons notamment démontré à l'aide d'un modèle de rat dystrophique que la greffe de ce produit de thérapie cellulaire permettait une meilleure survie des photorécepteurs associée à une meilleure préservation des capacités visuelles que la greffe de cellules en suspension (Ben M'Barek et al., 2017) (**Annexe 1**). Suite à ces résultats encourageants un essai clinique visant à greffer des patients atteints de rétinites pigmentaires devrait démarrer dans les prochains mois.

Cependant il est important de noter que le remplacement des cellules de l'EPR possède un champ d'application restreint. En effet, il ne s'agit que d'un traitement préventif à réaliser avant que la dégénérescence des photorécepteurs qui est la cause directe de la perte de vision ne soit à un stade trop avancé. De plus, le dysfonctionnement des cellules de l'EPR n'est pas en cause dans toutes les rétinites pigmentaires et leur remplacement est donc parfois inutile. C'est pourquoi la greffe de photorécepteurs représenterait dans la plupart des cas une solution plus adaptée. A l'heure actuelle, aucun essai clinique en ce sens n'a été entamé puisque, comme dis précédemment, la différenciation des photorécepteurs à partir de CSPhs est beaucoup moins bien maîtrisée que celle des cellules de l'EPR. Toutefois, plusieurs équipes ont récemment greffé des progéniteurs de photorécepteurs sur des modèles animaux dystrophiques, soit directement sous la forme de feuillets disséqués à partir d'optic cup (Lamba et al., 2010; Mandai et al., 2017b), soit après purification par cytométrie en flux (Kruczek et al., 2017). Ces premiers essais ont montré qu'une fois greffées, ces cellules étaient capables de former des connexions synaptiques avec les cellules bipolaires de l'hôte et de restaurer en partie la capacité visuelle de ces animaux, générant ainsi de nombreux espoirs pour l'avenir.

Ainsi la greffe de cellules de l'EPR ou de photorécepteurs dérivés de CSPhs devrait, dans les années à venir, jouer un rôle majeur dans le traitement des dystrophies rétiniennes. Cependant, quel

que soit le type cellulaire greffé, l'un des principaux risques à prendre en compte est celui du rejet. En effet bien que l'œil soit considéré comme une zone immunitaire privilégiée, plusieurs études menées dans différents modèles animaux ont démontré qu'il n'était pas possible de se passer de traitement immunsupresseur lors d'une greffe allogénique au niveau de la rétine (da Cruz et al., 2007; McGill et al., 2018; Sugita et al., 2017). Depuis l'avènement des hiPSCs, l'option la plus évidente pour pallier à cette problématique est celle de la greffe autologue. Toutefois, bien que très attractive en théorie, l'essai clinique réalisé par le Pr Takahashi (Mandai et al., 2017a) nous démontre que cette stratégie demeure difficile à mettre en pratique à l'heure actuelle et ceux pour plusieurs raisons. Tout d'abord, la génération d'hiPSCs puis leur différenciation en cellules rétiniennes prend du temps et, dans le cadre d'une application clinique, chaque banque de cellules doit subir de nombreux contrôles qualités afin de s'assurer de la pureté et de l'intégrité génomique de ces dernières. Ainsi, générer une banque de cellules rétiniennes pures et sans aberration chromosomique pour chaque patient s'avère complexe. D'autre part, le coût de production de chacune de ces banques qui, *in fine*, ne serviront qu'à traiter un seul patient est évalué à un million de dollars, empêchant toute perspective de commercialisation. De plus, dans le cadre d'une greffe autologue réalisée sur un patient atteint d'une maladie héréditaire s'ajoute à cela la nécessité de corriger la mutation responsable de la pathologie par ingénierie génétique, ce qui augmente encore le coût de production du greffon tout en augmentant le risque d'apparition d'aberrations génomiques. C'est pourquoi d'autres stratégies sont envisagées. La plus avancée à ce jour est sans doute la création de banques de cellules « haplotypées » à partir de donneurs sélectionnés selon leur profil HLA dans le but d'être compatibles avec un maximum de receveurs potentiels. Au vu de la diversité du système HLA, la création d'une banque permettant de couvrir la majorité de la population mondiale va nécessiter la mise en place d'une collaboration internationale. Toutefois, des études menées dans plusieurs pays tels que l'Angleterre, le Japon, la Chine et les Etats-Unis ont estimé que « seulement » 50 à 150 lignées cellulaires homozygotes pour les HLA-A, B et DR seraient nécessaire par pays pour couvrir 50 à 90% de la population (Barry et al., 2015). Bien que l'utilisation de telles lignées n'écarte pas totalement le risque de rejet, des études récentes réalisées chez le primate semblent démontrer que dans le cadre de la greffe des cellules de l'EPR cela soit suffisant pour se passer de traitement immunsupresseur (Sugita et al., 2016).

Une autre option envisageable est la création par ingénierie génétique de lignées cellulaires non-immunogènes. Pour cela, plusieurs équipes ont généré des cellules n'exprimant aucune molécules HLA de classe I à leur surface via l'inactivation du gène *B2M* (Beta-2 Microglobulin) et ont démontré que ces dernières étaient capables d'échapper à la réponse immunitaire médiée par les lymphocytes T cytotoxiques (Lu et al., 2013; Riolobos et al., 2013; Wang et al., 2015). Cependant,

puisque l il a été décrit que les cellules hématopoïétiques n'exprimant aucun antigène de classe I étaient susceptibles d'activer les cellules NKs (Natural killer) et d'être lysées par ces dernières, il est probable qu'après différenciation les CSPhs  $B2M^{/-}$  induisent une réponse similaire bien que cela ne semble pas être le cas à l'état indifférencié. Afin de pallier à cela, Gornalusse et al ont généré des CSPhs exprimant HLA-E, une molécule HLA de classe I faiblement polymorphe, à leur surface, sans pour autant exprimer HLA-A, B et C. Dans leur étude, les auteurs démontrent que même après différenciation en cellules hématopoïétiques, ces cellules ne sont lysées ni par des cellules NKs, ni par des lymphocytes T cytotoxiques provenant d'un autre donneur (Gornalusse et al., 2017). Toutefois, bien que prometteuse, l'utilisation de cellules HLA déficientes n'est pas sans risque. En effet, les molécules HLA de classe I étant impliquées entre autres dans la présentation des antigènes tumoraux, ces cellules pourraient plus facilement échapper au système immunitaire en cas de transformation cancéreuse. Afin de prévenir tout risque de ce genre, les auteurs suggèrent d'introduire un gène « suicide » inductible tel que le gène HSV-TK (Herpes simplex virus thymidine kinase) chez ces cellules. Quoi qu'il en soit, la sécurité liée à l'utilisation de cellules HLA déficientes ainsi que leur survie à long terme lors d'une greffe allogénique reste à déterminer avant de pouvoir envisager une tentative de greffe chez l'homme.

#### *c. La modélisation pathologique*

Au-delà de leur utilisation en médecine régénérative, les CSPhs ont apporté la possibilité de créer de nouveaux modèles humains pour de nombreuses pathologies. Cette approche se révèle particulièrement pertinente pour des maladies affectant des tissus difficiles d'accès ou bien des types cellulaires compliqués à amplifier *in vitro* tels que les cellules rétiniennes. Ainsi, au cours des dernières années plusieurs équipes se sont lancées dans la modélisation de diverses rétinopathies à l'aide des CSPhs afin de mieux comprendre les mécanismes responsables de ces pathologies et de tester l'effet de molécules à potentiel thérapeutique. Cet aspect de l'utilisation des CSPhs a fait l'objet d'une revue présentée ci-après.

## Use of human pluripotent stem cells to study and treat retinopathies

Karim Ben M'Barek, Florian Regent, Christelle Monville

Karim Ben M'Barek, Florian Regent, Christelle Monville, INSERM UMR861, I-Stem, AFM, Genopole Campus 1, 91030 Evry, France

Karim Ben M'Barek, Florian Regent, Christelle Monville, UEVE UMR861, I-Stem, AFM, Genopole Campus 1, 91030 Evry, France

Author contributions: Ben M'Barek K, Regent F and Monville C contributed to this paper.

Conflict-of-interest: I, Christelle Monville, declare no competing commercial, personal, political, intellectual or religious interests in relation to the submitted work.

Open-Access: This article is an open-access article which was selected by an in-house editor and fully peer-reviewed by external reviewers. It is distributed in accordance with the Creative Commons Attribution Non Commercial (CC BY-NC 4.0) license, which permits others to distribute, remix, adapt, build upon this work non-commercially, and license their derivative works on different terms, provided the original work is properly cited and the use is non-commercial. See: <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

Correspondence to: Christelle Monville, PhD, INSERM UMR861, I-Stem, AFM, 5 rue Henri Desbruyères, Genopole Campus 1, 91030 Evry, France. cmonville@istem.fr

Telephone: +33-16-9908528

Fax: +33-16-9908521

Received: September 29, 2014

Peer-review started: October 1, 2014

First decision: October 28, 2014

Revised: November 13, 2014

Accepted: December 29, 2014

Article in press: December 31, 2014

Published online: April 26, 2015

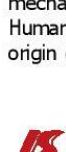
represent a new promising way to generate models of human retinopathies, explore the physiopathological mechanisms and develop novel therapeutic strategies. Disease-specific human embryonic stem cells were the first source of material to be used to study certain disease states. The recent demonstration that human somatic cells, such as fibroblasts or blood cells, can be genetically converted to induce pluripotent stem cells together with the continuous improvement of methods to differentiate these cells into disease-affected cellular subtypes opens new perspectives to model and understand a large number of human pathologies, including retinopathies. This review focuses on the added value of hPSCs for the disease modeling of human retinopathies and the study of their molecular pathological mechanisms. We also discuss the recent use of these cells for establishing the validation studies for therapeutic intervention and for the screening of large compound libraries to identify candidate drugs.

**Key words:** Drug screening; Human pluripotent stem cells; Disease modeling; Retinitis pigmentosa

© The Author(s) 2015. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

**Core tip:** Human pluripotent stem cells (hPSCs) are usually evoked for their potential for regenerative medicine. However, beside these aspects, novel interests raise from the potential of hPSCs to model human diseases including retinopathies. In this review, we describe how these cells allow the study of the molecular mechanisms leading to some form of retinopathies through the development of retinal specific cell type derived from the differentiation of hPSCs. We also discuss the use of hPSCs cellular models for the validation of gene therapy and for drug screening purpose.

Ben M'Barek K, Regent F, Monville C. Use of human pluripotent stem cells to study and treat retinopathies. *World J Stem Cells* 2015; 7(3): 596-604 Available from: URL: <http://www>.



## INTRODUCTION

Retinal diseases, such as age-related macular degeneration (AMD) and retinitis pigmentosa (RP) are the leading causes of blindness in the developed world, collectively affecting to different degree as many as one-third of all people over the age of 75<sup>[1-3]</sup>. This burden is predicted to increase with the ageing of the population in Western countries.

RP is one of the most common inherited diseases of the retina (retinopathies). It is estimated to affect 1 in 3500 to 1 in 4000 people in the United States and Europe. Genes involved in RP are numerous (<https://sph.uth.edu/retnet/disease.htm>) and can affect specifically retinal pigment epithelium (RPE) or photoreceptors or both. Forms of RP and related diseases include Usher syndrome, Leber's congenital amaurosis, rod-cone disease, Bardet-Biedl syndrome, and Refsum disease, among others<sup>[4]</sup>. RP is traduced clinically with a gradual decline in vision as a consequence of photoreceptor cells (rods and cones) dying either from cell autonomous origin or secondary from a defect of RPE cells, which support their survival.

Up to now, there is no curative treatment for these pathologies. Among others (for review, see<sup>[5]</sup>), the more promising areas of research for RP therapies include gene therapy aimed at restoring defective genes, and cell transplantation to replace defective or dead cells.

Gene therapy has been shown to improve visual function in inherited retinal diseases<sup>[6,7]</sup>. Most gene therapies involved integration of vector DNA into the specific cells of retina<sup>[8,9]</sup> and even combine RNA interference (RNAi)-based gene silencing with gene replacement in RP<sup>[10,11]</sup>. While promising, gene therapy aiming at restoring gene defects in the RPE (like *RPE65*) shows limitations. Indeed, the prerequisite to this type of gene therapy is to know precisely the defective gene (need the genotyping of each patient) and a second limitation is to develop a gene delivery candidate drug for each one of the defective genes (cost-intensive). Moreover, recent data from preclinical and clinical studies show that, despite stabilization of vision during the follow-up period, patients treated by *RPE65* gene therapy still undergo photoreceptor degeneration<sup>[6]</sup>.

The other strategy consists on the replacement of died or defective cells by transplantation procedures. The eye has numerous advantages for developing cell therapies as all tissues of the eye are surgically accessible, transplanted cells can be monitored by microscopic analysis and the inherent amplification of the visual system means that relatively small number of rescued cells or transplanted cells could

have a detectable effect on vision. Moreover the ocular immune privilege might greatly simplify immunosuppressive treatment after transplantation. Initial subretinal transplant studies employed tissue-specific stem cells obtained from human fetuses, known as retinal progenitors<sup>[12]</sup>. Extension of this work revealed that post-mitotic photoreceptor precursor cells are optimal for retinal integration and restoration of retinal structures<sup>[13-16]</sup>. Unfortunately, in human embryonic development, both retinal progenitor and photoreceptor are generated relatively late (*i.e.*, 14 and 24 wk of gestation respectively<sup>[17-20]</sup>). The serious ethical implication of this fact, coupled with the practical reality of the relatively small number of photoreceptor precursor cells that can be obtained from a pair of fetal donor eye make it quite unlikely that this cell will be used to any meaningful extent in the treatment of human retinal disease.

In that context, scientists developed new strategies to overcome these constraints. Moreover, a better comprehension of the different molecular mechanisms leading ultimately to RP or AMD is crucial in order to find new treatments. Current animal models of RP are not available for the hundreds of causal mutations. That's why human pluripotent stem cells (hPSCs) lines are rapidly changing the strategies scientists can implement to understand pathological mechanisms and cure genetic diseases.

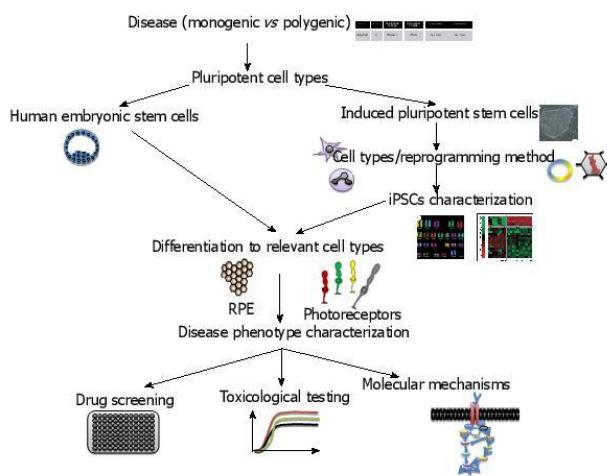
In this review, we focus on the different opportunities concerning the use of human pluripotent stem cells for the disease modeling as well as the future challenges of such research. We also develop the recent improvements in the genetic manipulation of human pluripotent stem cells and the consequences of these on disease modeling and drug screening for retinal diseases. Finally the availability of such human cellular models allowing the validation of therapeutic strategies as unexpected as gene therapy will be discussed.

## hPSCs

Two main sources of hPSCs are described: human embryonic stem cells (hESCs) and human induced pluripotent stem cells (hiPSCs). hESCs are pluripotent cells harvested from the inner cell mass of day-5 human blastocysts that are leftover from *in vitro* fertilizations<sup>[21]</sup>. hiPSCs are reprogrammed somatic cells that share many similarities with hESCs<sup>[22,23]</sup>. Pluripotency is key to the derivation of cell phenotypes that are relevant for disease, including those that are essentially inaccessible in any other way (*i.e.*, post-mitotic retinal cells). Unlimited self-renewal provides easy access to the biological resource of interest<sup>[24]</sup>.

iPSCs have been generated from a range of primary cell types, including fibroblasts, keratinocytes, lymphoblasts, chord blood cells, mesenchymal stem cells and even RPE cells (Figure 1). Each cell type has its own characteristics in terms of the number of factors needed for reprogramming





**Figure 1** Schematic diagram summarizing the issues to consider when modeling retinal diseases with human pluripotent stem cells. Choice of disease (monogenic vs polygenic); Type of pluripotent stem cells (hESCs and/or iPSCs); for iPSCs: selection of cell type to reprogram (fibroblasts, keratinocytes, blood cells), selection of reprogramming method (retrovirus mediated, non-integrative); choice of quality control for iPSCs characterization (genetic analysis, pluripotency, teratoma assay); differentiation to relevant cell types (photoreceptors, RPE); disease phenotype characterization (molecular characterization, expression studies, genetic rescue); applications (drug screening, toxicological testing, new molecular mechanisms). hESCs: Human embryonic stem cells; iPSCs: Induced pluripotent stem cells; RPE: Retinal pigment epithelium.

and the dynamics of derivation (for review<sup>[25,26]</sup>). The generation of iPSCs from older individuals is more difficult and less efficient than the generation of iPSCs from young individuals<sup>[27]</sup>. To help overcome this limitation, a variety of different reprogramming factors, reprogramming enhancers, and cell types have been evaluated<sup>[27-39]</sup> (Figure 1). Of the accessible cell types used for iPSC generation, the reprogramming of keratinocytes has been shown to be as much as 100-fold more efficient and at least twofold faster than the reprogramming of dermal fibroblasts<sup>[40]</sup>. Moreover, the keratinocytes-derived iPSCs are more similar to embryonic stem cells than those generated from fibroblasts<sup>[41]</sup>. Finally, for disease modeling, non-integrative methods should be preferable to integrative ones even if less mandatory than for cell therapy programs.

hPSC-derived retinal cells are valuable new tools for investigators seeking to understand and treat degenerative retinal diseases. These cells will allow scientists to explore the pathophysiology of human diseases in ways that were previously possible only in some animal models. The need for better models, given our poor understanding of the pathogenesis of complex diseases and the dismal predictive record of animal models and tumor-derived cell lines push towards the use of hPSCs for modeling diseases in a dish.

### DISEASE MODELING OF RP

Any disorder confirmed or suspected to have genetic basis can be modeled, but the choice of which disease to model depends on a number of considerations<sup>[42]</sup>. Not all diseases will be equally easy to model. For example, one should consider modeling monogenic and early-onset diseases than polygenic and late-onset diseases, as it would reproduce better aspects of the diseases (Figure 1). Monogenic diseases modeling will allow for a more carefully controlled comparison with genetically corrected cells and demonstration that the disease

phenotypes observed are really caused by the original mutation. Commercial and academic repositories offer primary cell lines or immortalized cell lines for use in research. Most, if not all, disease-causing mutations will be specific to the cell context and affect some cell types more than others. For certain purposes, working with cell lines could be difficult even impossible. This is the case for most retinopathies affecting cells that are not available for biopsies. Genetic disorders of the eye are so numerous that multiple examples exist of conditions that primarily affect photoreceptor cells, ganglion cells, RPE cells, retinal vasculature, choroidal vasculature and eye development. hPSCs systems can offer the possibility to model disease that show a non-cell-autonomous component as both component (*i.e.*, RPE and photoreceptors) can be differentiated from hPSCs and then eventually co-cultured.

Several groups attempted to reconstitute retinal tissue *in vitro* using mice or human cells. A variety of different protocols, utilizing both two- and three-dimensional culture systems, have succeeded in deriving photoreceptor precursor cells from less differentiated precursors<sup>[43-60]</sup>. *In vitro* generated organs from hPSCs constitute powerful systems to model human diseases and perform large-scale drug screening.

Within the spectrum of primary retinal disorders, genetic diseases of the RPE are perhaps the most promising candidates for hPSCs and re-seeded onto a variety of substrates<sup>[61]</sup>. RPE cultured from multiple sources, including hPSCs, has been shown to adopt a mature phenotype, and exhibit key physiological functions *in vitro*<sup>[47,62-64]</sup>.

### EXPLORING MOLECULAR MECHANISMS OF RP

Several studies have been published describing disease modeling using hPSCs. Singh and collaborators recently developed a hPSC-RPE "model in a dish" of Best

vitelliform macular dystrophy (BVMD)<sup>[65]</sup>. BVMD is caused by a defect in the RPE gene *BEST1*, which results in the subretinal accumulation of photoreceptor waste products, *i.e.*, lipofuscin, and fluid, leading to secondary photoreceptor death and central vision loss. Using physiological stressors, they reproduced some of the cellular defects observed in the disease and suggested a role of intracellular calcium regulation and oxidative stress in the mechanism of disease<sup>[65]</sup>. Similar conclusions were made with other RP models<sup>[66]</sup> involving endoplasmic reticulum stress. In this study, several hiPSCs lines were created from 5 patients carrying mutations in different genes involved in RP (RP1, PRPH2, RHO, RP9). After 120-150 d of culture, mature photoreceptors (Rhodopsin positive) derived from all cell lines died, reproducing features observed in the diseases. One line, RP9, showed a much lower level of rhodopsin expression and has higher levels of oxidative stress. Using a slightly different differentiation protocol and using integration-free hiPSC, this research team and others confirm that patient-specific rod cells may recapitulate RP features *in vitro* and could be appropriate model to study retinal degenerative diseases<sup>[67,68]</sup>. hiPSC-derived retinal precursors were also used to identify a likely disease-causing homozygous mutation in a gene that had not been previously reported to be associated with disease<sup>[50]</sup>. In a more recent study, the same group combined Next-Generation and Sanger sequencing to identify disease-causing USH2A (responsible for Usher syndrome type I) mutations in an adult patient with autosomal recessive RP<sup>[51]</sup>. Moreover, by grafting the mutated photoreceptors into mice model of the disease, they showed that the mutation might act *via* post-developmental photoreceptor degeneration rather than during development.

Finally, hPSCs could model systems to study retinal development and implication of specific transcription factors. Phillips *et al.*<sup>[69]</sup> (2014) generate hiPSC from a patient with a mutation in the transcription factor visual systems homeobox 2 (VSX2 also known as CHX10) homeodomain. They showed that, using differentiation protocols in order to obtain optical vesicles (OV), mutated hiPSC-OV failed to produce bipolar cells and demonstrated delayed photoreceptor maturation<sup>[69]</sup>.

All these studies highlight the potential of retinal cells derived from hPSCs to help to identify pathophysiological pathway for targeted development of therapies and decipher key factors in retinal development.

### GENE EDITION AS A NEW TOOL TO ACCESS TO HUMAN DISEASE CELLULAR MODELS

The identification and functional validation of sequence variants affecting diverse human traits, including disease susceptibility, is essential for the understanding of human biology and disease mechanisms. Considering the limited number of individual lines often used to model disease mechanisms and the high incidence of line-to-

line variations, the possibility of wrongly attributing to a disease-causing mutation a phenotype that is in fact the result of the uneven distribution of such alterations in control and diseased groups needs to be considered seriously. When disease-specific hPSCs are used to identify novel aspects of disease mechanisms, rather than simply to replicate already known pathological features, internal (isogenic) control experiments such as genetic correction or more classical gain- and loss-of-function experiments are extremely valuable<sup>[24]</sup>. While classical gene-targeting technology *via* homologous recombination in mouse embryonic stem cells has proven a powerful tool to dissect gene function<sup>[70-72]</sup>, this approach has been quite inefficient when applied to hPSCs<sup>[73]</sup>. The development of site-specific TALEN- or CRISPR-based genome editing approaches is proving to have great utility for endogenous gene correction in many cell lines<sup>[74-76]</sup>, including hPSCs<sup>[77-79]</sup>. A major advantage of these approaches is that unlike exogenous gene addition in which promoter strength and multiplicity of infection may require patient-specific adjustment, TALEN- and CRISPR-mediated corrections have the advantage that the gene remains under the control of the endogenous promoter. Acting as "DNA scissors", they induce double strand breaks (DSB) at desired genomic loci, triggering the endogenous DNA repair machinery. Processing of DSB by the error-prone nonhomologous end-joining pathway leads to small insertions and deletions (Indels) useful for generating loss-of-function mutations, whereas error-free homology directed repair enables targeted integration of exogenously provided DNA sequences for introducing precise nucleotide alterations or knocking reporters.

Unlike other editing tools, the guide RNAs used for CRISPR/Cas9-based genome editing can be generated relatively easily. The guide RNAs used in this system requires the presence of an adjacent motif, downstream of a 17-20-nucleotide DNA target, termed the protospacer<sup>[80-84]</sup>. Complementary guide oligonucleotides can be synthesized, annealed and subsequently ligated into a bicistronic vector-expressing scaffold RNA and a modified Cas9 nuclease optimized for efficient targeting of human cells<sup>[85,86]</sup>. Recent study has shown that by combining these gene editing tools (*i.e.*, TALEN and CRISPR) they have developed a genome-engineering platform, named iCRISPR, that enable rapid and highly efficient biallelic knockout hPSCs for loss-of-function studies, as well as homozygous knocking hPSCs with specific nucleotide alterations<sup>[87]</sup>.

Another strategy could be to use adenovirus in order to replace the mutated gene in hiPSC derived from patients. This was done by Yoshida *et al.*<sup>[68]</sup>, who generated hiPSC from somatic cell of an RP patient carrying a heterozygous mutation in the rhodopsin gene<sup>[88]</sup>. They observed that rod cells had reduced survival rate. To confirm that the phenotype was due to the expression of mutant rhodopsin and not by genetic polymorphism, they used helper-dependent adenoviral vector to replace the mutated gene and



reverted the phenotype observed. Moreover, replacing the wild-type gene reconstructed the pathological condition<sup>[68]</sup>.

## hPSCs FOR THE VALIDATION OF THERAPEUTIC INTERVENTIONS

A number of potential therapeutic interventions are strictly specific to human cells or tissues, such as biotherapies based upon targeting human gene/mutation with RNA interference, exon skipping, and therapeutic antibodies. With these approaches, the uses of classic animal models of RP for experimental or preclinical validation are often not enough informative. Obtaining sufficient cellular material to conduct a wide range of tests, from the initial assessment of therapeutic claim to the final quality of assurance process before clinical batch release, can be challenging.

Some diseases are so rare that it is not economically possible to bring a treatment through the regulatory gauntlet and into clinical availability. One possibility to overcome this issue would be to use cells or tissues created from a patient's own cells to test the molecular efficacy of a viral-mediated gene therapy, including the optimal level of expression, and then deliver that therapy to one eye in a compassionate use manner. Moreover, some genes have a very narrow range of therapeutic dose such that overexpression could be as harmful as under expression<sup>[89]</sup>. The first human gene therapy trial for a retinal disease was performed in 2008 in patients with Leber congenital amaurosis (LCA), a congenital blindness resulting from the breakdown of an important metabolic pathway in the RPE but with long-lasting preservation of the photoreceptors. LCA arises due to mutations in the RPE-specific gene, *RPE65*<sup>[90]</sup>. Prior to clinical trials, preclinical trials are usually performed on animal models. Many mouse models have been generated that are defective for a gene causing a specific retinal dystrophy, however, certain of these models have proven asymptomatic<sup>[91]</sup> or lethal<sup>[92]</sup>. Moreover, in general, the mouse eye poorly mimics the situation in the human eye due to its small size and structure. Larger animal models are more appropriate for testing the biodistribution of a gene therapy vector and for ascertaining long-term efficiency and safety. The dog eye is particularly suitable as it resembles the human eye, except for the absence of a macula and foveal pit, in size, and many retinal diseases in man have canine counterparts<sup>[93]</sup>. However, for certain diseases, the identification of a corresponding canine model has proven elusive. Thus, taken together, for a growing number of diseases (and this holds true for disorders affecting other tissues), human cell culture is becoming an essential complement to animal disease research<sup>[94]</sup>. The results obtained from gene therapy studies in a human system, coupled to *in vivo* studies using animal models, could lead more rapidly to preclinical gene therapy studies indeed a phase I clinical trial.

For pigmentary retinopathies for which an appropriate animal model does not exist, like choroideremia<sup>[95]</sup> evaluating the biochemical restoration of a normal cellular phenotype after gene therapy could provide complementary approaches to *in vivo* animal models that investigate systemic effects that are essentially beyond the reach of *in vitro* studies<sup>[96]</sup>.

## hPSCs FOR DRUG DISCOVERY

Many drugs that work in animal models have not performed well in human clinical trials<sup>[97,98]</sup>. This discrepancy could be attributable among other proposed reasons to species variation or incomplete phenotype recapitulation. Numerous studies have now showed that retinal cells derived from hPSCs are closely enough representatives of their *in vivo* counterparts<sup>[60,99]</sup> that they could be used for identifying and evaluate pharmacological agents capable of mitigating degenerative retinal diseases. High-throughput drug screens of differentiated hPSCs-derived cells have been suggested as a means for drug discovery and personalized medicine<sup>[100-102]</sup>. To date, there have been few publications looking at using hPSCs for drug discovery in retinal diseases. Meyer *et al*<sup>[47]</sup> reported the restoration of OAT (Ornithine Amino Transferase) enzyme activity in gyrate atrophy hiPSC-RPE following vitamin B6 treatment. In their study, Jin *et al*<sup>[66]</sup> showed that treatment of the rhodopsin-positive cells (photoreceptors) with  $\alpha$ -tocopherol led to a significant preservation of these cells in RP9 cell line. This study provides proof of principle that hPSC technology is useful in screening for drug responses across numerous related, yet genetically distinct retinal diseases. Even if, major advances have been made to differentiate retinal progenitors from hPSCs, the differentiation effect could vary from various hPSC lines. In a very elegant study, Ferrer *et al*<sup>[103]</sup> developed highly efficient methods to differentiate, expand and authenticated iPSC-RPE in parallel to their use in high-throughput assay. The RPE cells were derived from iPSCs and grown in 96- and 384-well plates. They demonstrate differential expression of eight genes in iPSCs, iPSC-derived RPE at two differentiation stages, and primary human RPE using this multiplex assay. This assay provides the basis to screen for compounds that improve RPE function and/or maturation and target disease pathways<sup>[103]</sup>.

## CONCLUSION

Regenerative medicine based on stem cells is likely to make important contributions to the cure of human blindness. This is the main focus of the public creating both fears and hopes. However, it remains only the visible part of the iceberg. Indeed, as described in this review, hPSCs are essential to model disease specific conditions closed to the patient context. They contribute to the development of pharmaceutical compounds that will be identified for efficacy in disease



specific cellular of hPSCs derivatives and for which toxicity will be tested in the same cells. Moreover, hPSCs provides valuable complement to animal models by either highlighting species-specific differences or further validating the observations already made in rodents or larger animals.

## REFERENCES

- de Jong PT. Age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2006; **355**: 1474-1485 [PMID: 17021323 DOI: 10.1056/NEJMra062326]
- Jager RD, Mielke WF, Miller JW. Age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2008; **358**: 2606-2617 [PMID: 18550876 DOI: 10.1056/NEJMra0801537]
- Zarbin MA. Current concepts in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 2004; **122**: 598-614 [PMID: 15078679 DOI: 10.1001/archoph.122.4.598]
- Sparrow JR, Hicks D, Hamel CP. The retinal pigment epithelium in health and disease. *Curr Mol Med* 2010; **10**: 802-823 [PMID: 21091424]
- He Y, Zhang Y, Liu X, Ghazaryan E, Li Y, Xie J, Su G. Recent advances of stem cell therapy for retinitis pigmentosa. *Int J Mol Sci* 2014; **15**: 14456-14474 [PMID: 25141102 DOI: 10.3390/ijms150814456]
- Cideciyan AV, Jacobson SG, Beltran WA, Sumaroka A, Swider M, Iwabe S, Roman AJ, Olivares MB, Schwartz SB, Komáromy AM, Hauswirth WW, Aguirre GD. Human retinal gene therapy for Leber congenital amaurosis shows advancing retinal degeneration despite enduring visual improvement. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; **110**: E517-E525 [PMID: 23341635 DOI: 10.1073/pnas.1218933110]
- Wert KJ, Davis RJ, Sancho-Pelluz J, Nishina PM, Tsang SH. Gene therapy provides long-term visual function in a pre-clinical model of retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet* 2013; **22**: 558-567 [PMID: 23108158 DOI: 10.1093/hmg/ddt466]
- Conlon TJ, Deng WT, Erger K, Cossette T, Pang JJ, Ryals R, Clément N, Cleaver B, McDoom I, Boye SE, Peden MC, Sherwood MB, Abernathy CR, Alkuraya FS, Boye SL, Hauswirth WW. Preclinical potency and safety studies of an AAV2-mediated gene therapy vector for the treatment of MERTK associated retinitis pigmentosa. *Hum Gene Ther Clin Dev* 2013; **24**: 23-28 [PMID: 23692380 DOI: 10.1089/humc.2013.037]
- Dinculescu A, Min SH, Deng WT, Li Q, Hauswirth WW. Gene therapy in the rd6 mouse model of retinal degeneration. *Adv Exp Med Biol* 2014; **801**: 711-718 [PMID: 24664762 DOI: 10.1007/978-1-4614-3209-8\_89]
- Millington-Ward S, Chadderton N, O'Reilly M, Palfi A, Goldmann T, Kilty C, Humphries M, Wolfrum U, Bennett J, Humphries P, Kenna PF, Farrar GJ. Suppression and replacement gene therapy for autosomal dominant disease in a murine model of dominant retinitis pigmentosa. *Mol Ther* 2011; **19**: 642-649 [PMID: 21224835 DOI: 10.1038/mt.2010.293]
- Mao H, Gorbatyuk MS, Hauswirth WW, Lewin AS. Gene delivery of wild-type rhodopsin rescues retinal function in an autosomal dominant retinitis pigmentosa mouse model. *Adv Exp Med Biol* 2012; **723**: 199-205 [PMID: 2218334 DOI: 10.1007/978-1-4614-6310-2\_27]
- Carter-Dawson LD, LaVail MM. Rods and cones in the mouse retina. II. Autoradiographic analysis of cell generation using tritiated thymidine. *J Comp Neurol* 1979; **188**: 263-272 [PMID: 500859 DOI: 10.1002/cne.901880205]
- MacLaren RE, Pearson RA, MacNeil A, Douglas RH, Salt TE, Akimoto M, Swaroop A, Sowden JC, Ali RR. Retinal repair by transplantation of photoreceptor precursors. *Nature* 2006; **444**: 203-207 [PMID: 17093405 DOI: 10.1038/nature05161]
- Bartsch U, Oriyakhel W, Kenna PF, Linke S, Richard G, Petrowitz B, Humphries P, Farrar GJ, Ader M. Retinal cells integrate into the outer nuclear layer and differentiate into mature photoreceptors after subretinal transplantation into adult mice. *Exp Eye Res* 2008; **86**: 691-700 [PMID: 18329018 DOI: 10.1016/j.exer.2008.01.018]
- Pearson RA, Barber AC, Rizzi M, Hippert C, Xue T, West EL, Duran Y, Smith AJ, Chuang JZ, Azam SA, Luhmann UF, Benucci A, Sung CH, Bainbridge JW, Carandini M, Yau KW, Sowden JC, Ali RR. Restoration of vision after transplantation of photoreceptors. *Nature* 2012; **485**: 99-103 [PMID: 22522934 DOI: 10.1038/nature10997]
- Warre-Cornish K, Barber AC, Sowden JC, Ali RR, Pearson RA. Migration, integration and maturation of photoreceptor precursors following transplantation in the mouse retina. *Stem Cells Dev* 2014; **23**: 941-954 [PMID: 24328605 DOI: 10.1089/scd.2013.0471]
- Schmitt S, Aftab U, Jiang C, Redenti S, Klassen H, Miljan E, Sinden J, Young M. Molecular characterization of human retinal progenitor cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; **50**: 5901-5908 [PMID: 19553622 DOI: 10.1167/iovs.08-3067]
- Luo J, Baranov P, Patel S, Ouyang H, Quach J, Wu F, Qiu A, Luo H, Hicks C, Zeng J, Zhu J, Lu J, Sfeir N, Wen C, Zhang M, Reade V, Patel S, Sinden J, Sun X, Shaw P, Young M, Zhang K. Human retinal progenitor cell transplantation preserves vision. *J Biol Chem* 2014; **289**: 6362-6371 [PMID: 24407289 DOI: 10.1074/jbc.M113.513713]
- Baranov PY, Tucker BA, Young MJ. Low-oxygen culture conditions extend the multipotential properties of human retinal progenitor cells. *Tissue Eng Part A* 2014; **20**: 1465-1475 [PMID: 24320879 DOI: 10.1089/ten.TEA.2013.0361]
- Aftab U, Jiang C, Tucker B, Kim JY, Klassen H, Miljan E, Sinden J, Young M. Growth kinetics and transplantation of human retinal progenitor cells. *Exp Eye Res* 2009; **89**: 301-310 [PMID: 19524569 DOI: 10.1016/j.exer.2009.03.025]
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; **282**: 1145-1147 [PMID: 9804556]
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; **131**: 861-872 [PMID: 18035408 DOI: 10.1016/j.cell.2007.11.019]
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; **318**: 1917-1920 [PMID: 18029452 DOI: 10.1126/science.1151526]
- Perrier A, Peschanski M. How can human pluripotent stem cells help decipher and cure Huntington's disease? *Cell Stem Cell* 2012; **11**: 153-161 [PMID: 22862942 DOI: 10.1016/j.stem.2012.07.015]
- Tiscornia GC, Moretta R, Argenziano MA, Amorena CE, Garcia Gras EA. Inhibition of connexin 43 in cardiac muscle during intense physical exercise. *Scand J Med Sci Sports* 2014; **24**: 336-344 [PMID: 23206241 DOI: 10.1111/sms.12017]
- Hu BY, Weick JP, Yu J, Ma LX, Zhang XQ, Thomson JA, Zhang SC. Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; **107**: 4335-4340 [PMID: 20160098 DOI: 10.1073/pnas.0910012107]
- Mahmoudi S, Brunet A. Aging and reprogramming: a two-way street. *Curr Opin Cell Biol* 2012; **24**: 744-756 [PMID: 23146768 DOI: 10.1016/j.ceb.2012.10.004]
- Liao J, Wu Z, Wang Y, Cheng L, Cui C, Gao Y, Chen T, Rao L, Chen S, Jia N, Dai H, Xin S, Kang J, Pei G, Xiao L. Enhanced efficiency of generating induced pluripotent stem (iPS) cells from human somatic cells by a combination of six transcription factors. *Cell Res* 2008; **18**: 600-603 [PMID: 18414447 DOI: 10.1038/cr.2008.51]
- Judson RL, Babiarz JE, Venere M, Blelloch R. Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nat Biotechnol* 2009; **27**: 459-461 [PMID: 19363475 DOI: 10.1038/nbt.1535]
- Mali P, Ye Z, Chou BK, Yen J, Cheng L. An improved method for generating and identifying human induced pluripotent stem cells. *Methods Mol Biol* 2010; **636**: 191-205 [PMID: 20336524 DOI:

- 10.1007/978-1-60761-691-7\_12]
- 31 **Cheng Z, Ito S, Nishio N, Xiao H, Zhang R, Suzuki H, Okawa Y, Murohara T, Isobe K.** Establishment of induced pluripotent stem cells from aged mice using bone marrow-derived myeloid cells. *J Mol Cell Biol* 2011; **3**: 91-98 [PMID: 21228011 DOI: 10.1093/jmcb/mjq044]
- 32 **Niibe K, Kawamura Y, Araki D, Morikawa S, Miura K, Suzuki S, Shimamura S, Sunabori T, Mabuchi Y, Nagai Y, Nakagawa T, Okano H, Matsuzaki Y.** Purified mesenchymal stem cells are an efficient source for iPS cell induction. *PLoS One* 2011; **6**: e17610 [PMID: 21412425 DOI: 10.1371/journal.pone.0017610]
- 33 **Szablowska-Gadomska I, Zayat V, Buzanska L.** Influence of low oxygen tensions on expression of pluripotency genes in stem cells. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 2011; **71**: 86-93 [PMID: 21499329]
- 34 **Zhang F, Citra F, Wang DA.** Prospects of induced pluripotent stem cell technology in regenerative medicine. *Tissue Eng Part B Rev* 2011; **17**: 115-124 [PMID: 21210760 DOI: 10.1089/ten.TEB.2010.0549]
- 35 **Li Z, Rana TM.** A kinase inhibitor screen identifies small-molecule enhancers of reprogramming and iPS cell generation. *Nat Commun* 2012; **3**: 1085 [PMID: 2301139 DOI: 10.1038/ncomms2059]
- 36 **Lin Y, Cheng Z, Yang Z, Zheng J, Lin T.** DNp73 improves generation efficiency of human induced pluripotent stem cells. *BMC Cell Biol* 2012; **13**: 9 [PMID: 22449255 DOI: 10.1186/1471-2121-13-9]
- 37 **Liu Y, Cheng D, Li Z, Gao X, Wang H.** The gene expression profiles of induced pluripotent stem cells (iPSCs) generated by a non-integrating method are more similar to embryonic stem cells than those of iPSCs generated by an integrating method. *Genet Mol Biol* 2012; **35**: 693-700 [PMID: 23055811 DOI: 10.1590/S1415-47572012005000050]
- 38 **Okita K, Yamakawa T, Matsumura Y, Sato Y, Amano N, Watanabe A, Goshima N, Yamanaka S.** An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells. *Stem Cells* 2013; **31**: 458-466 [PMID: 23193063 DOI: 10.1002/stem.1293]
- 39 **Zhang Z, Wu WS.** Sodium butyrate promotes generation of human induced pluripotent stem cells through induction of the miR302/367 cluster. *Stem Cells Dev* 2013; **22**: 2268-2277 [PMID: 23534850 DOI: 10.1089/scd.2012.0650]
- 40 **Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garcia E, Consiglio A, Gonzalez F, Vassena R, Bilić J, Pekarik V, Tiscornia G, Edel M, Boué S, Izquierdo Belmonte JC.** Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* 2008; **26**: 1276-1284 [PMID: 18931654 DOI: 10.1038/nbt.1503]
- 41 **Barrero MJ, Berdasco M, Paramonov I, Bilić J, Vitaloni M, Esteller M, Izquierdo Belmonte JC.** DNA hypermethylation in somatic cells correlates with higher reprogramming efficiency. *Stem Cells* 2012; **30**: 1696-1702 [PMID: 22653871 DOI: 10.1002/stem.1138]
- 42 **Tiscornia G, Vivas EL, Izquierdo Belmonte JC.** Diseases in a dish: modeling human genetic disorders using induced pluripotent cells. *Nat Med* 2011; **17**: 1570-1576 [PMID: 22146428 DOI: 10.1038/nm.2504]
- 43 **Osakada F, Ikeda H, Mandai M, Wataya T, Watanabe K, Yoshimura N, Akaike A, Sasai Y, Takahashi M.** Toward the generation of rod and cone photoreceptors from mouse, monkey and human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2008; **26**: 215-224 [PMID: 18246062 DOI: 10.1038/nbt.1384]
- 44 **Osakada F, Ikeda H, Sasai Y, Takahashi M.** Stepwise differentiation of pluripotent stem cells into retinal cells. *Nat Protoc* 2009; **4**: 811-824 [PMID: 19444239 DOI: 10.1038/nprot.2009.51]
- 45 **Hirami Y, Osakada F, Takahashi K, Okita K, Yamanaka S, Ikeda H, Yoshimura N, Takahashi M.** Generation of retinal cells from mouse and human induced pluripotent stem cells. *Neurosci Lett* 2009; **458**: 126-131 [PMID: 19379795 DOI: 10.1016/j.neulet.2009.04.035]
- 46 **Meyer JS, Shearer RL, Capowski EE, Wright LS, Wallace KA, McMillan EL, Zhang SC, Gamm DM.** Modeling early retinal development with human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 16698-16703 [PMID: 19706890 DOI: 10.1073/pnas.0905245106]
- 47 **Meyer JS, Howden SE, Wallace KA, Verhoeven AD, Wright LS, Capowski EE, Pinilla I, Martin JM, Tian S, Stewart R, Pattnaik B, Thomson JA, Gamm DM.** Optic vesicle-like structures derived from human pluripotent stem cells facilitate a customized approach to retinal disease treatment. *Stem Cells* 2011; **29**: 1206-1218 [PMID: 21678528 DOI: 10.1002/stem.674]
- 48 **Lamba DA, Karl MO, Ware CB, Reh TA.** Efficient generation of retinal progenitor cells from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 12769-12774 [PMID: 16908856 DOI: 10.1073/pnas.0601990103]
- 49 **Lamba DA, McUsic A, Hirata RK, Wang PR, Russell D, Reh TA.** Generation, purification and transplantation of photoreceptors derived from human induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 2010; **5**: e8763 [PMID: 20098701 DOI: 10.1371/journal.pone.0008763]
- 50 **Tucker BA, Schetz TE, Mullins RF, DeLuca AP, Hoffmann JM, Johnston RM, Jacobson SG, Sheffield VC, Stone EM.** Exome sequencing and analysis of induced pluripotent stem cells identify the cilia-related gene male germ cell-associated kinase (MAK) as a cause of retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**: E569-E576 [PMID: 21825139 DOI: 10.1073/pnas.1108918108]
- 51 **Tucker BA, Anfinson KR, Mullins RF, Stone EM, Young MJ.** Use of a synthetic xeno-free culture substrate for induced pluripotent stem cell induction and retinal differentiation. *Stem Cells Transl Med* 2013; **2**: 16-24 [PMID: 23283489 DOI: 10.5966/sctm.2012-0040]
- 52 **Nakano T, Ando S, Takata N, Kawada M, Muguruma K, Sekiguchi K, Saito K, Yonemura S, Eiraku M, Sasai Y.** Self-formation of optic cups and storeable stratified neural retina from human ESCs. *Cell Stem Cell* 2012; **10**: 771-785 [PMID: 22704518 DOI: 10.1016/j.stem.2012.05.009]
- 53 **Phillips MJ, Wallace KA, Dickerson SJ, Miller MJ, Verhoeven AD, Martin JM, Wright LS, Shen W, Capowski EE, Percin EF, Perez ET, Zhong X, Canto-Soler MV, Gamm DM.** Blood-derived human iPS cells generate optic vesicle-like structures with the capacity to form retinal laminae and develop synapses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; **53**: 2007-2019 [PMID: 22410558 DOI: 10.1167/iovs.11-9313]
- 54 **Sasai Y, Eiraku M, Suga H.** In vitro organogenesis in three dimensions: self-organising stem cells. *Development* 2012; **139**: 4111-4121 [PMID: 23093423 DOI: 10.1242/dev.079590]
- 55 **Mekala SR, Vauthini V, Nagarajan U, Maddileti S, Gaddipati S, Mariappan I.** Derivation, characterization and retinal differentiation of induced pluripotent stem cells. *J Biosci* 2013; **38**: 123-134 [PMID: 23385820]
- 56 **Mellough CB, Sernagor E, Moreno-Gimeno I, Steel DH, Lako M.** Efficient stage-specific differentiation of human pluripotent stem cells toward retinal photoreceptor cells. *Stem Cells* 2012; **30**: 673-686 [PMID: 22267304 DOI: 10.1002/stem.1037]
- 57 **Boucherie C, Mukherjee S, Henckaerts E, Thrasher AJ, Sowden JC, Ali RR.** Brief report: self-organizing neuroepithelium from human pluripotent stem cells facilitates derivation of photoreceptors. *Stem Cells* 2013; **31**: 408-414 [PMID: 23132794 DOI: 10.1002/stem.1268]
- 58 **Sridhar A, Steward MM, Meyer JS.** Nonxenogenic growth and retinal differentiation of human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med* 2013; **2**: 255-264 [PMID: 23512959 DOI: 10.5966/sctm.2012-0101]
- 59 **Decembrini S, Koch U, Radtke F, Moulin A, Arsenijevic Y.** Derivation of traceable and transplantable photoreceptors from mouse embryonic stem cells. *Stem Cell Reports* 2014; **2**: 853-865 [PMID: 24936471 DOI: 10.1016/j.scr.2014.04.010]
- 60 **Reichman S, Terray A, Slembruck A, Nanteau C, Orieux G, Habeler W, Nandrot EF, Sahel JA, Monville C, Goureau O.** From confluent human iPS cells to self-forming neural retina and retinal pigmented epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; **111**: 8518-8523 [PMID: 24912154 DOI: 10.1073/pnas.1324212111]
- 61 **Rowland TJ, Buchholz DE, Clegg DO.** Pluripotent human stem cells for the treatment of retinal disease. *J Cell Physiol* 2012; **227**: 457-466 [PMID: 21520078 DOI: 10.1002/jcp.22814]
- 62 **Carr AJ, Vugler A, Lawrence J, Chen LL, Ahmado A, Chen FK, Semo M, Gias C, da Cruz L, Moore HD, Walsh J, Coffey PJ.**

- Molecular characterization and functional analysis of phagocytosis by human embryonic stem cell-derived RPE cells using a novel human retinal assay. *Mol Vis* 2009; **15**: 283-295 [PMID: 19204785]
- 63 **Liao JL**, Yu J, Huang K, Hu J, Diemer T, Ma Z, Dvash T, Yang XJ, Travis GH, Williams DS, Bok D, Fan G. Molecular signature of primary retinal pigment epithelium and stem-cell-derived RPE cells. *Hum Mol Genet* 2010; **19**: 4229-4238 [PMID: 2079080 DOI: 10.1093/hmg/ddq341]
- 64 **Maminishkis A**, Chen S, Jalickee S, Banzon T, Shi G, Wang FE, Ehal T, Hammer JA, Miller SS. Confluent monolayers of cultured human fetal retinal pigment epithelium exhibit morphology and physiology of native tissue. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; **47**: 3612-3624 [PMID: 16877436 DOI: 10.1167/iovs.05-1622]
- 65 **Singh R**, Phillips MJ, Kuai D, Meyer J, Martin JM, Smith MA, Perez ET, Shen W, Wallace KA, Capowski EE, Wright LS, Gamma DM. Functional analysis of serially expanded human iPS cell-derived RPE cultures. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013; **54**: 6767-6778 [PMID: 24030465 DOI: 10.1167/iovs.13-11943]
- 66 **Jin ZB**, Okamoto S, Osakada F, Homma K, Assawachananont J, Hirami Y, Iwata T, Takahashi M. Modeling retinal degeneration using patient-specific induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 2011; **6**: e17084 [PMID: 21347327 DOI: 10.1371/journal.pone.0017084]
- 67 **Jin ZB**, Takahashi M. Generation of retinal cells from pluripotent stem cells. *Prog Brain Res* 2012; **201**: 171-181 [PMID: 23186714 DOI: 10.1016/B978-0-444-59544-7.00008-1]
- 68 **Yoshida T**, Ozawa Y, Suzuki K, Yuki K, Ohyama M, Akamatsu W, Matsuzaki Y, Shimmura S, Mitani K, Tsubota K, Okano H. The use of induced pluripotent stem cells to reveal pathogenic gene mutations and explore treatments for retinitis pigmentosa. *Mol Brain* 2014; **7**: 45 [PMID: 24935155 DOI: 10.1186/1756-6606-7-45]
- 69 **Phillips MJ**, Perez ET, Martin JM, Reshel ST, Wallace KA, Capowski EE, Singh R, Wright LS, Clark EM, Barney PM, Stewart R, Dickerson SJ, Miller MJ, Percy EF, Thomson JA, Gamma DM. Modeling human retinal development with patient-specific induced pluripotent stem cells reveals multiple roles for visual system homeobox 2. *Stem Cells* 2014; **32**: 1480-1492 [PMID: 24532057 DOI: 10.1002/stem.1667]
- 70 **Capecchi MR**. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nat Rev Genet* 2005; **6**: 507-512 [PMID: 15931173 DOI: 10.1038/nrg1619]
- 71 **Thomas KR**, Capecchi MR. Targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; **51 Pt 2**: 1101-1113 [PMID: 3472755]
- 72 **Thomas KR**, Folger KR, Capecchi MR. High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell* 1986; **44**: 419-428 [PMID: 3002636]
- 73 **Hockemeyer D**, Jaenisch R. Gene targeting in human pluripotent cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2010; **75**: 201-209 [PMID: 21209393 DOI: 10.1101/sqb.2010.75.021]
- 74 **Hockemeyer D**, Wang H, Kiani S, Lai CS, Gao Q, Cassidy JP, Cost GJ, Zhang L, Santiago Y, Miller JC, Zeitzer B, Cherone JM, Meng X, Hinkley SJ, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, Jaenisch R. Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. *Nat Biotechnol* 2011; **29**: 731-734 [PMID: 21738127 DOI: 10.1038/nbt.1927]
- 75 **Ding Q**, Lee YK, Schaefer EA, Peters DT, Veres A, Kim K, Kuperwasser N, Motola DL, Meissner TB, Hendriks WT, Trevisan M, Gupta RM, Moisan A, Banks E, Friesen M, Schinzel RT, Xia F, Tang A, Xia Y, Figueiroa E, Wann A, Ahfeldt T, Daburon L, Zhang F, Rubin LL, Peng LF, Chung RT, Musunuru K, Cowan CA. A TALEN genome-editing system for generating human stem cell-based disease models. *Cell Stem Cell* 2013; **12**: 238-251 [PMID: 23246482 DOI: 10.1016/j.stem.2012.11.011]
- 76 **Wang H**, Hu YC, Markoulaki S, Welstead GG, Cheng AW, Shivalila CS, Pyntikova T, Dadon DB, Voytas DF, Bogdanov AJ, Page DC, Jaenisch R. TALEN-mediated editing of the mouse Y chromosome. *Nat Biotechnol* 2013; **31**: 530-532 [PMID: 23666012 DOI: 10.1038/nbt.2595]
- 77 **Joung JK**, Sander JD. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; **14**: 49-55 [PMID: 23169466 DOI: 10.1038/nrm3486]
- 78 **Ran D**, Shia WJ, Lo MC, Fan JB, Knorr DA, Ferrell PI, Ye Z, Yan M, Cheng L, Kaufman DS, Zhang DE. RUNX1a enhances hematopoietic lineage commitment from human embryonic stem cells and inducible pluripotent stem cells. *Blood* 2013; **121**: 2882-2890 [PMID: 23372166 DOI: 10.1182/blood-2012-08-451641]
- 79 **Urnov FD**, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet* 2010; **11**: 636-646 [PMID: 20717154 DOI: 10.1038/nrg2842]
- 80 **Cong L**, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 2013; **339**: 819-823 [PMID: 23287718 DOI: 10.1126/science.1231143]
- 81 **Mali P**, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 2013; **339**: 823-826 [PMID: 23287722 DOI: 10.1126/science.1232033]
- 82 **Cho SW**, Kim S, Kim JM, Kim JS. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nat Biotechnol* 2013; **31**: 230-232 [PMID: 23360966 DOI: 10.1038/nbt.2507]
- 83 **Fu Y**, Sander JD, Reyon D, Cascio VM, Joung JK. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat Biotechnol* 2014; **32**: 279-284 [PMID: 24463574 DOI: 10.1038/nbt.2808]
- 84 **Maeder ML**, Linder SJ, Cascio VM, Fu Y, Ho QH, Joung JK. CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nat Methods* 2013; **10**: 977-979 [PMID: 23892898 DOI: 10.1038/nmeth.2598]
- 85 **Xie K**, Zhang J, Yang Y. Genome-wide prediction of highly specific guide RNA spacers for CRISPR-Cas9-mediated genome editing in model plants and major crops. *Mol Plant* 2014; **7**: 923-926 [PMID: 24482433 DOI: 10.1093/mp/suu009]
- 86 **Yang L**, Mali P, Kim-Kiselak C, Church G. CRISPR-Cas-mediated targeted genome editing in human cells. *Methods Mol Biol* 2014; **1114**: 245-267 [PMID: 24557908 DOI: 10.1007/978-1-62703-761-7\_16]
- 87 **González F**, Zhu Z, Shi ZD, Lelli K, Verma N, Li QV, Huangfu D. An iCRISPR platform for rapid, multiplexable, and inducible genome editing in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2014; **15**: 215-226 [PMID: 24931489 DOI: 10.1016/j.stem.2014.05.018]
- 88 **Saga M**, Mashima Y, Akeo K, Oguchi Y, Kudoh J, Shimizu N. Autosomal dominant retinitis pigmentosa. A mutation in codon 181 (Glu-> Lys) of the rhodopsin gene in a Japanese family. *Ophthalmic Genet* 1994; **15**: 61-67 [PMID: 7850270]
- 89 **Seo S**, Mullins RF, Dumitrescu AV, Bhattarai S, Gratje D, Wang K, Stone EM, Sheffield V, Drack AV. Subretinal gene therapy of mice with Bardet-Biedl syndrome type 1. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013; **54**: 6118-6132 [PMID: 23900607 DOI: 10.1167/iovs.13-11673]
- 90 **Marlinens F**, Barcil C, Griffon JM, Zrenner E, Amalric P, Eliaou C, Liu SY, Harris E, Redmond TM, Amaud B, Clastres M, Hamel CP. Mutations in RPE65 cause Leber's congenital amaurosis. *Nat Genet* 1997; **17**: 139-141 [PMID: 9326927 DOI: 10.1038/ng1097-139]
- 91 **Williams DS**. Usher syndrome: animal models, retinal function of Usher proteins, and prospects for gene therapy. *Vision Res* 2008; **48**: 433-441 [PMID: 17936325 DOI: 10.1016/j.visres.2007.08.015]
- 92 **van den Hurk JA**, Hendriks W, van de Pol DJ, Oerlemans F, Jaissle G, Rüther K, Kohler K, Hartmann J, Zrenner E, van Bokhoven H, Wieringa B, Ropers HH, Cremers FP. Mouse choroideremia gene mutation causes photoreceptor cell degeneration and is not transmitted through the female germline. *Hum Mol Genet* 1997; **6**: 851-858 [PMID: 9175730]
- 93 **Tsai KL**, Clark LA, Murphy KE. Understanding hereditary diseases using the dog and human as companion model systems. *Mamm Genome* 2007; **18**: 444-451 [PMID: 17653794 DOI: 10.1007/s00335-007-9037-1]
- 94 **Seymour LW**, Fisher KD. Preclinical screening of gene therapy in human tissues. *Hum Gene Ther* 2009; **20**: 291-292 [PMID: 19348049]

Ben M'Barek K *et al.* Use of hPSCs to study and treat retinopathies

- 95 **Kalatzis V**, Hamel CP, MacDonald IM; First International Choroideremia Research Symposium. Choroideremia: towards a therapy. *Am J Ophthalmol* 2013; **156**: 433-437.e3 [PMID: 23810476 DOI: 10.1016/j.ajo.2013.05.009]
- 96 **Hippert C**, Ibanes S, Serrafrice N, Court F, Malecaze F, Kremer EJ, Kalatzis V. Corneal transduction by intra-stromal injection of AAV vectors *in vivo* in the mouse and *ex vivo* in human explants. *PLoS One* 2012; **7**: e35318 [PMID: 22523585 DOI: 10.1371/journal.pone.0035318]
- 97 **Perel P**, Roberts I, Sena E, Wheble P, Briscoe C, Sandercock P, Macleod M, Mignini LE, Jayaram P, Khan KS. Comparison of treatment effects between animal experiments and clinical trials: systematic review. *BMJ* 2007; **334**: 197 [PMID: 17175568 DOI: 10.1136/bmj.39048.407928.BE]
- 98 **Savitz SI**. A critical appraisal of the NXY-059 neuroprotection studies for acute stroke: a need for more rigorous testing of neuroprotective agents in animal models of stroke. *Exp Neurol* 2007; **205**: 20-25 [PMID: 17408618 DOI: 10.1016/j.expneurol.2007.03.003]
- 99 **Lustremant C**, Habeler W, Plancheron A, Goureau O, Grenot L, de la Grange P, Audo I, Nandro EF, Monville C. Human induced pluripotent stem cells as a tool to model a form of Leber congenital amaurosis. *Cell Reprogram* 2013; **15**: 233-246 [PMID: 23663011 DOI: 10.1089/cell.2012.0076]
- 100 **Inoue H**, Yamanaka S. The use of induced pluripotent stem cells in drug development. *Clin Pharmacol Ther* 2011; **89**: 655-661 [PMID: 21430656 DOI: 10.1038/cpt.2011.38]
- 101 **Maury Y**, Gauthier M, Peschanski M, Martinat C. Human pluripotent stem cells for disease modelling and drug screening. *Bioessays* 2012; **34**: 61-71 [PMID: 22038777 DOI: 10.1002/bies.201100071]
- 102 **Charbord J**, Poydenot P, Bonnefond C, Feyeux M, Casagrande F, Brinon B, Francelle L, Aurégan G, Guillermier M, Cailleret M, Viegas P, Nicoleau C, Martinat C, Brouillet E, Cattaneo E, Peschanski M, Lechuga M, Perrier AL. High throughput screening for inhibitors of REST in neural derivatives of human embryonic stem cells reveals a chemical compound that promotes expression of neuronal genes. *Stem Cells* 2013; **31**: 1816-1828 [PMID: 23712629 DOI: 10.1002/stem.1430]
- 103 **Ferrer M**, Comeo B, Davis J, Wan Q, Miyagishima KJ, King R, Maminishkis A, Marugan J, Sharma R, Shure M, Temple S, Miller S, Bharti K. A multiplex high-throughput gene expression assay to simultaneously detect disease and functional markers in induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelium. *Stem Cells Transl Med* 2014; **3**: 911-922 [PMID: 24873859 DOI: 10.5966/sctm.2013-0192]

P- Reviewer: Danisovic L, Jun Y S- Editor: Song XX L- Editor: A

E- Editor: Lu YJ



#### *d. CSPhs et édition du génome*

##### *i. Intérêt de l'édition génétique pour la modélisation pathologique et la thérapie cellulaire*

La modélisation pathologique, via l'utilisation des CSPhs, se base le plus souvent sur l'identification d'un phénotype pathologique par comparaison entre lignées saines et mutantes. Toutefois, l'utilisation de lignées provenant de patients ou d'embryons différents rend parfois difficile la distinction entre les différences phénotypiques dues à la mutation d'intérêt et celles dues aux différences de fond génétique, aux variations épigénétiques ou encore à la qualité de la reprogrammation dans le cas des hiPSCs. Ainsi, des contrôles isogéniques sont nécessaires dans le but de confirmer la présence d'un phénotype pathologique identifié par comparaison entre des lignées d'origines différentes. Jusqu'à récemment, les techniques d'édition du génome disponibles telles que les TALENS, les nucléases à doigt de zinc ou encore les méganucléases étaient à la fois trop coûteuses, trop difficiles à concevoir et trop peu efficaces pour permettre la génération, en routine, de lignées cellulaires contrôlées isogéniques par insertion d'une mutation dans une lignée saine ou à l'inverse par correction de la mutation d'une lignée pathologique. C'est pourquoi la plupart des équipes confirmaient jusque-là l'existence d'un phénotype par comparaison d'un grand nombre de lignées ou via l'utilisation de siRNA (small interfering RNA). Cependant, la première approche peut se révéler à la fois couteuse et fastidieuse tandis que la seconde n'assure pas l'extinction totale de l'expression d'un gène et ne permet pas de mimer le potentiel gain de fonction d'une protéine mutée.

D'un autre côté, bien que la découverte des hiPSCs ait amené la possibilité de réaliser des greffes autologues évitant théoriquement tout risque de rejet, il est impossible d'effectuer ce type de greffe dans le cadre de maladies héréditaires sans avoir au préalable corrigé, chez les cellules prélevées, la mutation responsable de la pathologie.

Ainsi l'émergence de la technologie CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/ CRISPR associated protein 9) permettant d'éditer le génome de manière relativement simple, efficace et peu coûteuse représente une véritable avancée à la fois pour la modélisation pathologique et la thérapie cellulaire basée sur l'utilisation des CSPhs.

##### *ii. La révolution CRISPR*

C'est en 1987 que les courtes répétitions palindromiques groupées et régulièrement espacées (CRISPR) ont été observées pour la première fois chez *E.Coli* (Ishino et al., 1987). Par la suite, ces loci constitués d'une alternance de courtes séquences d'ADN répétées, séparées par des séquences uniques appelées « spacers » ont été observées chez de nombreuses autres bactéries. Mais ce n'est qu'en 2005 que l'origine étrangère à la bactérie des séquences spacers a été

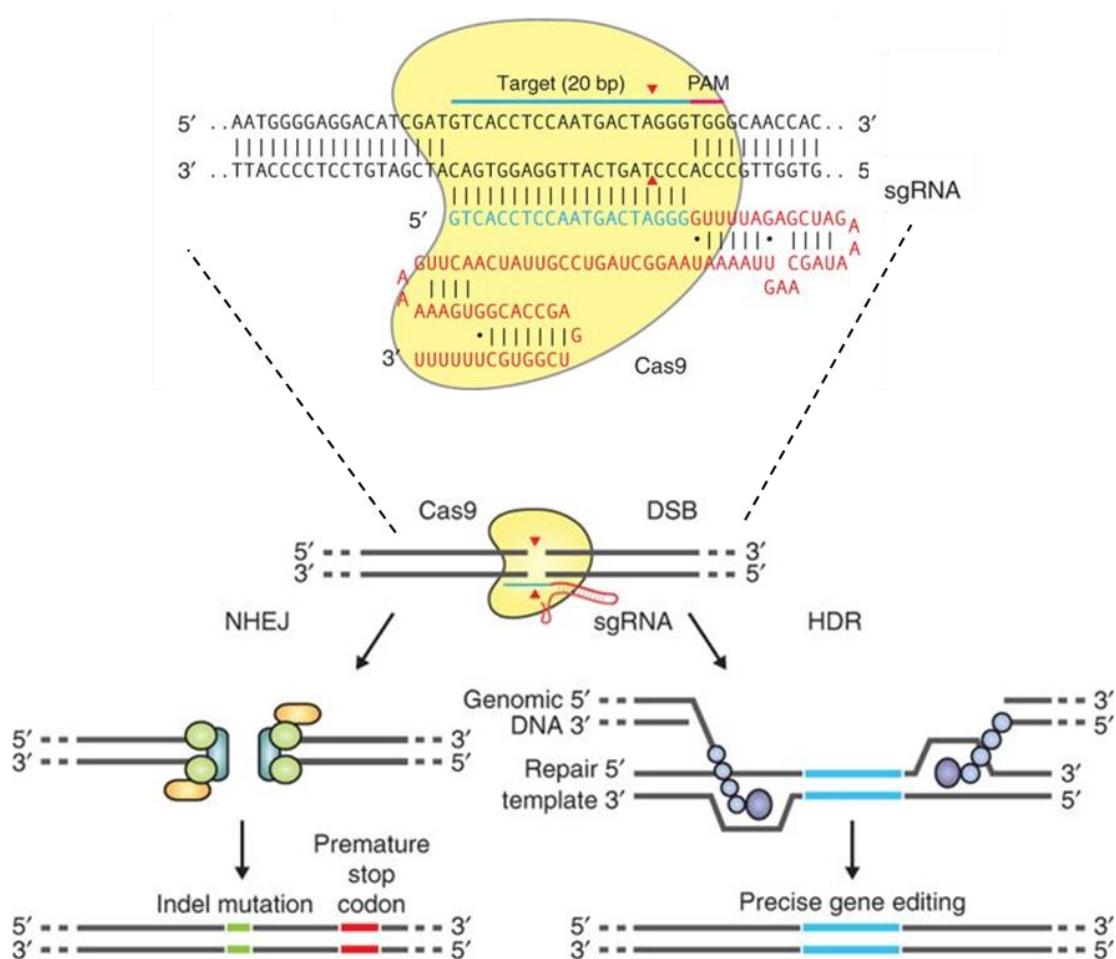
découverte (Mojica et al., 2005) et en 2007 que leur fonction a été élucidée. Les CRISPRs sont, en réalité, un élément clé de l'immunité adaptative des bactéries contre les phages (Barrangou et al., 2007).

A proximité des locus CRISPRs se trouvent les gènes Cas codant pour différentes protéines intervenant dans les 3 étapes de cette réponse immunitaire. La première étant la phase d'adaptation au cours de laquelle l'ADN intrus est reconnu puis clivé afin de générer un nouveau « spacer » ajouté au locus CRISPR. La seconde étant la phase de synthèse et de maturation du crRNA (CRISPR RNA). Et enfin la dernière étant la phase d'interférence qui consiste en l'utilisation de ce crRNA comme guide par les endonucléases Cas afin de cliver l'ADN du phage lors de nouvelles infections (Ishino et al., 2018).

Il existe 2 grandes classes de système CRISPR-cas selon que la phase d'interférence est médiée par une unique protéine effectrice multi-domaines (classe II) ou par plusieurs protéines (classe I). Chacune de ces classes étant elle-même sous divisée en 3 types. De par sa plus grande simplicité, c'est le système de classe 2/type II, auquel appartient la Cas9, qui a été utilisé pour la mise au point de nouvelles technologies permettant l'édition du génome (Koonin et al., 2017). Le locus codant pour ce système a la particularité de contenir, en plus des éléments préalablement cités, une région codant pour un ARN transactivateur (tracrRNA) à la fois nécessaire à la maturation du crRNA et à l'activité endonucléase de la Cas9. Ainsi, avec ce système, seuls 3 éléments sont requis pour réaliser une cassure double brin ciblée de l'ADN : le crRNA, le tracrRNA et la Cas9. De par sa simplicité, ce système à très rapidement été détourné afin d'éditer le génome de cellules eucaryotes et s'est révélé également efficace dans ce contexte (Cong et al., 2013; Mali et al., 2013). Il fut encore simplifié en 2012 lorsque Jinek et al. démontrent que l'utilisation d'un ADN chimérique appelé sgRNA (single guide RNA), résultant de la fusion entre le crRNA et le tracrRNA, permettait de recruter la Cas9 et d'induire une cassure double brin de l'ADN aussi efficacement que ces ARNs utilisés séparément (Jinek et al., 2012).

Ainsi, tel que nous l'utilisons aujourd'hui pour éditer le génome, le système CRISPR/Cas9 se compose de seulement 2 éléments : une endonucléase (Cas9) et un ARN guide d'une centaine de nucléotides dont 20, à l'extrémité 5', sont complémentaires de la séquence ciblée. La seule limitation, quant au choix de cette séquence, étant la présence obligatoire d'une séquence PAM (Protospacer Adjacent Motif) directement en 3' cette dernière, nécessaire au clivage de l'ADN par la Cas9. Toutefois, puisque la séquence PAM reconnue par la Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (Cas9 de l'espèce bactérienne la plus utilisée) est NGG et que ce motif est statistiquement présent toutes les 8 paires de bases, cette contrainte reste modérée.

Suite à une cassure double brin de l'ADN, les deux principaux mécanismes de réparation de l'ADN, le NHEJ (Non-Homologous End Joining) et la recombinaison homologue vont alors être activés. Le NHEJ est un système de réparation non conservatif assurant simplement la continuité de la molécule d'ADN. Il est dit « sujet aux erreurs » et induit régulièrement de petites insertions ou délétions de nucléotides appelées « Indels » pouvant entraîner le décalage du cadre de lecture d'un gène et donc l'apparition codon stop et la synthèse d'une protéine tronquée. Ainsi, il est possible d'invalider un gène sans apport de matériel génétique exogène en laissant simplement agir le NHEJ après avoir induit la cassure double brin de l'ADN. Cependant, la mutation induite sera alors aléatoire. A contrario, si l'on souhaite induire une mutation précise ou en corriger une, il est possible d'utiliser la recombinaison homologue en apportant à la cellule un fragment d'ADN exogène flanqué par des séquences homologues à la région clivée (**Figure 18**).



**Figure 18. Edition du génome par le système CRISPR/Cas9 (Ran et al., 2013).**

A la fois plus simple, moins coûteuse et plus efficace que toutes les techniques d'édition du génome développées jusqu'alors, l'apparition de la technologie CRISPR/Cas9 a généré un engouement énorme. Ainsi, en seulement quelques années de nombreuses améliorations lui ont été

apportées afin d'en perfectionner l'efficacité et la spécificité. Parmi c'est amélioration, on notera par exemple l'apparition de Cas9 mutées n'induisant qu'une coupure simple brin de l'ADN (Cas9 nickase). Avec ce système, deux sgRNAs sont donc nécessaires pour induire le clivage de l'ADN augmentant ainsi la spécificité de la coupure induite par la Cas9. Des Cas9 totalement inactivées appelées « dead Cas9 » ont également été générées et fusionnées avec des protéines permettant d'agir localement sur l'ADN telles que des ADN méthyltransférases, des histones désacétylases ou encore divers activateurs transcriptionnels. Ainsi, de multiples possibilités s'offre désormais aux utilisateurs concernant le choix de la cas9 mais aussi concernant la manière d'apporter cette dernière aux cellules (plasmide, ARN, protéine, électroporation, particule virale, lipofection) (Adli, 2018).

### *iii. Edition génétique des CSPhs pour l'étude et le traitement des maladies rétiniennes*

Bien que le système CRISPR/Cas9 ai déjà été utilisé à de multiples reprises sur des CSPhs pour générer des contrôles isogéniques dans le cadre de la modélisation de diverses pathologies (Zhang et al., 2017), peu d'exemples concernant l'utilisation de cette technologie pour la modélisation des rétinopathies ont été publiés à ce jour. Récemment tout de même, Deng et al. ont utilisé le système CRISPR/Cas9 pour corriger la mutation du gène *RPGR* chez des hiPSCs dérivées à partir de cellules prélevées sur 3 patients atteints de rétinites pigmentaires. Les auteurs ont ainsi démontré que la correction de ce gène était suffisante pour que les photorécepteurs obtenus après différenciation des hiPSCs en organoïdes rétiniens retrouvent une morphologie et une activité électrophysiologique normale, confirmant ainsi que les phénotypes pathologiques observés étaient bien dus à la mutation de ce gène et suggérant également, dans un modèle humain, que sa correction par thérapie génique pouvait s'avérer une stratégie thérapeutique pertinente (Deng et al., 2018).

Burnight et al. ont quant à eux récemment développé 3 stratégies différentes basées sur l'utilisation de CRISPR/cas9 permettant de rectifier efficacement, dans des hiPSCs, 3 mutations couramment retrouvées chez les patients atteints de rétinites pigmentaires, à savoir : (1) l'insertion d'une séquence Alu dans l'exon 9 du gène *MAK*, (2) la mutation intronique IVS26 aboutissant à un épissage anormal du gène *CEP290* et (3) la mutation dominante « gain de fonction » Pro23His de la Rhodopsine. Selon les auteurs, ces 3 types de mutations étant représentatives de la plupart de celles retrouvées chez les patients atteints de dystrophies rétiniennes héréditaires, ces différentes stratégies pourraient être utilisées afin de générer des hiPSCs génétiquement corrigées à partir des cellules de la plupart d'entre eux. Dans leur étude, les auteurs suggèrent que la possibilité de corriger ces mutations relativement aisément, va permettre de faciliter la greffe de cellules autologues pour ces patients. Il est également probable que ces stratégies vont permettre de faciliter la génération de contrôles isogéniques pour les études visant à modéliser ces pathologiques (Burnight et al., 2017).

## IV. La Polypose Adénomateuse Familiale : une maladie multi-systémique avec des atteintes rétiniennes

La polypose adénomateuse familiale (PAF) est une maladie multi-systémique à transmission autosomique dominante due à la mutation du gène APC. Elle se manifeste principalement par l'apparition de quelques dizaines à plusieurs centaines d'adénomes au niveau du colon et compte pour environ 1% des cancers colorectaux dans le monde (Half et al., 2009). Cependant, comme nous allons le voir, les patients atteints par cette pathologie peuvent également développer un certain nombre de symptômes extra-intestinaux tels que des lésions pigmentées du fond de l'œil (LPFOs).

### 1. Historique et description générale

Le premier cas de polypes multiples dans le colon fut décrit dès 1721 par Menzel (Menzel, 1721). Ce dernier fit l'observation post-mortem de nombreuses excroissances sur le colon d'un garçon de 15 ans victime de dysenterie. Par la suite, d'autres cas furent rapportés sans pour autant qu'un lien avec le développement du cancer colorectal ne soit mis en évidence.

Ainsi il faut attendre 1881 et la publication du premier cas de polypes adénomateux avérés histologiquement par Skilfasowski, pour que le potentiel cancéreux de ces excroissances soit reconnu (Skilfasowski, 1881). Au cours de la même période, le caractère héréditaire de ces lésions commence également à être mis en évidence par Cripps (Cripps, 1882) qui rapporte le cas d'un frère et d'une sœur présentant tous deux des adénomes multiples dans le colon malgré la rareté de ce symptôme. Par la suite, de nombreux cas de familles prédisposées au développement de ces polypes furent rapportés et l'aspect héréditaire dominant de la pathologie fut définitivement établi en 1927 (Cockayne, 1927).

Tout d'abord considérée comme une pathologie affectant exclusivement l'intestin, la PAF s'est rapidement révélée être une maladie multi-systémique touchant de nombreux tissus. Ainsi, le premier symptôme extra-intestinal fut observé en 1916 par Devic et Bussy qui rapportèrent la présence d'ostéomes chez un patient souffrant d'une polypose généralisée à tout l'intestin (Devic and Bussy, 1912). Mais ce n'est qu'en 1951 que Gardner décrivit ce qui deviendra le syndrome éponyme en associant la présence d'adénomes colorectaux au développement de tumeurs desmoïdes, de tumeurs osseuses et de kystes épidermiques (Gardner, 1951). Durant les décennies qui suivirent de nombreux symptômes furent ajoutés au tableau clinique de ce syndrome tel que le cancer de la thyroïde, des anomalies dentaires, des hépatoblastomes ou encore la présence de lésions pigmentées du fond de l'œil qui est le symptôme extra-intestinal le plus couramment associé à la PAF.

Bien que les patients atteints par ce syndrome ne représentent qu'un peu moins de 1% de l'ensemble des cancers colorectaux, des efforts considérables furent réalisés afin d'identifier le gène muté chez ces familles au vu de sa probable implication dans les cancers colorectaux sporadiques. Pour cela des études de liaisons génétiques furent réalisées sur de nombreuses familles prédisposées au développement de polypes intestinaux et c'est ainsi qu'en 1986 la pathologie fut finalement rattachée à la délétion d'une région du bras long du chromosome 5 par Herrera (Herrera et al., 1986). Un an plus tard, Bodmer et Leppert affinent de manière indépendante la localisation du gène Adenomatous Polyposis Coli (APC) en 5q21-22 (Bodmer et al., 1987; Leppert et al., 1987) avant que Groden ne détermine sa localisation exacte en 1991 (Groden et al., 1991). Puis en 1994, Olschwang va encore plus loin en faisant état d'une corrélation génotype-phénotype entre la position de la mutation sur APC, la sévérité de la pathologie et la présence de certains symptômes extra-intestinaux (Olschwang et al., 1993). Lynch a alors introduit la notion de polyposé adénomateuse atténuée (PAFA) pour les patients présentant moins de 100 adénomes dans le colon et corrèle ce phénotype avec la présence de mutations vers l'extrémité 5' du gène APC. A l'inverse, les patients porteurs de mutations entre les codons 1250 et 1460 seraient généralement atteints d'une polyposé plus sévère avec souvent plus de 5000 polypes dans le colon (Lynch et al., 1995).

Depuis, environ 1100 mutations différentes d'APC ont été identifiées chez des patients atteints de PAF et il a été démontré que la mutation d'APC était également impliquée dans plus de 80% des cancers colorectaux sporadiques (Leoz et al., 2015). Ces mutations surviennent généralement dans la partie centrale du gène et aboutissent le plus souvent à la synthèse d'une protéine tronquée stable.

Enfin, en 2003, la mutation d'un second gène, MUTYH, fut rattachée au développement de multiples polypes intestinaux (Sampson et al., 2003; Sieber et al., 2003). Cette nouvelle forme de polyposé à transmission autosomique récessive fut donc appelée la polyposé adénomateuse associée à MUTYH (PAM). Les patients porteurs de cette mutation comptent pour environ 10 à 20% des patients atteints de polyposé adénomateuse et présente la plupart du temps un phénotype atténué. En effet, la mutation bi-allélique de MUTYH est retrouvée chez seulement 7,5% à 12,5% des patients présentant plus de 100 adénomes sans mutation d'APC mais est retrouvée chez 16 à 40% des patients présentant entre 15 et 99 adénomes colorectaux (Syngal et al., 2015).

## 2. Epidémiologie et diagnostique

En 1955, Reed & Neel estime pour la première fois l'incidence de cette pathologie autour de 1 sur 8300 en se basant sur un rapport de l'hôpital universitaire du Michigan, faisant de la PAF la seconde forme la plus courante de cancer colorectal familial derrière le syndrome de Lynch (cancer

colorectal héréditaire sans polypose) (Reed and Neel, 1955). Ce chiffre fut ensuite affiné par plusieurs études et les différentes estimations réalisées jusqu'ici, qui varient entre 1 sur 6850 et 1 sur 29000, semblent constantes partout dans le monde que l'on soit un homme ou une femme (Waller et al., 2016). Cependant, bien que de nombreux pays possèdent désormais des registres nationaux répertoriant les patients atteints par la PAF, il reste difficile à ce jour d'établir une carte précise de l'incidence de la maladie selon les différentes origines ethniques. La pénétrance de la PAF est quant à elle considérée proche de 100% concernant le risque de développement d'un cancer colorectal.

Le diagnostic de la PAF est effectué tout d'abord sur des observations cliniques et la coloscopie ou la rectosigmoïdoscopie sont les premiers examens à être réalisés en cas de suspicion. Chez une personne avec des antécédents familiaux cet examen doit être réalisé tous les 2 ans dès l'adolescence (Vasen et al., 2008). Par définition, une personne présentant plus de 100 adénomes au niveau du colon est atteinte de PAF, qu'il y ait ou non un historique familiale (Varesco, 2004). En effet 25 à 30% des cas sont dû à des mutations *De Novo*. Il est alors obligatoire de réaliser un test génétique afin de détecter une mutation sur les gènes APC ou MUYTH. Ce test est également conseillé pour toutes personnes présentant plus de 10 adénomes colorectaux puisque ces dernières sont susceptibles de souffrir d'une forme atténuée de la PAF (Kanth et al., 2017). L'identification de la mutation affectant le patient est un élément important du diagnostic puisqu'elle peut donner une idée sur la sévérité de la maladie et augmenter la probabilité de présence de certains symptômes. De plus, le mode de transmission étant différent selon le gène touché (dominant pour APC et récessif pour MUYTH), l'identification de la mutation va non seulement permettre d'adapter la prise en charge du patient mais également celle de sa famille. Cependant, il est important de noter qu'un test génétique négatif pour les gènes APC et MUYTH ne suffit pas à écarter le diagnostic de PAF. En effet, 10 à 20% des cas ne présentent aucune mutation détectable sur ces 2 gènes et la raison génétique de la maladie demeure alors le plus souvent inconnue, rendant ainsi le dépistage plus contraignant pour la famille du patient qui se voit dans l'obligation de subir une coloscopie (Khan et al., 2017).

Un autre aspect important à prendre en compte lors d'un diagnostic de PAF est la recherche des symptômes extra-intestinaux couramment associés tel que des tumeurs desmoïdes. A ce jour, 2 variantes de la PAF ont été décrites sur la base des symptômes cliniques présents : (i) le syndrome de Gardner caractérisé par le développement de kystes épidermiques, d'ostéomes et de tumeurs des tissus mous et (ii) le syndrome de Turcot caractérisé par l'association d'adénomes intestinaux et de tumeurs au cerveau. Il est à noter que le syndrome de Turcot n'est pas forcément associé à un cas de PAF et la mutation du gène APC mais peut également être une forme alternative du syndrome de Lynch causée par la mutation des gènes MLH1 ou PMS2 (Varesco, 2004).

### 3. Symptômes non rétiniens

#### a. Symptômes colorectaux

La PAF se caractérise principalement par l'apparition de quelques dizaines à plusieurs milliers de polypes de tailles variables dans les parties descendantes et sigmoïdes du colon ainsi que dans le rectum (**Figure 19**).



**Figure 19. Colectomie d'un patient atteint de PAF présentant de nombreux adénomes tubuleux.**

(Waller et al., 2016)

Ces polypes apparaissent généralement au cours de l'adolescence et vont ensuite augmenter en nombre et en taille pour inéluctablement aboutir à l'apparition d'un carcinome autour de 40 ans (Half et al., 2009). A l'heure actuelle, le seul traitement disponible reste la chirurgie. Dans la mesure du possible les polypes sont retirés un à un mais le plus souvent une chirurgie préventive visant à retirer tout ou une partie du colon est préconisée lors de la seconde décennie de vie du patient. Selon la sévérité des symptômes et la partie du colon affectée, plusieurs options chirurgicales sont possibles tels que la colectomie avec anastomose iléo-rectale (conservation du rectum), la proctocolectomie totale (résection du colon et du rectum) avec iléostomie ou encore la proctocolectomie (résection du rectum et de tout ou une partie du colon) avec anastomose iléo-anale. Après la chirurgie un suivi endoscopique régulier demeure indispensable afin de détecter l'apparition de nouveaux polypes et de les retirer le cas échéant (Vasen et al., 2008).

#### b. Autres symptômes gastro-intestinaux

La quasi-totalité des patients atteints de PAF développent également des adénomes dans le duodénum au cours de leur vie. Ces adénomes apparaissent généralement 10 à 15 ans après la détection des polypes colorectaux et environ 5% d'entre eux dérivent en adénocarcinomes dans les 10 ans (Groves et al., 2002). L'évolution de ces adénomes se fait généralement de manière ordonnée en suivant les différents stades de l'échelle de Spigelman qui les classe selon leurs nombres, leurs

tailles, leurs histologies et leurs dysplasies. C'est pourquoi il est important de réaliser un suivi endoscopique régulier afin de déterminer si une intervention chirurgicale est nécessaire. Plus le stade est avancé plus l'intervalle entre chaque examen doit être réduit et à partir du stade III et IV une intervention chirurgicale doit être envisagée. Chez les patients jeunes (< 40 ans), si possible, la résection locale des polypes est conseillée afin de reporter l'ablation du duodénum (duodénectomie). Chez les patients plus âgés présentant un grade IV en revanche, la duodénectomie est conseillée (Vasen et al., 2008).

Bien que plus rare, des adénomes peuvent également survenir dans le reste de l'intestin grêle (jéjunum et iléon). La proportion exacte de patients affectés par ces derniers n'a pas clairement été déterminée mais elle avoisinerait les 50% (Bertoni et al., 1993). Si quelques cas de carcinomes ont déjà été rapportés ces lésions progressent rarement jusqu'à ce stade.

Enfin, les personnes souffrantes de PAF sont prédisposées à l'apparition de polypes des glandes fundiques dans l'estomac. Ces derniers sont distincts de ceux apparaissant de manière sporadique (considérés comme totalement bénins) puisque dans le cadre de la PAF environ 40% d'entre eux présentent des caractéristiques adénomateuses bien qu'ils ne progressent que rarement en carcinomes (Bianchi et al., 2008).

### *c. Symptômes extra-intestinaux*

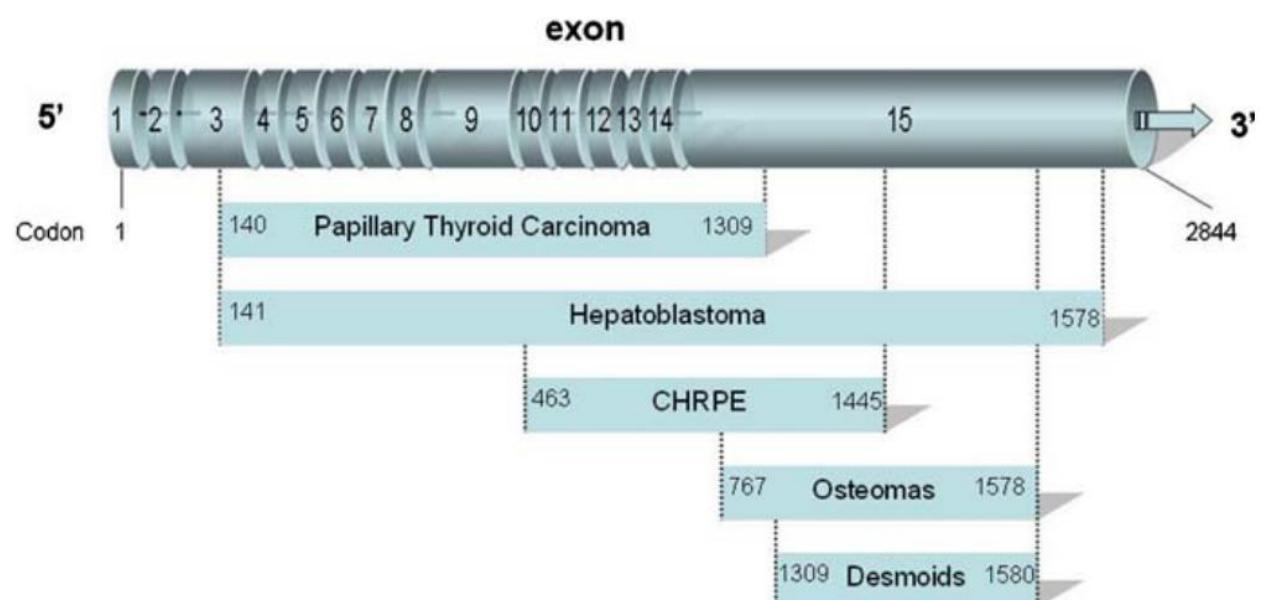
En plus de ces polypes, les patients atteints de PAF peuvent également développer divers symptômes extra-intestinaux qui vont varier selon la position de la mutation sur APC (**Figure 20**). Parmi les symptômes les plus courants, on retrouve des lésions pigmentées du fond de l'œil (voir III.4), des ostéomes, des anomalies dentaires et des tumeurs desmoïdes (Half et al., 2009).

Les anomalies dentaires et les ostéomes demeurent la plupart du temps bénins ne nécessitant donc pas de prise en charge particulière si ce n'est l'extraction des dents surnuméraires. Ces symptômes sont retrouvés chez environ 20% des patients et sont le plus souvent associés avec une mutation sur l'exon 15 d'APC entre les codons 767 et 1578 (Groen et al., 2008).

Les tumeurs desmoïdes quant à elles apparaissent chez 10 à 20% des patients et représentent la seconde cause de mortalité chez ces derniers. Il s'agit de tumeurs fibroblastiques, non malignes mais invasives localement avec un haut taux de récidive qui, si elles se développent à proximité d'un organe vital peuvent entraîner la mort du patient (DE Marchis et al., 2017). Contrairement aux tumeurs desmoïdes sporadiques, la plupart des tumeurs associées à la PAF se développent dans la paroi ou la cavité intra-abdominale. Les porteurs d'une mutation entre les codons 1309 et 1578 d'APC ainsi que les patients ayant déjà subis une opération chirurgicale sont particulièrement susceptibles de développer ce type de tumeurs (Bertario et al., 2001).

Les possibilités de traitements sont multiples et comprennent à la fois des traitements médicamenteux, de la chimiothérapie, des interventions chirurgicales ou encore de la radiothérapie. Malheureusement aucun essai clinique randomisé et réalisé sur un nombre suffisant de patients n'est venu attester l'efficacité de l'un de ces traitements. Malgré tout, une combinaison de Sulindac (anti-inflammatoire non stéroïdien) et de Tamoxifène (anti-estrogènes) semble être le traitement de choix concernant les tumeurs intra-abdominales de tailles importantes et la chimiothérapie ou la radiothérapie sont à envisager en cas de non-réponse à ce traitement. Le traitement à adopter dans le cas des tumeurs situées dans la paroi abdominale est quant à lui encore sujet à controverse. Certains conseillant l'intervention chirurgicale afin de retirer les tumeurs avant qu'elles ne grossissent tandis que d'autres préfèrent l'éviter puisque l'opération en elle-même augmente le risque de voir apparaître d'autres tumeurs et que le taux de récidives est trop important. En conclusion, de plus amples études seraient nécessaires à la mise au point d'un traitement standard pour ce type de tumeurs (DE Marchis et al., 2017; Groen et al., 2008).

En plus de ces symptômes, les patients atteints de PAF sont également prédisposés au développement de nombreux autres types de cancers tel que des cancers thyroïdiens le plus souvent dû à une mutation dans la région 5' de l'exon 15 d'APC (1 à 2% des patients), des hépatoblastomes (<2%), des tumeurs cérébrales (Syndrome de Turcot, 1 à 2%) et des tumeurs surrénales (7%). Chacun de ces symptômes nécessite évidemment une prise en charge spécifique du patient (Groen et al., 2008).



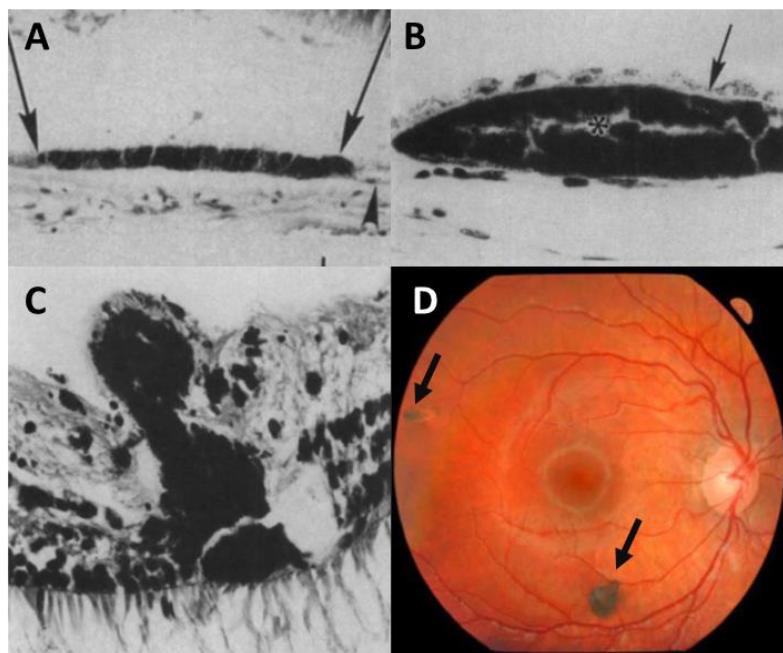
**Figure 20. Corrélation génotypes-phénotypes des symptômes extra-intestinaux dans les cas de polyposes adénomateuses familiales (Groen et al., 2008).**

#### 4. Lésions pigmentées du fond de l'œil associées à la PAF

La présence de lésions pigmentées du fond de l'œil (LPFOs) est le symptôme extra-intestinal le plus couramment associé à la PAF. Il s'agit de lésions bénignes qui sont régulièrement associées, à tort, à l'hypertrophie congénitale de l'épithélium pigmentaire rétinien (HCEPR) observable chez certaines personnes non atteintes de PAF (Hennessy et al., 1993). En effet, d'un point de vue clinique ces deux symptômes se ressemblent fortement et se manifestent, lorsque l'on réalise un fond d'œil, par la présence de lésions pigmentées de tailles variables, rondes et à première vue plates (**Figure 21D**). De plus, bien que longtemps considérées comme stable, des études menées sur le long terme tendent à démontrer que dans les deux cas le diamètre de ces lésions augmente lentement tout au long de la vie (Arepalli et al., 2012). Cependant plusieurs différences notables existent. Tout d'abord, dans le cadre de la PAF les lésions sont multiples et bilatérales, les rendant distinguables lors d'un fond d'œil réalisé par un clinicien. Ensuite, des études histologiques menées post mortem ont démontré que plusieurs types de lésions étaient observables dans l'EPR des patients atteints de PAF. Si la plupart d'entre elles sont effectivement semblables à celles observées lors d'une HCEPR, c'est à dire constituées d'une monocouche de cellules hypertrophiées et hyperpigmentées, certaines au contraire sont multicouches et s'étendent en direction de la rétine, allant même jusqu'à la traverser entièrement (**Figure 21A, B et C**) (Kasner et al., 1992; Traboulsi et al., 1990). Par conséquent, ces lésions peuvent être considérées comme des hamartomes (malformation tissulaire d'aspect tumorale constituée de cellules matures semblables à celles constituant l'organe où la malformation se développe mais présentes en quantité excessive ou anormalement disposées) de l'EPR même si leur classification reste floue (Hennessy et al., 1993; Ly et al., 2015). De plus, l'observation de granules pigmentaires de taille supérieure à la normale dans les cellules de l'EPR de patients atteints de PAF, même en dehors des LPFOs, suggère un défaut généralisé de la mélanogénèse dans ces cellules (Kasner et al., 1992; Traboulsi et al., 1990). Bien que bénins, ces symptômes suggèrent donc un rôle d'APC dans la régulation de la prolifération et de la mélanogénèse des cellules de l'EPR. Malgré tout, à ce jour et à ma connaissance, aucune complication liée à des LPFOs n'a été rapportée dans le cadre de la PAF. En revanche l'HCEPR a, dans de très rares cas, déjà été impliquée dans des cas d'adénocarcinomes et de décollements rétiniens (Moulin et al., 2014; Shields et al., 2000, 2001; Trichopoulos et al., 2006; Youhnovska et al., 2013).

Les LPFOs étant congénitales et donc observables dès la naissance, elles représentent l'une des manifestations les plus précoces de la PAF. C'est pourquoi la possibilité de les utiliser comme un marqueur de la pathologie pour établir un diagnostic a été testée à de nombreuses reprises (Ellis, 1994; Mirinezhad et al., 2018; Morton et al., 1992; Traboulsi et al., 1987). Les études menées dans ce sens, bien que très variables car réalisées le plus souvent sur un nombre insuffisant de patients,

tendent tout de même à montrer que la présence bilatérale de plus de 4 LPFOs est un marqueur hautement spécifique de la PAF (94%) (Olea et al., 1996). En revanche, ce critère se révèle relativement peu sensible puisque selon l'étude prise en compte l'incidence de ce symptôme chez les patients pourrait être inférieur à 70% (supérieur à 90% selon d'autres). Ceci s'explique par le fait que seuls les patients porteurs d'une mutation entre les codons 413 et 1387 d'APC semblent susceptibles de développer ce type de lésions bien que des exceptions aient déjà été rapportées (Nieuwenhuis and Vasen, 2007; Olschwang et al., 1993; Pang et al., 2000). Dans ces conditions, l'absence de LPFOs ne peut suffire à poser un diagnostic négatif mais peut à l'inverse permettre à un clinicien de suspecter un cas de PAF. De plus, la présence ou non de ces lésions chez un patient peut-être un indicateur de la probabilité de développer certains autres symptômes extra-intestinaux. Ainsi, il a été mis en évidence que les patients présentant de multiple LPFOs étaient plus à même de développer des cancers de la thyroïde (Groen et al., 2008) tandis que ceux qui en sont dépourvus auraient de plus grandes chances de développer des tumeurs desmoïdes (Caspari et al., 1995).



**Figure 21. Différents types de LPFOs.** (A) Exemple du type de lésion le plus fréquemment retrouvé chez les patients atteints de PAF. Ces lésions sont constituées d'une monocouche de cellules hypertrophiées et hyperpigmentées. (Grossissement X175) (B) Exemple de lésions bi ou tri-stratifiées. (Grossissement X560) (C) Exemple d'hamartomes de l'EPR observé chez un patient. (Grossissement X480) (D) Fond d'œil d'un patient atteint de PAF présentant 2 LPFOs (flèches noires) (Traboulsi et al., 1990 et Chen et al., 2006).

## 5. APC, une protéine multifonction

### a. *Organisation du gène APC et expression d'isoformes tissus-spécifiques*

Le gène suppresseur de tumeurs Adenomatous Polyposis Coli (*APC*) se situe sur le bras long du chromosome 5, en position 5q21, où il s'étend sur environ 138kB (NC\_000005.10). *APC* est exprimé de manière ubiquitaire et jusqu'ici 2 promoteurs principaux, 1A et 1B, ont été identifiés pour ce gène. Il a longtemps été considéré que le promoteur 1A était le plus actif tandis que le 1B ne jouait qu'un rôle mineur. Cependant, des études plus récentes tendent à montrer que ce dernier possède en réalité un rôle important puisque son inactivation serait responsable de certains cas de PAF (Rohlin et al., 2011; Yamaguchi et al., 2016). Dans sa forme dite « conventionnelle », l'ARNm d'*APC* est composé de 8529 pb réparties en 17 exons (exon 1 à 15 + exon 9A et 10A) dont 4, les exons 1, 7, 9 et 10A font l'objet d'un épissage alternatif (van der Luijt et al., 1995; Suleková and Ballhausen, 1995; Thliveris et al., 1994). Il est à noter que l'exon 15 est particulièrement long et représente plus de 70% de la partie codante d'*APC*.

L'un des aspects les plus intéressant de l'organisation du gène *APC* est l'existence de plusieurs exons alternatifs en amont de l'exon 1 pouvant être exprimés soit de manière concomitante avec celui-ci, soit le remplacer (Thliveris et al., 1994). Deux d'entre eux notamment, appelés exon 0.3 et BS (brain specific), présentent un codon d'initiation de la traduction dans le bon cadre de lecture et peuvent donc permettre la synthèse d'une protéine différente (0.3-*APC* et BS-*APC*). Pour cela, l'exon 1 doit être épissé puisque ce dernier comporte un codon STOP en 5' du codon d'initiation de la traduction de la forme classique d'*APC*. Ainsi, dans le cas où à la fois les exons BS ou 0.3 et l'exon 1 sont retenus, c'est la forme dite « conventionnelle » d'*APC* qui demeure exprimée (Santoro and Groden, 1997).

De manière intéressante il a été démontré que seuls les tissus matures et non mitotiques, en particulier les tissus neuraux, exprimaient les formes d'*APC* sans l'exon 1, suggérant un rôle particulier de ces isoformes dans ces tissus (Bardos et al., 1997; Santoro and Groden, 1997). Dans le cas de la rétine neurale et de l'EPR, Liou et al. ont démontré chez la souris que la forme classique d'*APC* était dans un premier temps très majoritairement exprimée au cours de l'embryogénèse précoce (avant E.16) puis que l'expression des formes sans l'exon 1 et plus particulièrement l'isoforme BS-*APC* augmentait lors de la maturation de ces tissus. Cependant les auteurs de ce papier ont constaté que dans l'EPR, à l'inverse de la rétine neurale, la forme conventionnelle d'*APC* restait majoritaire (Liou et al., 2004). Il est donc possible que la rétention de cette isoforme habituellement exprimée par des tissus prolifératifs entretienne la capacité de ces cellules à migrer et à ré-entrer en prolifération comme cela est observé dans certaines pathologies telles que les vitréorétinopathies.

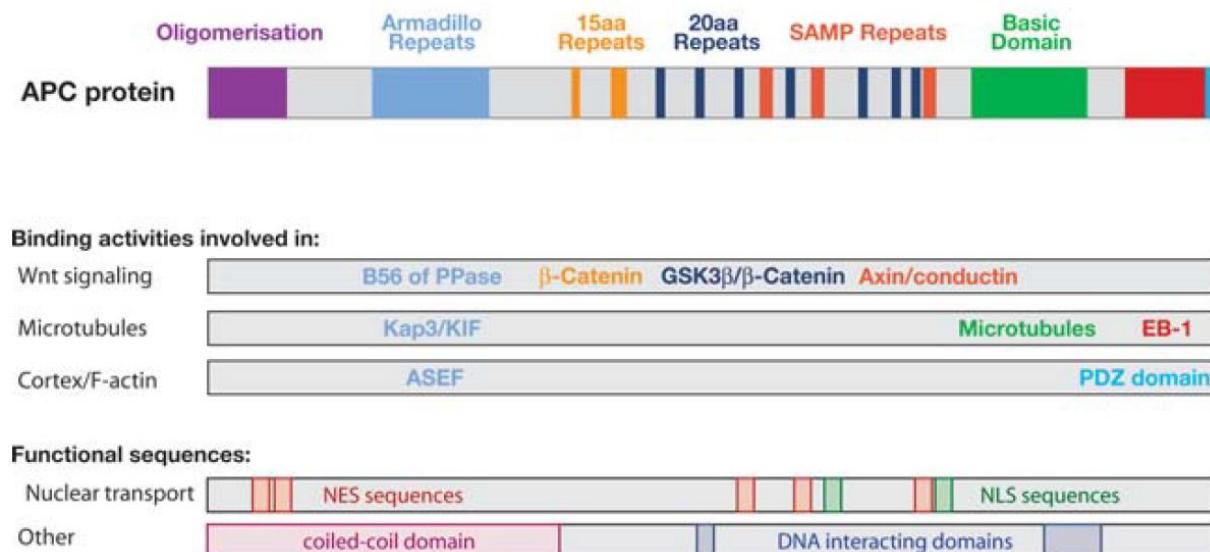
Cependant, aucune étude n'a encore été menée dans ce sens et la fonction exacte ainsi que la manière dont l'expression de chacune de ces isoformes est régulée reste à déterminer. Dans un autre contexte Carson et al. ont tout de même démontré que la réexpression des isoformes 1-APC, BS-APC et 0.3-APC dans des cellules tumorales avait des effets différents sur leurs cycles cellulaires et que seules les 2 premières permettaient de supprimer le phénotype tumoral, confirmant ainsi que ces différentes isoformes possédaient bien des fonctions distinctes (Carson et al., 2004).

*b. APC, une protéine d'échafaudage multi-domaine aux multiples partenaires*

APC code pour une grosse protéine d'échafaudage de 2843 acides aminés (AAs) (310KDa) comportant au minimum 8 domaines fonctionnels distincts lui permettant d'interagir avec un grand nombre de partenaires (Aoki and Taketo, 2007; Hankey et al., 2018; Näthke, 2004) (**Figure 22**). L'extrémité N-terminal est la partie d'APC la plus conservée parmi les nombreuses espèces chez qui ce gène a été séquencé et semble donc avoir un rôle important (Näthke, 2004). On retrouve dans cette partie plusieurs répétitions de 7 AA (répétition heptade) pouvant potentiellement former des domaines « coiled-coil » impliqués dans l'homodimérisation d'APC (Day and Alber, 2000; Joslyn et al., 1993). Dans le contexte de la PAF, ces domaines permettraient également la formation d'hétérodimères entre les formes complètes et tronquées d'APC suggérant un potentiel effet dominant négatif des fragments tronqués via la rétention de la protéine complète (Su et al., 1993). Le rôle et l'importance fonctionnelle de cette dimérisation à la fois en contexte sain et pathologique reste encore à déterminer, mais ils semblerait qu'elle soit notamment impliquée dans la régulation de la migration cellulaire par APC (Li et al., 2008). A la suite de ce domaine d'oligomérisation se trouve un domaine Armadillo semblable à celui de la  $\beta$ -caténine qui permet à APC d'interagir avec de nombreux régulateurs du cytosquelette tels que ASEF1 et 2 ou encore IQGAP1 ainsi qu'avec des régulateurs de la voie Wnt / $\beta$ -caténine telle que la sous unité B56 de PP2A.

C'est dans la région centrale d'APC que se trouvent la plupart des domaines nécessaires à la régulation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine. On y retrouve notamment 3 répétitions de 15 AAs capables de se lier de manière constitutive avec la  $\beta$ -caténine ainsi que 7 répétitions de 20 AAs dont l'affinité pour la  $\beta$ -caténine dépend de leur phosphorylation par GSK3- $\beta$ . De plus, c'est également dans cette région que l'on retrouve les 3 sites de liaison à l'AXIN appelés domaines SAMP.

La partie C-terminale d'APC quant à elle comprend un domaine basique d'environ 200 AAs enrichi en AAs chargés positivement lui permettant d'interagir directement avec les microtubules ainsi qu'un domaine de liaison à EB1, une protéine se liant à l'extrémité positive des microtubules renforçant encore l'interaction entre APC et le cytosquelette. Pour finir, les 15 derniers AAs d'APC constituent un site de liaison au domaines PDZ de protéines telle que DLG1.



**Figure 22. Organisation des multiples domaines d'APC (Näthke, 2004).**

Enfin, des séquences d'externalisation et d'internalisation nucléaire (NES/NLS) se trouvant un peu partout sur APC permettent de réguler sa localisation dans le cytoplasme et dans le noyau où APC est également capable de se lier à l'ADN.

### c. Les principales fonctions d'APC

#### i. APC, un membre essentiel du complexe de destruction de la $\beta$ -caténine

La régulation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine est sans doute la fonction le plus étudiée d'APC. En effet, cette voie de signalisation jouant un rôle central dans l'homéostasie de nombreux tissus, et notamment de l'intestin, sa dérégulation est très probablement le principal mécanisme responsable de l'initiation des cancers colorectaux (Clevers, 2006; Fevr et al., 2007). Cette hypothèse est notamment confirmée par le fait que les souris exprimant une forme stabilisée de la  $\beta$ -caténine présentent un phénotype semblable à celui des souris mutantes APC, avec la formation de multiples polypes tubuleux au niveau de l'intestin (Harada et al., 1999). De plus, dans le cas de cancers colorectaux où aucune mutation d'APC n'est identifiée, il est fréquent d'observer une mutation stabilisatrice de la  $\beta$ -caténine (Morin et al., 1997). Ainsi, de nombreuses équipes ont recherché le rôle d'APC dans cette voie de signalisation et ont mis en évidence sa participation au complexe de destruction de la  $\beta$ -caténine.

En l'absence de ligand Wnt, APC se lie à la  $\beta$ -caténine via ses domaines de répétition de 15 et 20 AAs et à l'Axin via ses domaines de répétition SAMP (Ser-Ala-Met-Pro) pour former avec GSK3- $\beta$  et CKI- $\alpha$  un complexe de destruction induisant la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine. Cette dernière va alors être reconnue par l'ubiquitine ligase  $\beta$ -TRCP permettant ainsi son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome. Cette élimination continue de la  $\beta$ -caténine va ainsi empêcher cette dernière de s'accumuler dans le cytoplasme et d'entrer dans le noyau, ce qui va maintenir la répression des gènes cibles de la voie Wnt par les protéines de la famille TCF/LEF. En revanche, lorsque la voie Wnt/ $\beta$ -caténine est activée par la liaison d'un ligand Wnt avec le récepteur transmembranaire Frizzled et son corécepteur LRP6, la protéine d'échafaudage DVL est recrutée à la membrane entraînant le recrutement de l'Axin au sein de ce complexe nouvellement formé et l'inhibition de la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine par le complexe de destruction. La  $\beta$ -caténine est alors libre de s'accumuler dans le cytoplasme avant d'être transférée dans le noyau où elle s'associe avec les protéines TCF/LEF pour activer l'expression des gènes cibles de la voie Wnt (Figure 23).

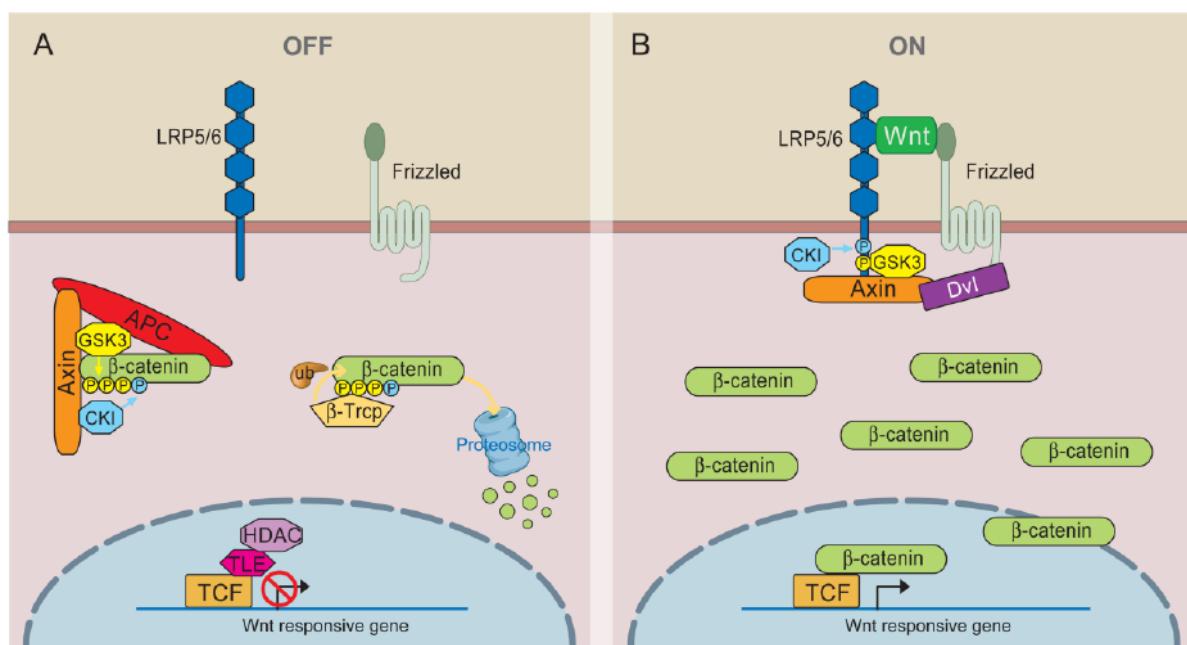


Figure 23. La voie Wnt/ $\beta$ -caténine (MacDonald, Tamai et He, 2009)(MacDonald et al., 2009).

De nombreux gènes cibles de cette voie de signalisation ont été identifiés et semblent varier selon le type cellulaire considéré. Parmi ceux ayant fait l'objet d'un intérêt particulier, au vu de leur probable implication dans le cancer colorectal, on retrouve par exemple des protéines impliquées dans la prolifération telles que l'oncogène *C-Myc* et la Cycline D1 mais également des protéines impliquées dans les contacts cellules-cellules et la migration cellulaire comme l'Ephrine B et son récepteur (Clevers, 2006; Stamos and Weis, 2013).

Bien que plusieurs études aient démontré qu'APC était indispensable à la régulation de la  $\beta$ -caténine et que cette fonction nécessitait au minimum la présence d'un de ses domaines SAMP et de trois de ses répétitions de 20 AAs (Rubinfeld et al., 1997), sa fonction exacte dans le complexe de destruction reste floue. Il semble tout de même que l'absence d'APC ne diminue pas la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine par GSK3- $\beta$  mais diminue en revanche drastiquement son ubiquitination (Yang et al., 2006). Plus précisément, il semblerait qu'APC joue un rôle prépondérant dans l'interaction entre  $\beta$ -TRCP et la  $\beta$ -caténine via sa seconde répétition de 20 AAs. Ainsi, lorsqu'APC est tronquée en amont de ce site, ces deux protéines ne co-immunoprécipitent plus. Une hypothèse avancée pour expliquer ce résultat serait que la liaison entre APC et la  $\beta$ -caténine protège le site d'interaction de cette dernière avec  $\beta$ -TRCP de la déphosphorylation induite par PP2A (Su et al., 2008). D'autres équipes ont quant à elle suggérées un rôle d'APC dans la dynamique d'association entre la  $\beta$ -caténine et l'Axin (Xing et al., 2004) ou encore dans la localisation cellulaire du complexe. Toutefois des études supplémentaires demeurent nécessaires pour déterminer avec certitude les différents rôles d'APC au sein de ce complexe.

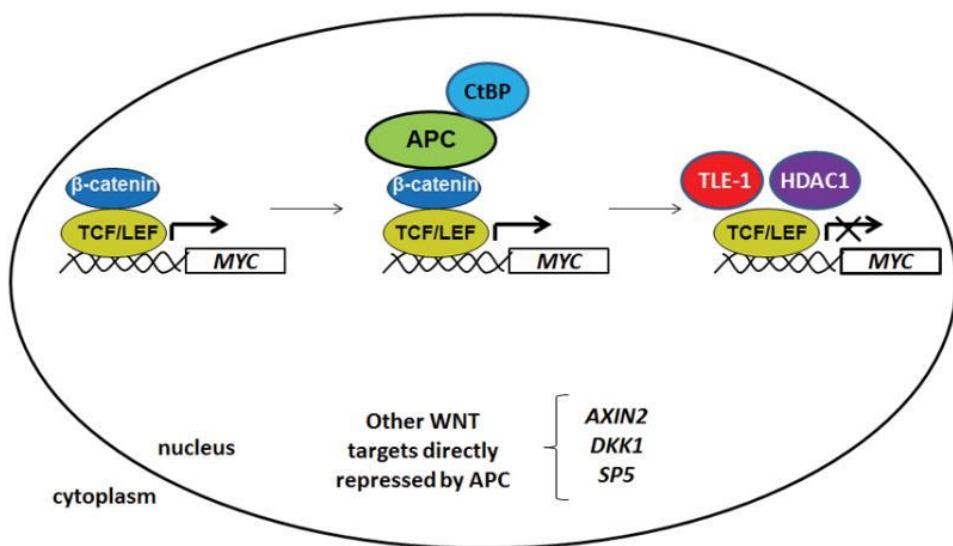
### *ii. Fonctions d'APC dans le noyau*

En plus de sa participation au complexe de destruction dans le cytoplasme, APC va également réguler l'activité transcriptionnelle de la  $\beta$ -caténine directement dans le noyau. La translocation nucléaire d'APC est dépendante de ses deux séquences NLS mais également de son domaine Armadillo. En effet l'interaction de ce domaine avec la sous unité B56 de PP2A semble promouvoir la translocation d'APC dans le noyau et cela indépendamment de l'activité phosphatase de cette dernière (Galea et al., 2001). Une fois dans le noyau, APC interagit directement avec la  $\beta$ -caténine et facilite son export vers le cytoplasme grâce à ses séquences NES (Neufeld et al., 2000).

De plus, dans le noyau, APC interagit également avec le corépresseur transcriptionnel CtBP via ses répétitions de 15 AAs. Ce complexe va alors être capable d'interagir avec la  $\beta$ -caténine et de la déloger de certains locus pour la remplacer par des répresseurs transcriptionnels tel que TLE1 et HDAC1 (Choi et al., 2013; Sierra et al., 2006) (**Figure 24**). Ce mécanisme de répression a notamment été mis en évidence au niveau du promoteur des gènes *MYC*, *AXIN2*, *DKK1* et *SP5*. L'importance de la fonction nucléaire d'APC dans la régulation de la  $\beta$ -caténine par rapport à son rôle dans le complexe de destruction est difficile à déterminer. Toutefois, Zeineldine et al. ont démontré chez la souris que la mutation des séquences de localisation nucléaire d'APC suffisait à induire une prolifération accrue des cellules de l'épithélium intestinal associée à une surexpression de *c-Myc*, *Axin2*, and *Cyclin D1*. De plus, un nombre plus important de polypes est observé chez la souris APC<sup>min/+</sup> si l'on mute les

séquences NLS de l'allèle sein ce qui démontre un rôle important de la régulation nucléaire de la  $\beta$ -caténine par APC (Zeineldin et al., 2012).

Toutefois, la régulation de la  $\beta$ -caténine n'est pas la seule fonction nucléaire d'APC. En effet, APC est également capable de stopper la progression du cycle cellulaire en entrée de phase S en se fixant directement aux régions riches en A/T de l'ADN via son domaine C-terminal (Qian et al., 2008), ceci ayant pour effet de bloquer la réplication de l'ADN. Conformément avec l'idée qu'APC pouvait avoir une fonction nucléaire dans la régulation du cycle cellulaire, il a été proposé que le ratio entre sa fraction nucléaire et cytoplasmique soit plus important chez les cellules en cours de prolifération que chez les cellules quiescentes (Fagman et al., 2003; Zhang et al., 2001). Cependant, la spécificité de plusieurs anticorps ciblant APC couramment utilisés par la communauté ayant été remise en question, les résultats observés concernant la localisation nucléaire d'APC doivent être pris avec précaution (Brocardo et al., 2005; Davies et al., 2007; Neufeld, 2009; Roberts et al., 2003).



**Figure 24. Répression de l'activité transcriptionnelle de la  $\beta$ -caténine par APC et CtBP (Hankey et al., 2018).**

En plus de son rôle dans la régulation du cycle cellulaire, APC serait également capable d'interagir avec plusieurs protéines du BER (Base Excision Repair) afin de bloquer ce mécanisme de réparation de l'ADN. Toutefois, les conséquences de ce blocage en contexte sain et pathologique reste à déterminer (Jaiswal and Narayan, 2008; Narayan and Sharma, 2015).

### *iii. APC, un régulateur essentiel du cytosquelette*

En plus de son rôle dans la régulation de la voie Wnt canonique, APC s'est également révélé être un régulateur essentiel du cytosquelette, intervenant à la fois dans la stabilisation des microtubules et dans la dynamique des filaments d'actine. Comme nous allons le voir, via cette

régulation APC intervient non seulement dans l'adhérence, la polarité et la migration cellulaire mais aussi dans la ségrégation des chromosomes lors de la mitose.

#### APC et le cytosquelette d'actine

APC régule l'organisation du cytosquelette d'actine via 3 partenaires principaux interagissant tous avec son domaine Armadillo : IQGAP1 et les facteurs d'échange GEF (Guanine nucleotide exchange factor) ASEF1 et ASEF2.

En l'absence d'APC, ASEF1 et 2 présentent une activité GEF extrêmement faible due à un mécanisme d'auto-inhibition exercé par leur extrémité N-terminale (Mitin et al., 2007). Leur interaction avec APC augmente considérablement leur activité et ce, probablement via un changement de conformation permettant de lever cette inhibition. A l'origine, il a été supposé que ceci avait pour effet d'activer RAC1, une petite GTPase ayant un rôle important dans le réarrangement du cytosquelette d'actine (Kawasaki et al., 2000). Cependant, une étude postérieure a démontré qu'Asef1 et 2 n'exerçaient aucune activité GEF sur RAC1 bien qu'elles soient capables de s'y lier et qu'elles activaient plus probablement CDC42 une autre protéine de la même famille (Hamann et al., 2007). De manière intéressante, il a été démontré d'une part que la surexpression d'ASEF1 stimulait la migration de cellules épithéliales (Kawasaki et al., 2000) et d'autre part que les formes tronquées d'APC, conservant le domaine Armadillo, stimulaient l'activité GEF d'ASEF1 de manière plus efficace que la forme totale (Kawasaki et al., 2003; Kim et al., 2018). Ainsi, il est possible que la forme tronquée d'APC joue un rôle dans la migration des cellules cancéreuses via ce mécanisme, bien que la seule mutation d'APC ne suffise pas à induire la formation de tumeurs malines. Cette hypothèse a récemment été appuyée par l'étude publiée par Jiang et al. au cours de laquelle les auteurs démontrent que l'utilisation de peptidomimétiques bloquant l'interaction entre APC et ASEF permet d'inhiber la migration de cellules colorectales cancéreuses (Jiang et al., 2017).

L'interaction entre APC et le cytosquelette d'actine est également médiée par IQGAP1, une protéine d'échafaudage jouant un rôle crucial dans la réticulation et la polymérisation des filaments d'actine (Watanabe et al., 2004). Pour cela IQGAP1 est capable de se lier directement à ces filaments ainsi qu'à de multiples protéines impliquées dans leur remodelage tel que CDC42 et RAC1, ce qui va avoir pour effet de les stabiliser dans leur forme active (Briggs and Sacks, 2003). De plus, IQGAP1 interagissant directement avec des protéines impliquées dans la dynamique des microtubules telle que CLIP-170, il est imaginable qu'elle forme avec APC une plateforme d'interaction jouant un rôle dans la coordination des cytosquelettes d'actine et de microtubule au cours de la migration cellulaire. Conformément à cette idée, la déplétion d'APC ou de IQGAP1 empêche la formation d'un réseau d'actine à l'avant des cellules Vero (cellules épithéliales rénales de singe) ainsi que la

réorientation de leur centrosome, bloquant du même coup la migration dirigée de ces cellules (Watanabe et al., 2004).

Enfin, il a également été démontré qu'APC interagit directement avec l'actine (Moseley et al., 2007) de manière à promouvoir la nucléation des filaments en synergie avec mDia1 (Breitsprecher et al., 2012; Okada et al., 2010). Via ce mécanisme APC jouerait un rôle prépondérant dans la dynamique de renouvellement des adhésions focales en faisant le lien entre les cytosquelettes d'actines et de microtubules (Juanes et al., 2017).

#### APC et le cytosquelette de microtubules

APC est capable de se lier aux microtubules de manière directe via son domaine basique et de manière indirecte via EB1. Il a été démontré que les microtubules associés à APC étaient plus stables et moins sujets à la dépolymérisation à la fois *in vitro* et *in vivo* (Zumbrunn et al., 2001). *In vivo*, APC forme des clusters à l'extrémité (+) des microtubules qui sont localisés du côté basal des cellules épithéliales polarisées et à l'avant des cellules en cours de migration (Mogensen et al., 2002). Bien que l'interaction d'APC avec les microtubules se fasse via sa partie C-terminale, sa localisation et la formation de ces clusters aux extrémités (+) est en revanche dépendante de son domaine Armadillo qui lui permet d'interagir indirectement avec la kinésine KIF3B (Jimbo et al., 2002). Ainsi en l'absence de sa partie N-terminale, APC est dispersée le long des microtubules (Zumbrunn et al., 2001).

Du fait de sa localisation et de son interaction stabilisante avec les microtubules, il a été avancé qu'APC jouait un rôle dans l'orientation des cellules en cours de migration. Cette hypothèse a été confirmée par Etienne-Manneville et al. qui ont montré chez des astrocytes primaires de rat que l'expression d'une forme tronquée d'APC sans sa partie C-terminale et donc incapable d'interagir avec les microtubules inhibait la réorientation du centrosome lors d'une migration induite par un scratch. Par la suite, Kroboth et al. démontrent dans 3 lignées cellulaires différentes que la mutation d'APC inhibait la formation de protrusion à l'avant des cellules en cours de migration et de ce fait diminuait la vitesse de ces dernières (Kroboth et al., 2007). En plus de cette fonction dans la migration cellulaire, l'interaction d'APC avec les microtubules pourrait également intervenir dans l'orientation des cellules épithéliales mourantes afin d'induire la sortie de ces dernières du côté apical de l'épithélium plutôt que du côté basal (Marshall et al., 2011).

#### APC et le fuseau mitotique

Au vu de son rôle dans la stabilisation des microtubules et sa localisation à leur extrémité (+), la question de savoir si la mutation d'APC avait un rôle direct dans l'instabilité chromosomique observée lors de la majorité des cancers colorectaux s'est rapidement posée. Il fut tout d'abord

observé que pendant les premières étapes de la mitose, APC était localisée au niveau des kinétochores et que les cellules mutantes pour ce gène présentaient un nombre plus important de défauts de ségrégation des chromosomes dû à une connexion inefficiente du fuseau mitotique avec ces derniers (Fodde et al., 2001; Kaplan et al., 2001). Plusieurs équipes remarquèrent que ce défaut pouvait être récapitulé par l'expression du fragment N-terminale d'APC dans des cellules non mutées suggérant un rôle dominant négatif de la forme tronquée d'APC (Green and Kaplan, 2003; Tighe et al., 2004). La manière dont ce fragment exerce cet effet n'est à ce jour pas entièrement élucidée. Cependant une explication possible serait que la formation d'un hétérodimère entre la forme tronquée et totale d'APC, empêche l'interaction de cette dernière avec EB1. En effet cette association semble nécessaire au bon attachement des microtubules aux kinétochores et la mutation d'EB1 conduit à un phénotype très semblable à la mutation d'APC au niveau du fuseau mitotique (Green et al., 2005).

En plus de son rôle au niveau des Kinétochores, il a également été mis en évidence chez la drosophile qu'APC était localisée au niveau du cortex des cellules germinales en cours de division où elle jouerait un rôle important dans l'orientation du fuseau mitotique (Yamashita et al., 2003). Plus récemment, il a été démontré chez *C.Elegans* qu'au cours de la division asymétrique des cellules embryonnaires, APR-1 (Adenomatous polyposis coli protein-related protein 1) était enrichi au niveau du cortex cellulaire antérieur où, en stabilisant l'extrémité (+) des microtubules, il diminuerait les forces de traction exercées par le fuseau mitotique de ce côté de la cellule participant ainsi à son bon positionnement (Sugioka et al., 2018).

Si le rôle d'APC dans la ségrégation des chromosomes n'est pas une surprise au vu de son interaction avec les microtubules, le fait que les défauts associés à sa mutation ne soient pas détectés lors du checkpoint mitotique est plus surprenant. Une explication possible serait que la mutation d'APC altère également ce processus. De manière cohérente avec cette hypothèse, Dikovskaya et al. Ont observé une diminution de la quantité des protéines du checkpoint mitotique BUB1 et BUBR1 au niveau des kinétochores des cellules U2OS à la suite de l'inhibition de l'expression d'APC (Dikovskaya et al., 2007). Cependant, ces résultats vont à l'encontre de ceux observés par Draviam et al. qui ne montrent aucun défaut de localisation de ces deux protéines dans des cellules HeLa traitées avec un siAPC (Draviam et al., 2006). De plus, Dikovskaya et al. décrivent une diminution du nombre de cellules s'accumulant en mitose lors d'un traitement au Taxol ou au Nocodazole à la suite de la déplétion d'APC. Mais là encore ces résultats vont à l'encontre de ceux décrits dans plusieurs publications antérieures (Fodde et al., 2001; Kaplan et al., 2001). Ces contradictions dans les résultats obtenus par différentes équipes sont probablement dues à l'utilisation de lignées cellulaires différentes ou bien à des méthodes de détection plus ou moins

sensibles. Quoi qu'il en soit des recherches supplémentaires restent nécessaires afin de déterminer comment les cellules mutantes APC échappent au checkpoint mitotique.

Par ailleurs, plusieurs équipes ont mis en évidence que l'activation de la voie Wnt/β-caténine pouvait également promouvoir la survie de cellules présentant une anomalie chromosomique. Il a par exemple été démontré que l'expression d'une forme stable de la β-caténine dans des cellules souches embryonnaires de souris conduisait à une augmentation de la survie de ces dernières lors d'un traitement au Nocodazole en permettant à ces cellules d'échapper au checkpoint G2/M (Aoki et al., 2007; Hadjihannas et al., 2006). La capacité des cellules mutantes APC présentant des anomalies chromosomiques à échapper au check point mitotique pourrait donc être dû, au moins en partie, à l'activation de la voie Wnt.

#### *iv. APC : Une protéine de liaison à l'ARN ?*

En 2008, la possibilité qu'APC soit également une protéine de liaison à l'ARN a émergée à la suite de la publication de *Mili, Moissoglu & Macara* (Mili et al., 2008). Dans cette publication, les auteurs démontrent qu'APC est capable d'interagir au niveau de l'extrémité (+) des microtubules avec un groupe d'ARNm spécifiquement localisé dans les pseudopodes à l'avant des fibroblastes en cours de migration. De plus, l'inhibition de l'expression d'APC par un shRNA aboutit à une diminution de l'accumulation de ces ARNms à l'avant de la cellule suggérant que l'interaction avec APC est nécessaire à leur accumulation et/ou ancrage dans cette région. Cependant, aucune information n'est fournie dans ce papier quant au domaine d'APC permettant cette interaction ni sur son rôle fonctionnel. En effet, dans ce modèle l'inhibition d'APC n'entraîne pas de défauts de formation des pseudopodes contrairement à ce qui avait été observé dans des études antérieures. Cinq ans plus tard, la même équipe a démontré qu'APC interagit avec FUS, une protéine de liaison à l'ARN dont la mutation est impliquée dans la sclérose latérale amyotrophique (SLA) (Yasuda et al., 2013). Bien que FUS ne soit pas nécessaire à la localisation d'APC et des ARNs qui lui sont associés, elle semble en revanche nécessaire à la traduction locale de ces ARNms au niveau des pseudopodes. Les auteurs démontrent également que la mutation de FUS, dans leur modèle, conduit à la formation de granules de stress cytoplasmiques caractéristiques de la SLA et que ces granules recrutent préférentiellement les complexes APC-ARN conduisant à la traduction délocalisée de certains de ces ARNs. Mais encore une fois l'implication fonctionnelle de cette observation n'est pas approfondie.

Plus récemment, Preitner et al. ont démontré qu'APC interagissait de manière directe avec l'ARN via son domaine basique. Cette interaction se ferait préférentiellement avec la partie 3'UTR des ARNms et en particulier avec les séquences riches en guanine. Dans ce papier, les auteurs démontrent également dans un modèle neural qu'APC interagit avec l'ARNm de la β2B-tubulin afin

de le diriger vers les axones et que bloquer le site de fixation d'APC sur cet ARNm aboutit à une diminution de la taille du cône de croissance de neurones en culture et à un défaut de migration des neurones corticaux au cours du développement *in vivo* (Preitner et al., 2014).

v. *APC régule la synthèse d'acide rétinoïque au cours de la différenciation intestinale et du développement de l'œil.*

Bien que la possibilité d'utiliser des composés dérivés de l'A.R pour lutter contre l'apparition du cancer colorectal soit investiguée depuis le début des années 80s (M Ward et al., 1978; Wenk et al., 1981), ce n'est qu'en 2004 que la régulation de sa synthèse par APC a été mise en évidence. Cette année-là, Jette et al. démontrent qu'APC régule l'expression de la RDHL (aussi appelée DHRS9) de manière indépendante à la  $\beta$ -caténine (Jette et al., 2004). Ainsi, la mutation d'APC se traduit par un défaut de synthèse de l'A.R dû à une faible conversion du rétinol. La même année, Nadauld et al. Publient que chez le zebrafish, la mutation d'APC et de zRDHB aboutit à un phénotype semblable au niveau de l'épithélium intestinal, caractérisé par un défaut de différenciation des entérocytes (Nadauld et al., 2004). Deux ans plus tard, la même équipe suggère que la diminution de l'expression des RDHs associée à la mutation d'APC est en fait due à la stabilisation de CtBP qui est normalement orientée vers le protéasome par APC (Nadauld et al., 2006a). Ils démontrent également dans un second papier que la diminution de la synthèse de l'A.R suite à la mutation d'APC est responsable de l'augmentation de l'expression de COX-2 qui est observée dans de nombreux adénomes et carcinomes intestinaux (Eisinger et al., 2007).

En 2009, Phelps et al. vont encore plus loin en remettant en cause le modèle classique voulant que l'accumulation nucléaire de  $\beta$ -caténine suite à la mutation d'APC soit l'événement initiateur dans la formation des adénomes du colon (Phelps et al., 2009). En effet, comme d'autres auparavant, ils observent que dans de nombreux cas d'adénomes précoces la seule mutation d'APC, même bi-allélique, ne suffit pas à induire cette accumulation et qu'un événement supplémentaire tel que la mutation de *K-RAS* est nécessaire pour cela. Ainsi, les auteurs suggèrent que l'événement initiateur dans la formation des polypes serait la stabilisation de CtBP qui induirait un défaut de différenciation des cellules de l'épithélium intestinal. Le rôle de l'A.R n'est pas abordé directement dans cette étude mais si l'on fait le lien avec les publications de Nadauld et al., il est probable que la diminution de sa synthèse soit au moins en partie responsable du défaut de différenciation observé à la suite de l'accumulation de CtBP.

Enfin, la même équipe a également mise en évidence que le régulation de la synthèse d'A.R par APC joue un rôle important dans le développement de la rétine (Nadauld et al., 2006b). Dans leur papier, les auteurs démontrent notamment que la mutation homozygote d'APC chez le zebrafish

induit d'important défauts de différenciation des cellules de l'EPR et des photorécepteurs et suggèrent que ces défauts sont plus probablement dus à une carence en A.R qu'à l'augmentation de l'activité transcriptionnelle de la  $\beta$ -caténine. En effet, ils observent que les cellules de l'EPR mutantes APC présentent une importante diminution de l'expression de *Rdh5* et que l'injection d'un morpholino ciblant ce gène permet de copier le phénotype induit par la mutation d'APC au niveau de l'EPR, tandis qu'à l'inverse, un traitement avec de l'A.R restaure le phénotype des zebrafishs mutants APC. Ainsi, les auteurs suggèrent que les défauts observés au niveau de l'EPR chez les patients atteints de PAF, tel que les LPFOs, seraient dus à une diminution de la synthèse d'A.R par les cellules de l'EPR. Toutefois, l'absence de défauts similaires chez les zebrafishs arborant une mutation hétérozygote d'APC ne permet pas d'en être certain. La diminution de la synthèse d'A.R par les cellules de l'EPR porteuses d'une mutation hétérozygote sur APC ainsi que la manière dont cette diminution aboutirait à la formation de LPFOs reste donc à mettre en évidence dans un contexte humain.

Pour conclure, depuis sa découverte au début des années 90s, un nombre impressionnant d'études ont été réalisées sur APC afin de comprendre le rôle joué par ce gène suppresseur de tumeurs dans la cellule. Ces études ont abouti à la découverte d'un nombre non moins impressionnant de partenaires et de fonctions pour APC, dont toutes n'ont pu être abordées ici. Mais au fur et à mesure que notre compréhension au sujet de cette protéine avance, de nouvelles questions se posent. L'une d'entre elles par exemple concerne la manière dont ces différentes fonctions sont coordonnées. En effet, puisque bon nombre de partenaires interagissent avec la même région d'APC et que cette dernière intervient dans tous les compartiments cellulaires, il paraît difficilement concevable qu'elle exerce toute ces fonctions simultanément. Ceci laisse supposer que la cellule a la possibilité d'affecter APC à une fonction plutôt qu'à une autre en contrôlant par exemple sa localisation cellulaire. Différentes phosphorylations semblent notamment être impliquées dans ce processus ainsi que dans le choix des partenaires d'APC en modifiant son affinité pour certains d'entre eux. Cependant, des études supplémentaires vont être nécessaires pour mieux comprendre cet aspect du fonctionnement d'APC.

De plus, bien qu'APC soit exprimée de manière quasi-ubiquitaire, la plupart des études menées à son sujet se sont focalisées sur son rôle dans l'intestin en recherchant systématiquement un lien avec la tumorigénèse. Ces dernières années cependant, comme nous avons pu le voir de plus en plus d'équipes se sont intéressées aux rôles d'APC dans les tissus neuraux où cette protéine est largement exprimée. Ceci a permis de mettre en évidence son implication dans la croissance des axones ainsi que dans la polarisation et la migration de certains types de neurones, suggérant que son rôle dans d'autres tissus que l'intestin mérite d'être plus approfondi.

## 6. Modélisation des défauts associés à la mutation d'APC

### a. Les modèles murins

#### i. Avantages et limites des souris mutantes APC

Le premier modèle de souris mutantes APC, la souris « multiple intestinal neoplasia » (Min), a été généré au début des années 90s par mutagénèse aléatoire à l'ethylnitrosourea (ENU) (Moser et al., 1990; Su et al., 1992). Cette souris, porteuse d'une mutation sur l'exon 851 d'APC, a depuis été intensément utilisée dans le but de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à la tumorigénèse du colon et de tester différentes approches thérapeutiques visant à soigner la PAF et les cancers colorectaux sporadiques. Tandis que les souris homozygotes pour cette mutation ( $Apc^{Min/Min}$ ) décèdent très rapidement au cours du développement embryonnaire, les souris hétérozygotes ( $Apc^{+/Min}$ ) présentent un phénotype semblable à celui des patients atteints de PAF avec cependant quelques différences notables. En effet, bien que ces souris développent en moyenne entre 20 et 100 polypes intestinaux au cours de leur vie, la plupart d'entre eux ne se forment pas au niveau du colon comme ce qui est observé chez les patients mais plutôt au niveau de l'intestin grêle (Moser et al., 1990). De plus, la durée de vie limitée de ces souris, qui décèdent généralement d'anémie dû à des saignements importants au niveau de l'intestin vers l'âge de 120 jours, rend extrêmement rare l'apparition de tumeurs malignes avant le décès de l'animal et ne permet donc pas d'étudier la progression des adénomes jusqu'à ce stade (Halberg et al., 2009). On peut également émettre l'hypothèse que ce temps de vie limité explique la quasi-absence dans ce modèle de certains symptômes extra-intestinaux retrouvés chez les patients tels que les tumeurs desmoïdes. Une autre différence importante avec ce qui est observé chez les patients est l'apparition de tumeurs mammaires chez environ 5% des souris  $Apc^{+/Min}$  (Moser et al., 1993). En effet, bien que la mutation d'APC ou la méthylation de son promoteur soit observée dans plus de 30% des cancers du sein (Furuuchi et al., 2000; Jin et al., 2001), les patients atteints de PAF ne présentent, de manière surprenante, aucune susceptibilité pour ce type de cancer.

Malgré ces différences, la souris  $Apc^{+/Min}$  a permis de faire avancer de manière significative notre compréhension des facteurs influençant l'apparition et la progression du cancer colorectal. Par exemple, la variation du phénotype associé à cette mutation en fonction du fond génétique a permis de mettre en évidence de nombreux gènes modificateurs appelés *Modifiers of Min* pouvant aggraver ou atténuer la polyposé intestinale, fournissant ainsi de nouvelles cibles thérapeutiques pour cette pathologie (Dietrich et al., 1993; Kwong et al., 2007; Nnadi et al., 2012; Silverman et al., 2002).

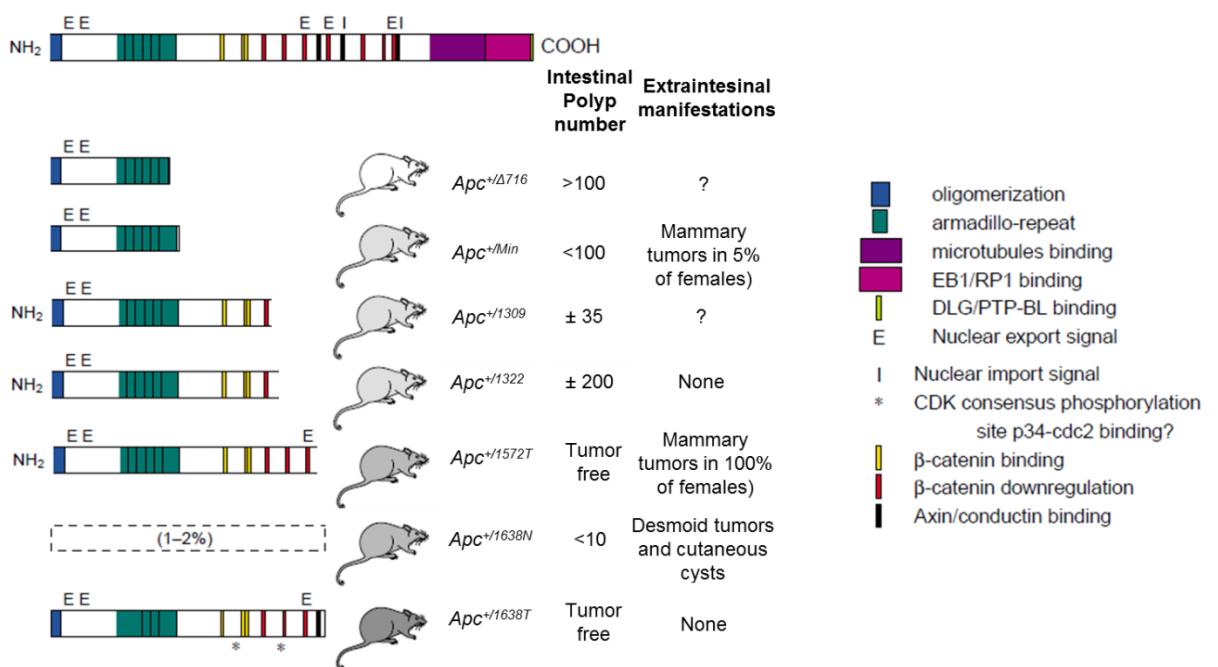
Au cours des 2 dernières décennies, de nombreux autres modèles de souris porteuses de mutation sur APC en aval ou en amont de la mutation *Min* ont été générés avec des phénotypes parfois plus proches de ce qui est observé chez le patient et parfois au contraire très surprenant (**Figure 25**). Les modèles présentant une mutation en amont de celle de la souris *Min* ont généralement un phénotype très semblable à cette dernière avec toutefois un nombre plus ou moins important de polypes intestinaux toujours situés majoritairement au niveau de l'intestin grêle. Il est à noter que le nombre de polypes n'augmente pas de manière systématique avec le raccourcissement de la protéine mais dépend de chaque mutation (Zeineldin and Neufeld, 2013).

La génération de souris porteuses de mutation en aval du codon 851 a donné lieu à la production de phénotypes extrêmement variés et ce parfois pour des mutations très proches. Les souris *Apc*<sup>1638T</sup> et *Apc*<sup>1572T</sup> par exemple, qui expriment une protéine tronquée différente de seulement 66 AAs, présentent des phénotypes très différents. En effet, tandis que la première mutation est viable à l'état homozygote, la seconde induit un arrêt précoce du développement (Gaspar et al., 2009; Smits et al., 1999). De plus, à l'état hétérozygote la mutation *Apc*<sup>1572T/+</sup> n'induit pas la formation de polypes intestinaux mais entraîne en revanche le développement de tumeurs mammaires métastatiques chez 100% des souris femelles, impliquant ainsi l'absence de la partie C-terminale d'APC dans le développement du cancer du sein plutôt que dans celui du cancer colorectal. Ainsi ces 2 modèles présentent un phénotype très éloigné des symptômes observés chez les patients atteints de PAF.

Certaines souris à l'inverse comme la souris *Apc*<sup>1638N/+</sup> ont permis de modéliser plus fidèlement les symptômes de la PAF. Chez ce modèle, la forme tronquée d'APC est quasi indétectable et la mutation aboutie donc à une simple haploinsuffisance d'APC. Cette souris développe significativement moins de polypes intestinaux que la souris *Min* (généralement moins de 10) ce qui lui confère une durée de vie accrue permettant l'observation de tumeurs invasives. De plus, près de 100% de ces souris développent des tumeurs desmoïdes ainsi que des kystes cutanés au cours de leur vie permettant l'étude de ces symptômes (Smits et al., 1998). Enfin, il s'agit également à ce jour du seul modèle murin pour lequel des lésions pigmentées du fond de l'œil ont été rapportées (Marcus et al., 1997, 2000).

D'autres modèles ont également été générés afin de modéliser les formes les plus sévères de la PAF tels que les souris *Apc*<sup>1309</sup> (correspond à la mutation la plus fréquemment retrouvée chez les patients atteints de PAF) et *Apc*<sup>1322</sup>. En effet, chez l'Homme, ces mutations qui se situent en aval de la première répétition de 20 AAs d'APC induisent des symptômes plus importants au niveau de l'intestin. C'est ce qui a conduit à l'élaboration de l'hypothèse « just right » qui veut que la rétention de cette répétition par la forme tronquée d'APC permette seulement une légère augmentation des

signaux Wnt/β-caténine plus propice au développement du cancer colorectal qu'une augmentation massive de l'activité de cette voie de signalisation. Cependant, ces deux modèles de souris ont donné des résultats contrastés. En effet, si la souris *Apc*<sup>1322/+</sup> présente effectivement un nombre plus important de polypes intestinaux que la souris Min (Pollard et al., 2009), la souris *Apc*<sup>1309/+</sup> présente quant à elle moins de polypes (Niho et al., 2003). Les raisons de phénotypes aussi différents entre des souris comportant deux mutations aussi proches demeurent à ce jour inconnus mais elles sont probablement indépendantes d'APC et plutôt dues à des facteurs environnementaux ou à des différences dans les techniques utilisées pour la génération de ces modèles.



**Figure 25. Récapitulatif des principaux modèles de souris mutantes APC** (Modifié à partir Fodde and Smits, 2001).

Enfin, différentes souris mutantes conditionnelles pour *Apc* ont été générées afin d'étudier l'effet de cette mutation dans un tissu en particulier et de contourner la durée de vie limitée de ces animaux. Ces mutations conditionnelles sont généralement basées sur un système Cre/Lox classique et plusieurs souris porteuses de sites LoxP à différentes positions sur le gène *Apc* sont désormais disponibles et peuvent être croisées avec des souris exprimant la Cre sous le contrôle d'un promoteur tissu-spécifique. Ce type de souris a notamment permis de mettre en évidence le rôle d'APC dans le développement de la peau et du thymus ainsi que son rôle dans le cerveau où sa déplétion conduit à l'apparition de troubles cognitifs et de comportements autistiques chez la souris (Kuraguchi et al., 2006; Mohn et al., 2014).

## *ii. Le rat, un modèle plus adapté ?*

Comme nous venons de le voir, la souris mutante *Apc* ne récapitule pas pleinement les symptômes observés chez l'Homme, c'est pourquoi plusieurs équipes ont recherché un modèle plus approprié. Au cours des dernières années, deux rats mutants *Apc* sont apparus et semblent reproduire plus fidèlement la pathologie que les modèles de souris. Le premier d'entre eux, le rat PIRC (Polyposis In the Rat Colon), est porteur d'une mutation sur *Apc* aboutissant à l'apparition d'un codon stop en position 1137. A l'état hétérozygote cette mutation induit chez le rat l'apparition de polype intestinaux préférentiellement au niveau du colon de manière semblable à ce qui est observé chez l'humain. De plus, la durée de vie plus importante de ces rats comparés aux souris mutantes APC permet d'observer la transformation maligne et l'invasion locale de certains de ces polypes bien qu'aucune métastase n'ait encore été observée dans ce modèle. Les rats PIRC présentent également des tumeurs de la mâchoire, un symptôme pouvant être retrouvé chez certains patients. En revanche, aucune description des autres symptômes extra-intestinaux associés à la PAF n'a encore été rapportée mais il est difficile de savoir pour le moment si ces symptômes sont absents ou n'ont simplement pas encore été recherchés (Amos-Landgraf et al., 2007).

Le second modèle de rat appelé KAD porte quant à lui une mutation aboutissant à la synthèse d'une forme tronquée d'APC déplétée de ces 321 derniers AAs. Cette mutation qui ne tronque que l'extrémité C-terminale d'APC n'affecte pas la durée de vie des rats même à l'état homozygote et n'induit pas non plus la formation de polypes intestinaux de manière spontanée. En revanche, ces animaux présentent une sensibilité accrue à la tumorigénèse induite par inflammation du colon. En effet, à la suite d'un traitement avec un agent inflammatoire comme le Dextrane de Sulfate Sodique (DSS) en combinaison avec le carcinogène azoxyméthane, 100% des rats KAD développent des polypes intestinaux avec une distribution le long de l'intestin proche de ce qui est observé chez les patients atteints de PAF. Ainsi, chez ce rat l'apparition d'adénomes dépend entièrement de l'inflammation fournissant un excellent modèle pour l'étude des facteurs environnementaux impliqués dans le développement du cancer colorectal (Yoshimi et al., 2009).

Pour conclure, en plus de refléter de manière plus fidèle les symptômes intestinaux observés chez l'Homme, le rat présente par rapport à la souris un certain nombre d'avantage facilitant l'étude de la PAF. Tout d'abord la taille plus importante de ses intestins permet de laisser croître plus longtemps les adénomes intestinaux afin d'étudier les stades plus tardifs et permet même un suivi endoscopique de ces derniers au cours du temps. Enfin, puisque le polymorphisme d'APC a été associé à la schizophrénie et à un trouble du spectre autistique (Cui et al., 2005; Zhou et al., 2007), de plus en plus d'équipes s'intéressent aux rôles de cette protéine dans le cerveau et nul doute que le

rat qui est déjà largement utilisé pour modéliser les troubles neurologiques sera un modèle de choix pour explorer cet aspect d'APC.

### *b. Les modèles cellulaires*

#### *i. Les lignées cellulaires tumorales*

De très nombreuses lignées cellulaires tumorales mutantes APC sont disponibles. La compagnie « American Type Culture collection » (ATCC) par exemple propose à elle seule plus de 30 lignées différentes porteuses de mutations sur ce gène. La plupart d'entre elles sont évidemment dérivées de tumeurs du côlon mais des cellules provenant d'autres types de tumeurs comme des tumeurs mammaires, des tumeurs du poumon et des tumeurs de l'utérus sont également disponibles (<https://www.lgcstandards-atcc.org/>). L'accessibilité, la facilité de culture et la possibilité de modifier aisément ces cellules ont fait de ces dernières un modèle très utile, notamment pour la découverte de nouveaux composés thérapeutiques et la recherche des mécanismes d'action de traitements déjà connus pour fonctionner *in vivo* (Bracht et al., 2010; Nautiyal et al., 2011). Cependant ces cellules présentent plusieurs inconvénients. Tout d'abord, ces lignées sont des populations clonales et ne représentent donc pas la diversité génétique des cellules cancéreuses *in vivo* qui est un élément important dans la résistance de ces dernières aux thérapies ciblées. De plus, ces cellules sont pour la quasi-totalité dérivées de carcinomes et donc de lésions à un stade déjà avancé où plusieurs mutations additionnelles à l'événement déclencheur de la tumorigénèse se sont accumulées. Elles ne permettent donc pas de modéliser les étapes précoce de la progression tumorale et rendent difficiles l'étude de l'effet d'une mutation en particulier dans ce processus.

Une alternative possible à l'utilisation de ces cellules cancéreuses est la manipulation génétique de lignées cellulaires non mutées à l'aide de shRNA, de plasmides ou du système CRISPR-Cas9 qui permet l'étude plus spécifique de la perte ou du gain de fonction d'un gène donné. Dans le cas d'APC, divers plasmides permettant l'expression de différentes formes tronquées d'APC ainsi que des shRNAs préalablement validés ou encore des ARNs guides (ARNg) permettant de cibler différents exons d'APC avec la Cas9 sont déjà disponibles dans le commerce.

#### *ii. Les CSPhs mutantes APC*

Etonnamment au vu du nombre d'étude menées sur ce gène, peu de lignées de CSPhs mutantes APC ont été décrites à ce jour. L'exemple le plus notable d'utilisation de telles lignées est sans doute l'étude publiée par Crespo et al. en 2017. Les auteurs y démontrent que les organoïdes intestinaux dérivés d'hiPSCs mutantes APC présentent une augmentation de l'activité de la voie Wnt/β-Caténine ainsi qu'une prolifération accrue de l'épithélium intestinal. Dans cette étude les

auteurs démontrent également que la génétidine permet de restaurer spécifiquement le phénotype des organoïdes mutants APC et démontrent ainsi l'utilité de ce type de modèle pour le criblage de composés pharmaceutiques (Crespo et al., 2017).

Concernant l'utilisation d'hESCs mutantes APC, à ce jour et à ma connaissance seules 2 lignées en plus des 2 en notre possession ont été décrite par Yedid et al. en 2016 (Yedid et al., 2016). Dans cet article les auteurs observent une accumulation nucléaire de la  $\beta$ -Caténine dans seulement une de leurs 2 lignées. Bien qu'il soit possible que cette disparité soit due à la différence de position de la mutation sur APC, cela paraît peu probable puisque dans les 2 cas elle se trouve en amont des domaines de répétition de 15 et 20 AAs et induit la synthèse d'une protéine tronquée incapable de se lier à la  $\beta$ -Caténine. Il est donc plus vraisemblable que cette disparité soit due à la différence de fond génétique et/ou à l'acquisition de mutations supplémentaires au cours de la culture. Il est à noter toutefois que les auteurs n'ont observé de second hit sur l'allèle sein d'APC pour aucune des 2 lignées et que par conséquent, ces mutations supplémentaires, si elles existent, affectent probablement d'autres facteurs impliqués dans la régulation de la voie Wnt/ $\beta$ -Caténine. Enfin, on peut constater que dans cette étude les auteurs se sont intéressés à l'impact de la mutation d'APC uniquement au stade pluripotent, stade pour lequel très peu de choses sont connu sur la fonction d'APC ce qui rend difficile l'interprétation de leurs résultats.

## OBJECTIFS

Bien que bénignes, la présence de LPFOs chez les patients atteints de PAF suggère qu'APC intervient dans la régulation de la mélanogénèse et de la prolifération des cellules de l'EPR. L'objectif initial de ma thèse était donc de modéliser ces atteintes rétiniennes associées à la mutation d'APC dans le but de mieux comprendre le rôle de cette protéine dans ces deux phénomènes.

Appréhender le rôle d'APC dans l'EPR pourrait notamment permettre de mieux comprendre les mécanismes régulant la prolifération de ces cellules, phénomène impliqué dans d'autres rétinopathies. En effet, bien que chez une personne saine les cellules de l'EPR ne se divisent quasiment plus une fois le développement de l'œil achevé, il a été observé que ces dernières pouvaient de nouveau entrer en prolifération dans le cadre de certaines pathologies. Cette prolifération peut parfois se révéler bénéfique comme dans certains cas de néovascularisation de la choroïde (NVC) où l'hypertrophie de l'EPR a été associée à une régression de la néovascularisation, mais elle peut également avoir des conséquences délétères lorsqu'elle est associée à une transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) comme c'est le cas chez les patients atteints de vitréorétinopathies (Stern and Temple, 2015). Ainsi, l'identification des mécanismes responsables de l'hypertrophie de l'EPR associée à la mutation d'APC pourrait permettre de déterminer les voies de signalisation à cibler afin de moduler la prolifération de ces cellules.

En parallèle de l'étude de la prolifération cellulaire, déterminer comment la mutation de ce gène aboutit à une synthèse anormale de mélanine dans les cellules de l'EPR devrait également permettre de mieux appréhender la régulation d'un processus qui, jusqu'à présent, a principalement été investigué dans les mélanocytes faute de modèles cellulaires pertinents pour son étude dans l'EPR.

Contrairement aux lignées primaires de cellules de l'EPR qui sont extrêmement difficile à maintenir en culture et aux lignées immortalisées, telle que la lignée ARPE-19, qui présentent une morphologie très différente de ce qui est observé *in vivo* et ne synthétise pas de mélanine (Ablonczy et al., 2011; Voisin et al., 2018), les cellules de l'EPR dérivées de CSPhs présentent l'avantage d'être à la fois accessible en grande quantité et de récapituler la plupart des fonctions des cellules de l'EPR *in vitro*. Par conséquent, leur utilisation pour l'étude du rôle d'APC dans ce tissu était particulièrement adaptée.

Cependant, au cours de mes premiers mois de thèse, nous nous sommes aperçus que les hESCs mutantes APC se différenciaient très difficilement en cellules de l'EPR avec la méthode spontanée. C'est pourquoi, après avoir testé sans succès le protocole publié par Leach et al. (Leach et

al., 2015), nous avons décidé de mettre au point un nouveau protocole de différenciation dirigée avec pour objectif qu'il soit suffisamment efficace pour se passer de la sélection manuelle des zones pigmentées et ainsi permettre l'automatisation complète de la différenciation des cellules de l'EPR. De plus, pour que ce protocole soit rapidement utilisable dans le cadre des projets de thérapies cellulaires menées par notre équipe (**Annexe 1**), un autre élément pris en compte lors de sa mise au point a été d'utiliser des composés facilement transférables en clinique. A notre connaissance, il s'agit là du premier protocole de différenciation automatisé pour ce type cellulaire.

En parallèle, afin d'avancer mon projet initial j'ai générée une lignée d'hESCs mutante APC isogénique à l'aide de la technologie CRISPR/Cas9. S'agissant de la première utilisation de cette technologie au sein d'I-STEM, ceci a nécessité la mise en place de différents outils permettant l'isolation et la caractérisation des cellules mutantes après transfection.

Enfin, une fois le protocole de différenciation dirigé mis au point, j'ai pu finalement différencier les hESCs mutantes APC en cellules de l'EPR et caractériser leur phénotype en recherchant notamment chez ces cellules un défaut de pigmentation et de prolifération en lien avec ce qui est observé chez les patients atteints de PAF.

## RESULTATS

### I. Mise au point d'un protocole automatisé pour la différenciation des cellules de l'EPR

#### 1. Résultats

Comme évoqué dans l'introduction, la capacité des CSPhs à se différencier spontanément en cellules de l'EPR combinée à la possibilité de facilement reconnaître et sélectionner ces cellules via leur morphologie et leur pigmentation a rapidement permis l'obtention d'une population pure de cellules de l'EPR dans des conditions de bonnes pratiques de fabrication. Ces cellules ont par la suite pu être greffées chez des patients souffrant de pathologies rétiennes impliquant une atrophie ou un dysfonctionnement de l'EPR dans le cadre de divers essais cliniques avec des premiers résultats encourageants (da Cruz et al., 2018; Kashani et al., 2018; Mandai et al., 2017a; Schwartz et al., 2016). Cependant la méthode de différenciation spontanée étant longue et fastidieuse, il semble difficile de l'utiliser à grande échelle pour une production industrielle, ce qui sera nécessaire à l'avenir surtout dans le cadre d'une pathologie affectant autant de patients que la DMLA (1,5 millions de personnes en France et 288 millions dans le monde d'ici 2040 (Wong et al., 2014)). C'est pourquoi, au cours de la dernière décennie plusieurs équipes ont cherché à améliorer la rapidité et l'efficacité de la différenciation des cellules de l'EPR en se basant notamment sur les études développementales réalisées chez le zebrafish, le xénope et la souris. Cependant, tandis que ces protocoles devenaient de plus en plus efficaces jusqu'à permettre l'obtention d'une population pure de cellules de l'EPR sans enrichissement manuel ils devenaient également de plus en plus complexes avec l'utilisation de multiples cytokines, petites molécules et autres suppléments qui, ensemble, vont difficilement satisfaire les critères de bonne pratique de fabrication. De plus, jusqu'à aujourd'hui aucun protocole automatisé n'a été décrit. Or, la différenciation manuelle, dans le cadre d'une production à grande échelle et d'une commercialisation, présente une variabilité et des coûts trop importants.

Dans notre étude, nous démontrons que l'utilisation séquentielle de seulement 3 composés, la Nicotinamide, l'Activine A et le CHIR99021, sans étapes de formation de corps embryonnaires, permet de récapituler les principales étapes de la rétinogenèse et d'améliorer suffisamment l'efficacité de différenciation des cellules de l'EPR pour permettre l'obtention d'une population pure sans enrichissement manuel. Ce protocole simple et efficace nous a permis d'automatiser la différenciation de ces cellules à l'aide d'un robot présent à I-STEM, le Compact Select (Sartorius). Notre laboratoire ayant préalablement publié sa capacité à maintenir et à amplifier des CSPhs avec

ce même automate (Archibald et al., 2016), nous sommes désormais en mesure de complètement automatiser le procédé de différenciation des cellules de l'EPR, de la décongélation des CSPhs jusqu'au banking des cellules différencierées prêtes à l'emploi. Ce protocole permet ainsi d'envisager la production à grande échelle de cellules de l'EPR dérivées de CSPhs avec un coût et une variabilité réduite pour des applications de thérapie cellulaire mais également de criblage à haut débit avec de larges banques de composés thérapeutiques.

## ARTICLE:

# **Automation of human pluripotent stem cell differentiation toward retinal pigment epithelial cells for large-scale productions**

Florian Regent<sup>1,2</sup>, Lise Morizur<sup>1,2,3</sup>, Léa Lesueur<sup>1,2,3</sup>, Walter Habeler<sup>1,2,3</sup>,  
Alexandra Plancheron<sup>1,2,3</sup>, Karim Ben M'barek<sup>1,2,3</sup>, Christelle Monville<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>INSERM U861, I-Stem, AFM, Institute for Stem cell Therapy and Exploration of Monogenic diseases, 91100 Corbeil-Essonnes, France;

<sup>2</sup>UEVE U861, I-Stem, AFM, Institute for Stem cell Therapy and Exploration of Monogenic diseases, 91100 Corbeil-Essonnes, France;

<sup>3</sup>CECS, I-Stem, AFM, Institute for Stem cell Therapy and Exploration of Monogenic diseases, 91100 Corbeil-Essonnes, France;

## Automation of human pluripotent stem cell differentiation toward retinal pigment epithelial cells for large-scale productions

Florian Regent<sup>1,2</sup>, Lise Morizur<sup>1,2,3</sup>, Léa Lesueur<sup>1,2,3</sup>, Walter Habeler<sup>1,2,3</sup>, Alexandra Plancheron<sup>1,2,3</sup>, Karim Ben M'barek<sup>1,2,3</sup>, Christelle Monville<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>INSERM U861, I-Stem, AFM, Institute for Stem cell Therapy and Exploration of Monogenic diseases, 91100 Corbeil-Essonnes, France;

<sup>2</sup>UEVE U861, I-Stem, AFM, Institute for Stem cell Therapy and Exploration of Monogenic diseases, 91100 Corbeil-Essonnes, France;

<sup>3</sup>CECS, I-Stem, AFM, Institute for Stem cell Therapy and Exploration of Monogenic diseases, 91100 Corbeil-Essonnes, France;

Correspondence should be addressed to Christelle Monville: [cmonville@istem.fr](mailto:cmonville@istem.fr)

**Abstract:** Dysfunction or death of retinal pigment epithelial cells is involved in some forms of Retinitis Pigmentosa and in age-related macular degeneration (AMD), the leading cause of blindness in developed countries. Since there is still no cure for most patients with these diseases, the transplantation of RPE cells derived from human pluripotent stem cells (hPSCs) represents an attractive therapeutic alternative. First attempts to transplant hPSCs derived RPE cells in AMD patients demonstrated the safety and suggested the potential efficacy of this strategy. However, it also highlighted the need to upscale the production of the cell material to be grafted at an industrial level to treat the millions of potential patients. Automated cell culture systems, that are currently used to amplify hPSCs, are necessary to change the scale of cell production. In the present study, we developed a protocol amenable for automation that combines in a sequential manner Nicotinamide, Activin A and CHIR99021 to direct the differentiation of hPSCs into RPE cells. This novel differentiation protocol combined with the use of cell culture robots open new vistas for the production of large batches of RPE cells while maintaining a high cell purity and functionality. Such methodology of cell culture automation could therefore be applied to various differentiation processes in order to generate material suitable for cell therapy.

**Key words:** cell therapy, regenerative medicine, human pluripotent stem cells, retinal pigment epithelial cells, age-related macular degeneration, retinitis pigmentosa.

### Introduction

Human pluripotent stem cells (hPSCs), including human embryonic stem cells (hESCs) and human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) are characterized by unlimited self-renewal and their ability to differentiate into any cell type. Due to these properties, extensive efforts have been done to use them as a source material for cell therapy to repair damaged tissues. At the forefront of cell therapy,

the replacement of retinal pigment epithelium (RPE), the monolayer of pigmented cells localized between the neural retina and the choroid, acts as a proof of concept. RPE plays crucial roles in sight mainly by contributing to the blood/retina barrier, absorbing light energy but also by transporting nutrients such as glucose and retinol from the blood to the photoreceptors [1]. Therefore, dysfunction or loss of RPE may engender the secondary loss of photoreceptors. RPE cells are altered in 5% of cases of Retinitis Pigmentosa (RP, a group of rare hereditary diseases) and in Age-related Macular Degeneration (AMD) [2,3]. AMD is the leading cause of blindness in developed countries with more than 150 million people affected worldwide, a figure that will increase in the coming years [4]. It can be classified into two groups, dry or wet, based on the presence of choroidal neovascularization. While the understanding of the molecular mechanisms underlying wet AMD, which accounts for approximately 10-15% of AMD patients, led to the development of effective anti-VEGF drugs, there is still no treatment for dry AMD and for most of RPs [5,6]. As such, the transplantation of RPE cells derived from human pluripotent stem cells (hPSCs) represents an attractive strategy for treating retinal degenerative diseases [7,8].

hPSCs spontaneously differentiate into RPE cells after removal of basic fibroblast growth factor (bFGF), used to maintain the pluripotency state, from the culture medium [9-11]. The distinctive cobblestone morphology of RPE cells as well as their pigmentation allow to manually collect pigmented areas that appear upon differentiation of hPSCs to obtain a pure population of RPE cells. Such approach of RPE cells production is used as cell replacement material in on going and planned clinical trials [12-15]. However, this spontaneous method remains fastidious, inefficient and time consuming (8 to 12 weeks of hPSCs differentiation) making it incompatible with the industrial large-scale production which is required to treat the millions of potential patients.

During the last ten years, several teams have developed differentiation protocols based on developmental studies made in *xenopus*, zebrafish and mouse to improve RPE differentiation, with the use of various cytokines and/or small molecules. Among those, Idelson et al. (2009) notably showed that the sequential use of Nicotinamide (NIC) and Activin A, a member of the TGF- $\beta$  superfamily factors, improves RPE differentiation although the mechanisms by which NIC improves neural and eye field specifications remained elusive [16,17]. However, this protocol still requires the aggregation of hPSCs into 3 dimensional (3D) structures called embryonic bodies (EBs). EBs are hardly compatible with automation and large-scale productions due to the heterogeneity of such 3D structures and the additional manipulations required to move from adherent to 3D culture and vice versa. Many other research teams have since published protocols that improve the generation of functional hPSCs derived RPE cells by combining the use of an increasing number of cytokines and small molecules [18-20]. One of the quickest and most efficient was published by Buchholz et al. in

2014 [21]. As RPE and neural retina progenitors (NRPs) have the same embryonic origin, they combined a protocol published by Lamba allowing the obtention of 80% of NRPs [22] with previously described RPE inducing factors such as Nicotinamide and Activin A. Using this method, they obtained 78% of cells expressing the pigmentation marker PMEL17 after 14 days of differentiation. One year later the same team published that the use of CHIR99021, an activator of the canonical Wnt pathway, at the end of the differentiation, increased RPE cells derivation and allowed bypassing manual enrichment of pigmented cells [23]. It is, however, important to note that even if nearly all the cells express PMEL17 at day 14 with this protocol (97.7%), a homogenous epithelium of cuboidal and pigmented cells is not observed until day 49 and the banking of RPE cells is only performed several weeks after (Day 84) [24].

Therefore, although the differentiation of hPSCs into RPE cells became more efficient during the last years, it remains a long and laborious process requiring meticulous manipulations from hPSCs thawing to RPE cells banking. Since many cell culture parameters, such as seeding homogeneity or the time spent by the cells out of the incubator, impact on the proliferation and the differentiation of hPSCs, manual processing implies operator to operator variability [25,26]. Consequently, the quality of hPSCs and the efficiency of their differentiation into RPE cells are currently highly dependent on technician skills. In this regard, automation should not only allow scaling up the production of RPE cells but should also increase its robustness. It could consequently enable larger and more reliable cell production for clinical and disease modeling applications. Robots, such as Cell<sup>host</sup> system or CompacT SelecT system, as well as appropriate programing were already developed for the amplification of hPSCs. Differentiation into mesenchymal and neural stem cells has been also implemented in such systems [27-32]. Until recently, the requirement of a manual enrichment to obtain a pure population of RPE cells prevented the use of these automated systems for the differentiation of this cell type. However, the recent development of protocols allowing efficient differentiation of hPSCs into RPE cells offers now the possibility to automate the production of these cells.

Thus, our aim was to develop a fully automated process allowing the large-scale production of hPSCs derived RPE cells. Considering that the use of numerous growth factors and small molecules on a large scale could be very expensive, especially for an automated process which requires significant dead volumes, we implemented a simplified RPE differentiation protocol amenable for automation that only requires the treatment of hPSCs with NIC, Activin A and CHIR99021 in a sequential manner. Our protocol recapitulates the main steps of retinal development and is sufficient to obtain a pure population of RPE cells without manual enrichment. We then programmed a culture robot to automate this protocol in order to upscale the production process. 16 billion of mature and

functional RPE cells could now be produced within 12 weeks with only one round of production. Such efficient and reproducible automated protocol should be useful for the treatment of the millions of patients affected by RPE associated retinal degeneration.

## Materials and Methods

### Manual hESCs culture and RPE cell differentiation

Clinical-grade hESC line RC-09 [13,33] was used and cultured in feeder free conditions using mTeSR™1 Medium (StemCell technologies) and hESC qualified Matrigel (Corning) (**Figure S1**). Cells were banked at passage 36 and used for RPE differentiation between passage 38 and 45. Cells were plated at  $50 \times 10^3$  cells per  $\text{cm}^2$  and grown until they reached 80 percent of confluence before switching to a differentiation medium composed of Dulbecco's modified Eagle's medium (high glucose, Thermo Fisher Scientific) supplemented with 50  $\mu\text{M}$   $\beta$ -mercaptoethanol, 1x minimum essential medium–nonessential amino acids (Thermo Fisher Scientific) and 20% (D0-D42) or 4% (after passage 1) of knockout serum replacement (KSR, Thermo Fisher Scientific). During all the differentiation process the medium was changed every 2 days.

RPE cells were obtained by spontaneous differentiation of hESCs as previously described [25]. Briefly, hESCs were grown to confluence and switched to a FGF-2 deprived culture medium. Pigmented patches were then dissected under a stereomicroscope with a fine 15° ophthalmic knife and replated in culture dishes coated with hESC qualified Matrigel (corning).

For the referred “directed differentiation” protocol, 10mM Nicotinamide (Sigma), 100ng/ml Activin A (Peprotech) and 3 $\mu\text{M}$  CHIR99021 (Tocris) were added sequentially to the basal differentiation medium at specific time point (**Figure 2A**). On day 42, cells were incubated with TrypLE Reagent (Thermo Fisher Scientific) for 10 minutes to remove cell contaminants, then washed with PBS and re-incubated with TrypLE Reagent for 20 minutes to allow RPE dissociation. Cells were then seeded at a final dilution of 1/3 or 1/5 in dishes coated with hESC qualified Matrigel (Corning).

Mature RPE cells were dissociated and cryopreserved in liquid nitrogen vapors with CryoStor CS10 medium (StemCell technologies) at passage 1 or 2.

### Automated RPE differentiation process

The CompacT SelecT (Sartorius) is a fully automated cell culture platform which allows the expansion and differentiation of large batches of adherent cells in a controlled environment (**Figure S2**). The system allows the automation of media changes and cell passaging as well as the monitoring of culture vessels with the automated live-cell imaging system IncuCyte (Sartorius). Contrary to the manual protocol, cells were not centrifuged after dissociation but were directly seeded into new

flasks with enough medium to ensure that the final concentration of TryPLE reagent in the daughter flasks did not exceed 5%. The automated process is presented in **Figure 3**.

### Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction

Total RNAs were extracted using RNAeasy Plus Mini kit (Qiagen) and cDNA synthesized using SuperScript III (Invitrogen). Quantitative real-time RT-PCR was performed using a Quant Studio 12K flex (Applied Biosystems) with HiGreen qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific). Primer sequences are listed in **Supplementary Table 1**. Experiments were performed with at least three technical replicates per plate and expression levels were normalized to 18S. Relative expression compared to hESCs gene expression levels were determined by calculating the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

### Immunostaining

RPE cells were grown on Matrigel-coated 96 or 24-well plates. Adherent cells were fixed in 4% PFA for 10 min at room temperature (RT) and rinsed 3 times with PBS. After 30 min in blocking solution (10% FBS in 0.1% Triton PBS) at RT, cells were incubated with primary antibodies overnight at 4°C (as listed in **Supplementary Table 2**). After 3 washes in PBS, appropriate Alexa Fluor-conjugated secondary antibodies (Invitrogen) were added at 1:500 for 1h at RT in presence of DAPI (Invitrogen, 1: 5,000).

### Image acquisition and analysis.

Images were acquired with an Axio observer Z1 microscope (Zeiss) with a Hamamatsu ORCA-flash 4.0 camera and a spinning disk unit (Yokogawa CSU-X1-A1N-E; Camera evolve, EMCCD 512) with Metamorph software or with a LSM-800 confocal microscope (Zeiss) with Zen software. Images were exported, analyzed and processed with Fiji software. For zx images, xy stacks (0.33  $\mu$ m z step size) covering cell width were resliced in zx. The quantification of pigmented areas was performed after manual delimitation of culture dish areas using Fiji software. Pictures were then binarized to 8-bit images using a fixed intensity threshold and the black area fraction was measured.

### Flow cytometry

Cells were detached from culture plates, fixed in 4% PFA for 10 min at RT and permeabilized with PBS containing 0.1% Triton for 30 min before labeling with TYRP1 antibody for 1 hr at RT. Labeling of the cell surface markers TRA-1-81 and SSEA4 was performed on freshly dissociated cells for 15 min at 4°C. Cells were then incubated with fluorochrome-conjugated primary antibody for 30min at RT and rinsed twice with PBS. The antibodies used and their working dilutions are listed in **Supplementary Table 2**. Cells were analyzed using a cell MACSquant analyzer (MiltenyiBiotec). Gates were drawn according to fluorescence minus one (FMO) controls or on samples labeled with isotype control antibodies. Data were analyzed using FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR).

### **Phagocytosis assay**

hESCs derived RPE cells were exposed for 3 hours to purified FITC-labeled photoreceptor outer segments of pig (gift from Dr. E. Nandrot). After washing with PBS, cells were fixed in cold methanol and labelled with DAPI. Images were taken with LSM-800 confocal microscope (Zeiss). hESCs derived RPE cells were also exposed to pHrodo Green Zymosan Bioparticles (Thermo Fisher Scientific) overnight. These particles are pH-sensitive and become fluorescent after cell entry and phagosome formation. As a negative control, phagocytosis assays were performed at 4°C to block the phagocytic process. Plates were then read using a microplate reader (Clariostar-BMG LABTECH) and values were normalized to DAPI intensities.

### **VEGF quantification by ELISA assay**

hESCs derived RPE cells were grown on Transwell membrane (Corning) coated with Matrigel. Cell culture supernatants from the cell apical and basal sides were collected each week. VEGF measurements were done in triplicate using the human VEGF Quantikine ELISA kit (R&D System) according to manufacturer instruction.

### **Statistical analysis**

All experiments were performed in triplicate. Summary statistical analyses were performed in XLSTAT software. Comparisons between experiments were performed using the unpaired t-test and statistical significance was established as \*p < 0.05, \*\*p < 0.01.

## **Results**

### **Sequential use of Nicotinamide, Activin A and CHIR99021 improves RPE differentiation by recapitulating the main steps of retinal development**

In an effort to simplify previous directed differentiation protocols for automation, we decided to test whether the simple use of NIC, Activin A and CHIR99021 in a sequential manner (referred as “directed protocol”), without the additional cytokines used by Leach et al. [23], improves RPE differentiation of adherent hESCs enough to bypass manual enrichment (**Figure 2A**). We compared efficiency of this “directed protocol” with the classical spontaneous one.

We first checked whether the sequential use of NIC, Activin A and CHIR99021 could recapitulate the main steps of retinal development by evaluating the expression of markers of the early eye field stage, optic vesicle stage and immature RPE cells at different time points during the differentiation (**Figure 1A**). The use of NIC for the first 7 days of differentiation significantly enhanced the transient expression of the early eye field transcription factors SIX homeobox 3 (*SIX3*) and Retinal homeobox (*RAX*) concomitantly to a higher decrease of *NANOG* expression at mRNA level when compared to the spontaneous protocol (p<0.01; **Figure 1B**). This eye field specification was confirmed at the

protein level with the co-expression of the LIM homeobox 2 (LHX2) and the Paired box 6 (PAX6) proteins by most cells at day 7 after NIC treatment ( $86.8\% \pm 4.3\%$ ,  $n = 3$  **Figure 1C**). Overall, our data suggested that the addition of NIC for 7 days promotes the exit of hESCs from their pluripotent state toward the eye field lineage.

Consecutive treatment with Activin A from day 7 to day 14 significantly increased the expression at mRNA levels of two transcription factors involved in optic vesicle patterning, the visual system homeobox 2 gene (*VSX2* or *CHX10*) and the melanocyte inducing transcription factor (*MITF*), when compared to spontaneous differentiation (**Figure 1B**,  $p \leq 0.05$ ), with a peak expression at day 14 before the drug switch for VSX2. Concomitantly, both *RAX* and *SIX3* mRNA levels were found decreased. Induction of the optic vesicle markers VSX2 and MITF was confirmed by immunofluorescence assays. On day 10, cell patches co-expressing these two proteins were observed (**Figure 1D**). On day 14, by contrast, cells expressing VSX2 were distinct from those expressing MITF, suggesting rapid co-repression of these two genes as described previously (**Figure 1E**) [34,35].

Finally, activation of the canonical WNT signaling pathway by CHIR99021 treatment from day 14 to day 35-42 induced RPE commitment as seen by the acute decreased expression of VSX2 mRNA levels (**Figure 1B**). By contrast, the spontaneous differentiation did not significantly modified gene expression after day 10. *MITF* expression is significantly upregulated in the directed protocol when compared to the spontaneous one ( $p < 0.01$ ). Immunostaining assays confirmed the absence of VSX2<sup>+</sup> cells at day 21 and the increased number of MITF<sup>+</sup> cells ( $87.5\% \pm 12.5\%$ ) (**Figure 1F**). At this stage putative RPE precursors MITF-positive cells emerged and organized around 3D structures that did not express MITF and VSX2 (**Figure 1F**).

We then determined the purity of hESC-derived RPE cell population after 6 weeks of differentiation. A large majority of the culture dish with cells exposed to the directed protocol ( $72.96\% \pm 1.94\%$  of the culture area,  $n = 3$ ) was covered by pigmented cells on day 42 (**Figure 2B** and **2C**). In contrast, only isolated patches of pigmentation were visible with the spontaneous protocol ( $3.481\% \pm 1.12\%$  of the growth area) as reported in a previous study [11] (**Figure 2B** and **2C**). Importantly, the vast majority of cells obtained after 42 days of differentiation co-expressed PAX6 and MITF ( $82.2\% \pm 3.2\%$ ,  $n = 3$ ), two markers of RPE cells (**Figure 2D**).

Taken together our results indicate that the sequential use of Nicotinamide, Activin A and CHIR99021 recapitulates the main steps of retinal development and efficiently directs hESCs into a highly-enriched RPE population within 42 days compared to the spontaneous differentiation.

**Directed protocol allows obtaining a pure population of RPE cells without manual enrichment and automation of the differentiation**

Using the “directed differentiation” protocol, we set up a fully automated process by performing media changes and enzymatic passaging using the CompacT SelecT automation platform. This automated cell culture platform is composed of a flask incubator, bar-coded flasks for cell process tracking, multiple connected pumps to dispense culture media, a six-axis anthropomorphic robotic arm and a live-cell imaging system (Incucyte) (**Figure 3 and S2**).

RPE cells form a cohesive epithelium in culture that requires long incubation times with dissociation reagents to be dissociated into single cells. In order to eliminate a maximum of cell contaminants we took advantage of this characteristic by performing a differential dissociation treatment with TrypLE Express (**Figure 3**). We were able to remove the vast majority of unpigmented cells that are less adherent than RPE cells on day 42 with a first short incubation of 10 minutes with TrypLE Express followed by a rinse. A second enzyme incubation of 35 minutes then enabled the detachment and dissociation of RPE cells.

As the automated system does not include any centrifuge, it was impossible to eliminate the TrypLE used to dissociate RPE cells. Thus, we assessed if the final 5% of TrypLE remaining in the medium after passaging did not affect the re-adherence and the growth of the cells. No difference between cells replated in presence of 5% of TrypLE or after a centrifugation step was observed (data not shown). We also checked that the presence of TrypLE did not affect RPE identity and once again no difference was detected in RPE gene expression between enzymatic passaging with or without centrifugation (**Figure 4B**).

After 2 automatized passages,  $94.7\% \pm 0.2\%$  ( $n = 3$ ) of cells co-expressed the two transcription factors PAX6 and MITF (**Figure 4A**) indicating a homogenous population of RPE cells comparable with the one obtained after manual enrichment [13]. Additional immunostaining showed that these cells also expressed RPE markers EZRIN ( $95.0\% \pm 2.8\%$ ,  $n = 3$ ), BESTROPHIN ( $89.4\% \pm 3.9\%$ ,  $n = 3$ ), Zonula occludens-1 (ZO-1) ( $99.3\% \pm 0.4\%$ ,  $n = 3$ ) and MER proto-oncogene, tyrosine kinase (MERTK) ( $97.1\% \pm 1.1\%$ ,  $n = 3$ ) (**Figure S3**). The gene expression of late RPE markers such as RPE65 and CRALBP was also detected by RTqPCR at a similar level of that was observed using the manual spontaneous differentiation protocol (Fig.4B). We further characterized the cell population by flow cytometry and found that  $96.8\% \pm 1.9$  ( $n = 3$ ) of the cells expressed the pigmentation marker tyrosinase related protein 1 (TYRP1) at passage 2 (**Figure 4C**).

All together these data demonstrate that we were able to obtain pure *bona fide* RPE cells from hESCs in an automated system without loss of identity.

**RPE obtained by automated differentiation are mature and functional.**

Important issues concerning cells differentiated from hPSCs are their maturity and functionality. As an indicator of epithelial maturity, we evaluated the apico-basal polarization of specific RPE markers. As expected, RPE cells homogeneously expressed the microvilli protein EZRIN, the tight junction marker ZO-1 and the tyrosine kinase receptor MERTK at their apical membrane while the calcium activated chloride channel, BESTROPHIN was localized at the baso-lateral compartment (**Figure 5A**).

One of the most important functions of RPE cells is the phagocytosis of the outer segments shed by the photoreceptors. To determine whether the cells differentiated according to our directed protocol on the automated cell culture platform were functional, we assessed their ability to phagocytose pig fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled photoreceptor outer segments (**Figure 5B**) and quantified the fluorescence signal of pH-sensitive particles that become fluorescent after cell entry and phagosome formation (**Figure 5C**). RPE cells incubated with pH-sensitive particles at 37°C present a 3.2-fold increase in fluorescence intensity compared to cells incubated at 4°C, a temperature at which phagocytic process is blocked. Moreover, using a permeable support to separate apical and basal extracellular compartments we measured the polarized secretion of vascular endothelial growth factor (VEGF) by hESCs derived RPE cells. We observed a progressive polarization of VEGF secretion starting from 3 weeks of culture with a preferential basal secretion (**Figure 5D**).

All these results suggest that RPE cells differentiated from hPSCs using a fully automated protocol are functional *in vitro*.

#### **RPE cells differentiated using CompacT SelectT automate can be amplified until passage 3 to produce large banks of cells.**

Previous studies showed that RPE cells derived from hPSCs had a limited amplification potential before they undergo an epithelial-mesenchymal transition (EMT) [36,37]. In line with these studies, RPE cells obtained from an automated production adopted a mesenchymal phenotype starting from passage 4 (**Figure 6A**) despite the maintenance of the expression of the RPE markers *MITF* and *BEST*. This microscopic observation is correlated with the rising of mesenchymal markers *LUM* and *FN1* starting from passage 5 ( $p<0.01$ ; **Figure 6B**). This suggests an EMT transition of RPE cells, which however maintain an RPE identity. Consequently, we decided to bank our cells at passage 2 using an automated cell banking system called Fill-it (Sartorius) to obtain bona fide RPE at passage 3 after thawing.

#### **Discussion**

Since Klimanskaya et al. first showed that hESCs spontaneously differentiate into RPE, extensive efforts have been made to increase speed and efficiency of the differentiation protocol [16,18,19,21]. Previous works described that the sequential use of NIC and Activin A allowed

increasing EB commitment into retinal lineage. In another hand, Leach et al. showed that the same factors, in addition to many others including bFGF, Noggin, DKK1, Insulin Growth Factor (IGF) -1, CHIR99021, B27 and N2 supplements, increased RPE differentiation of human pluripotent stem cells [23]. By contrast, we described in this study that the use of only 3 cytokines and small molecules (NIC, Activin A and CHIR99021) in a sequential manner allowed obtaining a pure population of RPE cells without 3D culture step and manual dissection of pigmented foci.

As previously described [16,21], the use of Nicotinamide quickly reduced the expression of pluripotent markers, suggesting the rapid exit of pluripotent state, while increasing eye field gene expression in treated cells. In this study, Activin A increased both expression of the neural retina marker VSX2 and the RPE marker MITF. These two markers are initially co-expressed by the same cells at day 10 suggesting that at this stage the cells could be bipotent [38] and able to give rise to both RPE and neural retina progenitors. But quickly, two subpopulations of cells expressing either one of these two genes appeared. This result is consistent with the known role of VSX2 on MITF repression during optic vesicle patterning [34]. The increased VSX2 expression following Activin A treatment is however surprising as it is known to induce RPE specification rather than neural retina [39]. This result could be due to the endogenous expression of bFGF that positively regulates the expression of VSX2. The simultaneous use of a FGF inhibitor, such as SU5402, already used in previous described protocol, may be necessary at this stage to repress neural retina markers [40]. The presence of cells expressing only VSX2, meaning that they are potentially engage in the neural retinal lineage, could be problematic at this stage. However, the later use of the small molecule CHIR99021 rapidly leads to the acute decrease of VSX2 expression concomitant with an increased expression of MITF, meaning that the activation of the Wnt/β-catenin pathway at this stage induces the death of VSX2 positive cells or their conversion into RPE precursors. It is also possible that CHIR99021 treatment induces the differentiation of VSX2 positive cells into other mature lineages that are further eliminated by differential dissociation.

This “directed protocol” enabled us to obtain 87.5% of RPE precursors that express MITF on day 21. However, we decided to allow them to mature until they form a cohesive epithelium before performing the first passage on day 42 in order to carry out a differential dissociation and eliminate the last cell contaminants without manual enrichment. Compared with the “14-days method” published by Foltz et al. [24], these 42 days of differentiation could seem long, but despite we performed the first passage several weeks later we bank RPE cells at the same time (D84), suggesting that the removal of factors other than NIC, Activin A and CHIR99021 doesn’t delay the overall production of RPE cells.

We then used CompacT SelecT system to scale up and automate RPE differentiation. We showed that using this automate we are able to obtain a pure population of hESC-derived RPE cells that are polarized and functional after two passages. Moreover, we assessed that these cells could be frozen, thawed and amplified. We observed that RPE cells differentiated using this automated protocol can't be maintained in culture more than 3 passages before starting an EMT, but this number of passages might be extend as previously described by adding ROCK inhibitor in the culture medium [36].

Anyway, this limited number of passages does not prevent the generation of large banks of RPE cells. Indeed, as the RPE cell density is about  $1 \times 10^6$  cells/cm<sup>2</sup> at confluence, it is theoretically possible to produce about 16 billion of RPE cells at passage 2 per round of differentiation with the automated process described in **Figure S4**. A bank of this size is much larger than those previously described by us and others [13,18,41], and could be produced by a single operator using CompacT selecT except for the banking step. Moreover, the use of HYPERflask (Corning) with a growth area of 1720 cm<sup>2</sup> could even increase the number of cells produced per bank.

Considering that  $1 \times 10^5$  RPE cells are currently used to graft a human eye [14,15], the automated process described here should allow to produce enough cells to treat several thousands of patients with retinal degeneration even if some steps of the production, such as the simultaneous banking of a huge numbers of cryovials, remain challenging. However, before to use it for clinical application our protocol must be modified to bring it into compliance with Good Manufacturing Practice (GMP) guidelines. For example, Matrigel has to be replaced by a xenofree matrix. In addition, the qualification of the CompacT SelecT system for clinical applications is a complicated procedure, even if it has been already done by others [42].

In conclusion, following the previously published amplification of hPSCs using CompacT SelecT automate [43], we described a fully automated RPE cells differentiation process from the hPSCs thawing to the banking of differentiated cells. Such automated process is a step towards the scale up and the industrialization of RPE differentiation that will be necessary to treat large numbers of patients. Finally, we also want to draw reader's attention to the fact that any differentiation protocol that doesn't require 3D culture or manual selection can theoretically be adapted to the CompacT SelecT culture system opening new perspectives concerning the scale up and the industrialization of the production of many cell types differentiated from hPSCs.

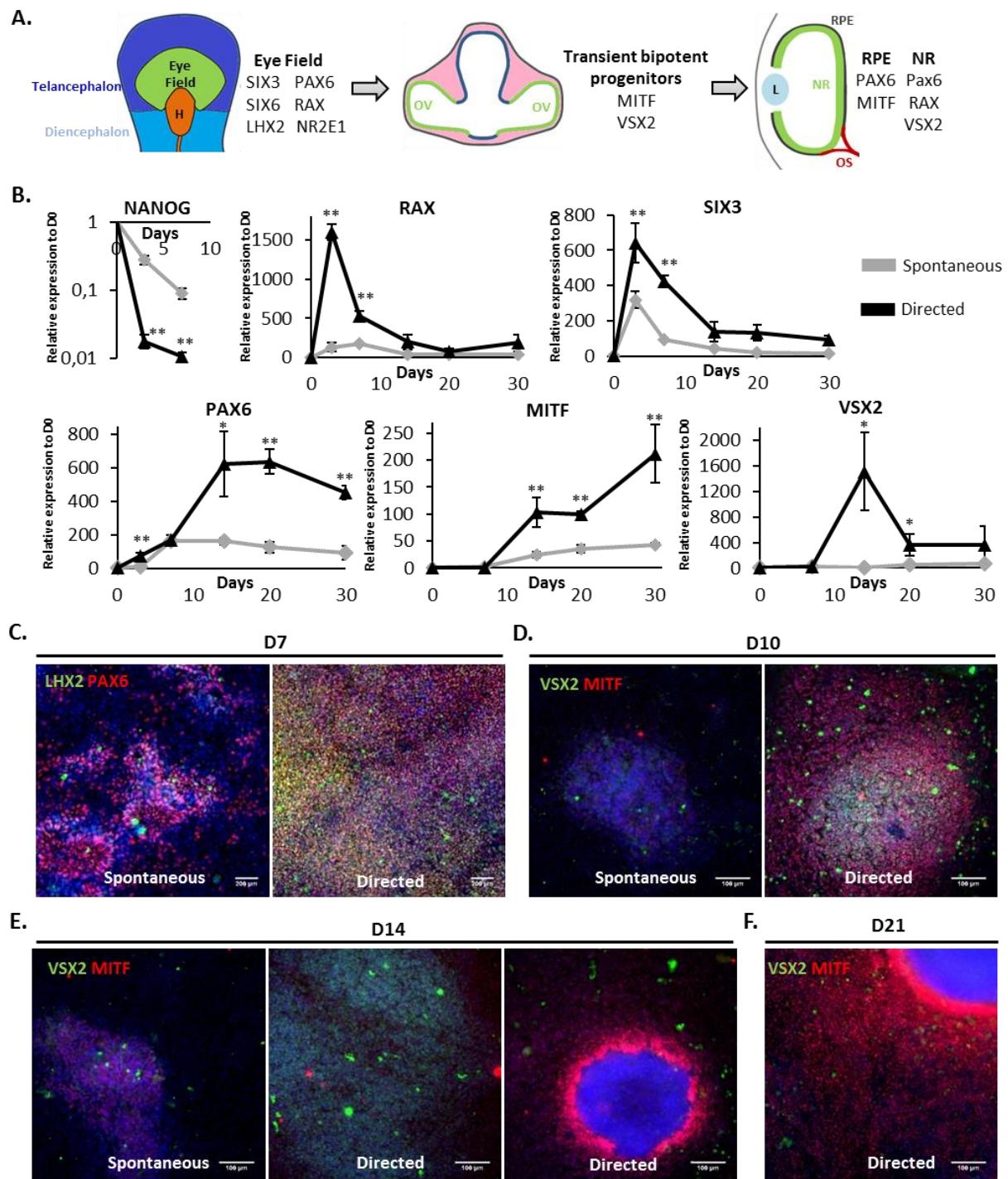
## References

- 1 Strauß O. Pharmacology of the retinal pigment epithelium, the interface between retina and body system. *Eur J Pharmacol* 2016;787:84–93.
- 2 Ambati J, Fowler BJ. Mechanisms of age-related macular degeneration. *Neuron* 2012;75:26–39.

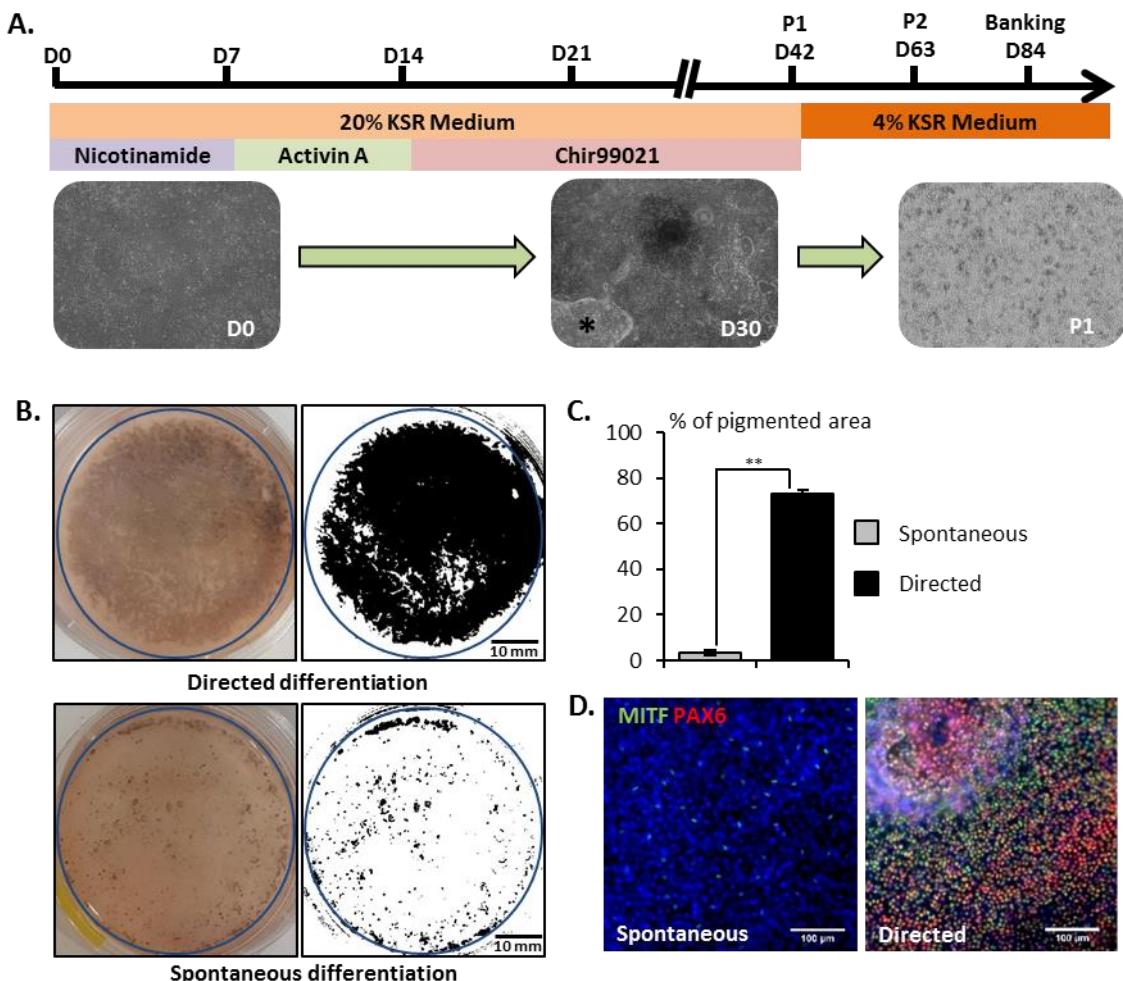
- 3 Ben M'Barek K, Habeler W, Monville C. Stem Cell-Based RPE Therapy for Retinal Diseases: Engineering 3D Tissues Amenable for Regenerative Medicine. *Adv Exp Med Biol* 2018;1074:625–632.
- 4 Wong WL, Su X, Li X, et al. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health* 2014;2:e106–e116.
- 5 Sacchetti M, Mantelli F, Merlo D, et al. Systematic Review of Randomized Clinical Trials on Safety and Efficacy of Pharmacological and Nonpharmacological Treatments for Retinitis Pigmentosa. *J Ophthalmol* 2015. Available at <https://www.hindawi.com/journals/joph/2015/737053/> Accessed October 2, 2018.
- 6 Hernández-Zimbrón LF, Zamora-Alvarado R, Ochoa-De la Paz L, et al. Age-Related Macular Degeneration: New Paradigms for Treatment and Management of AMD. *Oxid Med Cell Longev* 2018;2018.
- 7 Ramsden CM, Powner MB, Carr A-JF, et al. Stem cells in retinal regeneration: past, present and future. *Dev Camb Engl* 2013;140:2576–2585.
- 8 Forest DL, Johnson LV, Clegg DO. Cellular models and therapies for age-related macular degeneration. *Dis Model Mech* 2015;8:421–427.
- 9 Ferguson LR, Balaiya S, Mynampati BK, et al. Deprivation of bFGF Promotes Spontaneous Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Retinal Pigment Epithelial Cells. *J Stem Cells* 2015;10:159–170.
- 10 Klimanskaya I, Hipp J, Rezai KA, et al. Derivation and comparative assessment of retinal pigment epithelium from human embryonic stem cells using transcriptomics. *Cloning Stem Cells* 2004;6:217–245.
- 11 Buchholz DE, Hikita ST, Rowland TJ, et al. Derivation of functional retinal pigmented epithelium from induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dayt Ohio* 2009;27:2427–2434.
- 12 Bharti K, Rao M, Hull SC, et al. Developing cellular therapies for retinal degenerative diseases. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2014;55:1191–1202.
- 13 Ben M'Barek K, Habeler W, Plancheron A, et al. Human ESC-derived retinal epithelial cell sheets potentiate rescue of photoreceptor cell loss in rats with retinal degeneration. *Sci Transl Med* 2017;9.
- 14 da Cruz L, Fynes K, Georgiadis O, et al. Phase 1 clinical study of an embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium patch in age-related macular degeneration. *Nat Biotechnol* 2018;36:328–337.
- 15 Schwartz SD, Hubschman J-P, Heilwell G, et al. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet Lond Engl* 2012;379:713–720.
- 16 Idelson M, Alper R, Obolensky A, et al. Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional retinal pigment epithelium cells. *Cell Stem Cell* 2009;5:396–408.
- 17 Griffin SM, Pickard MR, Orme RP, et al. Nicotinamide alone accelerates the conversion of mouse embryonic stem cells into mature neuronal populations. *PLoS ONE* 2017;12.
- 18 Choudhary P, Booth H, Gutteridge A, et al. Directing Differentiation of Pluripotent Stem Cells Toward Retinal Pigment Epithelium Lineage. *Stem Cells Transl Med* 2017;6:490–501.
- 19 Iwasaki Y, Sugita S, Mandai M, et al. Differentiation/Purification Protocol for Retinal Pigment Epithelium from Mouse Induced Pluripotent Stem Cells as a Research Tool. *PloS One* 2016;11:e0158282.
- 20 Lidgerwood GE, Lim SY, Crombie DE, et al. Defined Medium Conditions for the Induction and Expansion of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium. *Stem Cell Rev* 2016;12:179–188.
- 21 Buchholz DE, Pennington BO, Croze RH, et al. Rapid and efficient directed differentiation of human pluripotent stem cells into retinal pigmented epithelium. *Stem Cells Transl Med* 2013;2:384–393.
- 22 Lamba DA, Karl MO, Ware CB, et al. Efficient generation of retinal progenitor cells from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:12769–12774.

- 23 Leach LL, Buchholz DE, Nadar VP, et al. Canonical/β-catenin Wnt pathway activation improves retinal pigmented epithelium derivation from human embryonic stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56:1002–1013.
- 24 Foltz LP, Clegg DO. Rapid, Directed Differentiation of Retinal Pigment Epithelial Cells from Human Embryonic or Induced Pluripotent Stem Cells. *J Vis Exp JoVE* 2017.
- 25 Lane A, Philip LR, Ruban L, et al. Engineering efficient retinal pigment epithelium differentiation from human pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl Med* 2014;3:1295–1304.
- 26 Veratch FS, Scott R, Wong J-W, et al. The impact of manual processing on the expansion and directed differentiation of embryonic stem cells. *Biotechnol Bioeng* 2008;99:1216–1229.
- 27 Paull D, Sevilla A, Zhou H, et al. Automated, high-throughput derivation, characterization and differentiation of induced pluripotent stem cells. *Nat Methods* 2015;12:885.
- 28 Jenkins MJ, Farid SS. Human pluripotent stem cell-derived products: Advances towards robust, scalable and cost-effective manufacturing strategies. *Biotechnol J* 2015;10:83–95.
- 29 Terstegge S, Laufenberg I, Pochert J, et al. Automated maintenance of embryonic stem cell cultures. *Biotechnol Bioeng* 2007;96:195–201.
- 30 Konagaya S, Ando T, Yamauchi T, et al. Long-term maintenance of human induced pluripotent stem cells by automated cell culture system. *Sci Rep* 2015;5.
- 31 Thomas RJ, Anderson D, Chandra A, et al. Automated, scalable culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Biotechnol Bioeng* 2009;102:1636–1644.
- 32 Terstegge S, Pochert J, Brüstle O. Hamilton's new cellhost system for full automation of embryonic stem cell cultures. *Nat Methods* 2004. Available at <https://www.nature.com/articles/nmeth1204-271> Accessed May 18, 2018.
- 33 De Sousa PA, Tye BJ, Bruce K, et al. Derivation of the clinical grade human embryonic stem cell line RCe013-A (RC-9). *Stem Cell Res* 2016;17:36–41.
- 34 Horsford DJ, Nguyen M-TT, Sellar GC, et al. Chx10 repression of Mitf is required for the maintenance of mammalian neuroretinal identity. *Dev Camb Engl* 2005;132:177–187.
- 35 Wang Z, Yasugi S, Ishii Y. Chx10 functions as a regulator of molecular pathways controlling the regional identity in the primordial retina. *Dev Biol* 2016;413:104–111.
- 36 Croze RH, Buchholz DE, Radeke MJ, et al. ROCK Inhibition Extends Passage of Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigmented Epithelium. *Stem Cells Transl Med* 2014;3:1066–1078.
- 37 Singh R, Phillips MJ, Kuai D, et al. Functional Analysis of Serially Expanded Human iPS Cell-Derived RPE Cultures. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54:6767–6778.
- 38 Zhong X, Gutierrez C, Xue T, et al. Generation of three dimensional retinal tissue with functional photoreceptors from human iPSCs. *Nat Commun* 2014;5:4047.
- 39 Fuhrmann S, Levine EM, Reh TA. Extraocular mesenchyme patterns the optic vesicle during early eye development in the embryonic chick. *Dev Camb Engl* 2000;127:4599–4609.
- 40 Meyer JS, Shearer RL, Capowski EE, et al. Modeling early retinal development with human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:16698–16703.
- 41 Lu B, Malcuit C, Wang S, et al. Long-Term Safety and Function of RPE from Human Embryonic Stem Cells in Preclinical Models of Macular Degeneration. *STEM CELLS* 2009;27:2126–2135.
- 42 Hourd P, Chandra A, Alvey D, et al. Qualification of academic facilities for small-scale automated manufacture of autologous cell-based products. *Regen Med* 2014;9:799–815.
- 43 Archibald PRT, Chandra A, Thomas D, et al. Comparability of automated human induced pluripotent stem cell culture: a pilot study. *Bioprocess Biosyst Eng* 2016;39:1847–1858.

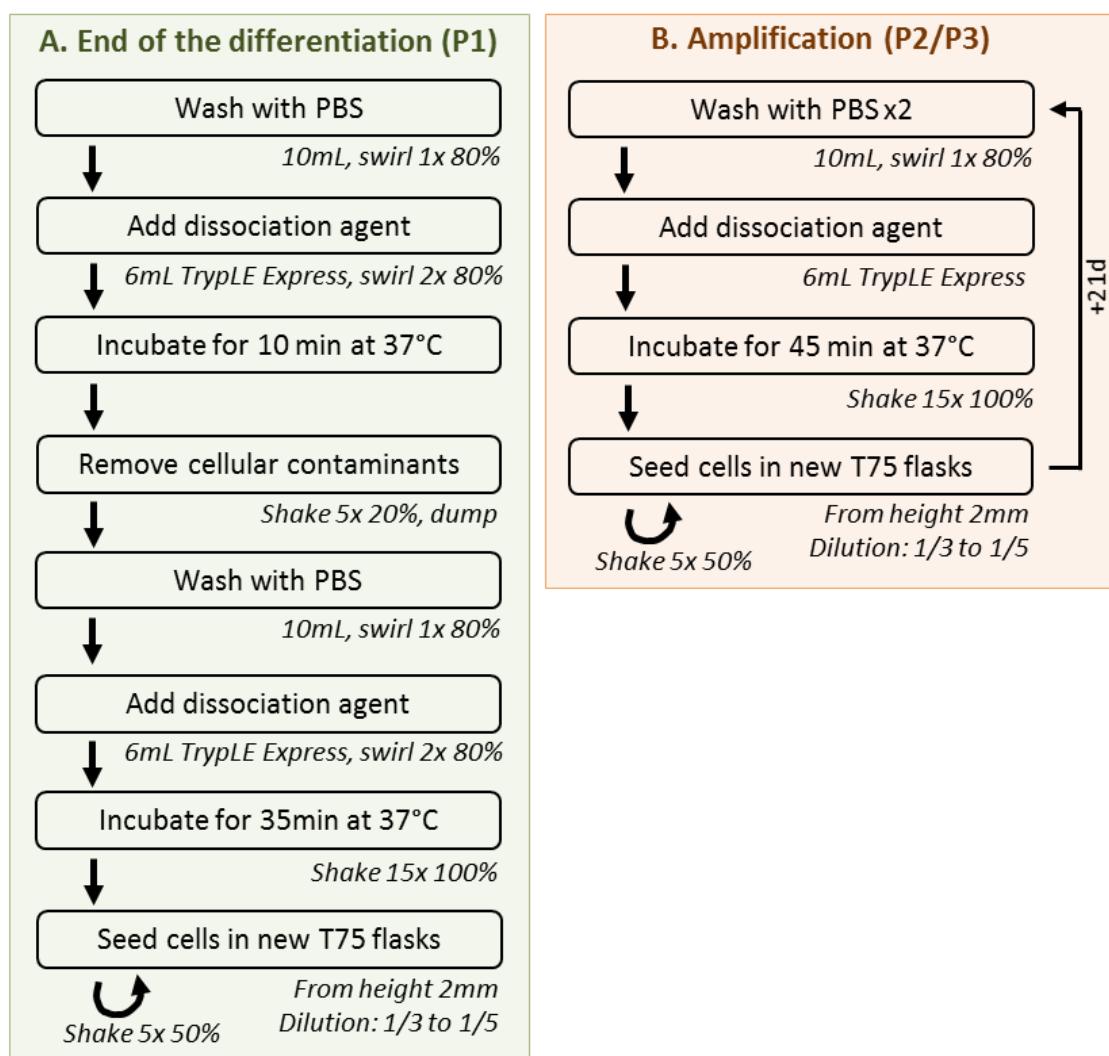
## Figures



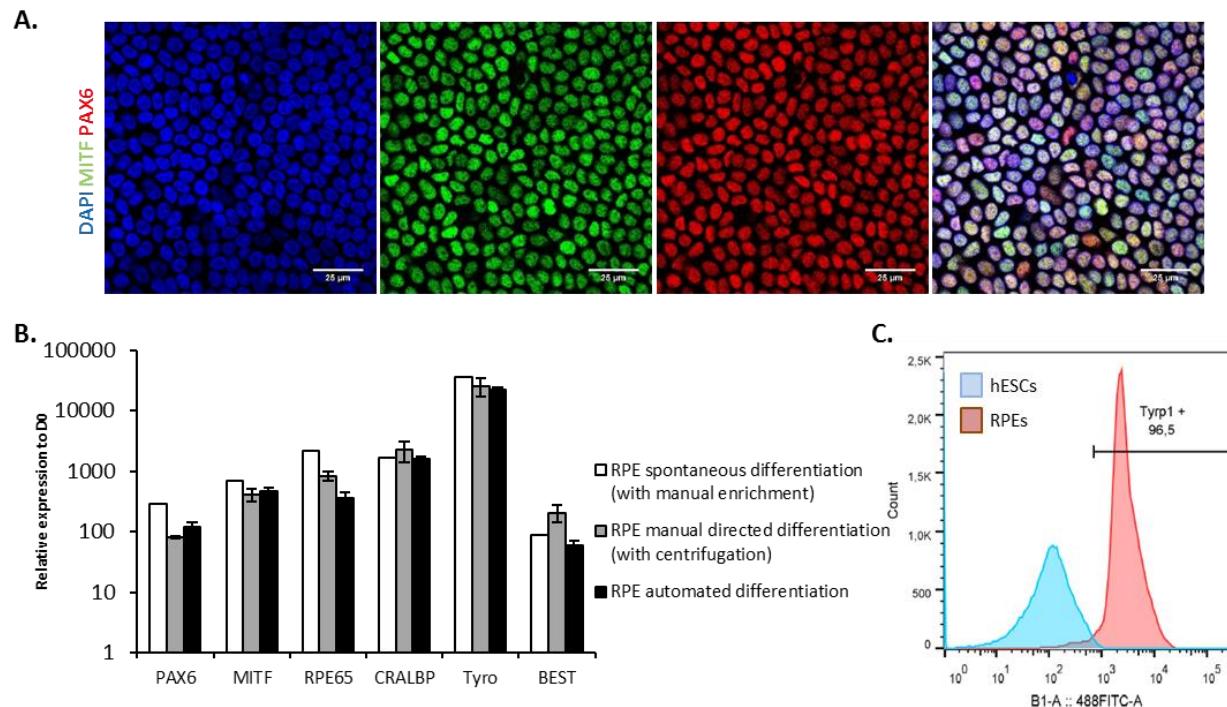
**Figure 1: Use of nicotinamide, Activin A and CHIR99021 in a sequential manner recapitulates the main steps of retinal development.** (A) Schematic representation of the retinal development. H, Hypothalamus; OV, Optic Vesicle; L, Lens; NR, Neural Retina; RPE, Retinal Pigment Epithelium; OS, Optic Stalk. (B) Relative gene expressions were quantified by RT-qPCR and normalized to mRNA expression at day 0 ( $n = 3$ , mean  $\pm$  SD). Control condition corresponds to RPE 20% KSR. (C) Representative immunofluorescence for PAX6 and LHX2 at day 7 and for VSX2 and MITF at day 10 (D), D14 (E) and D21 (F).



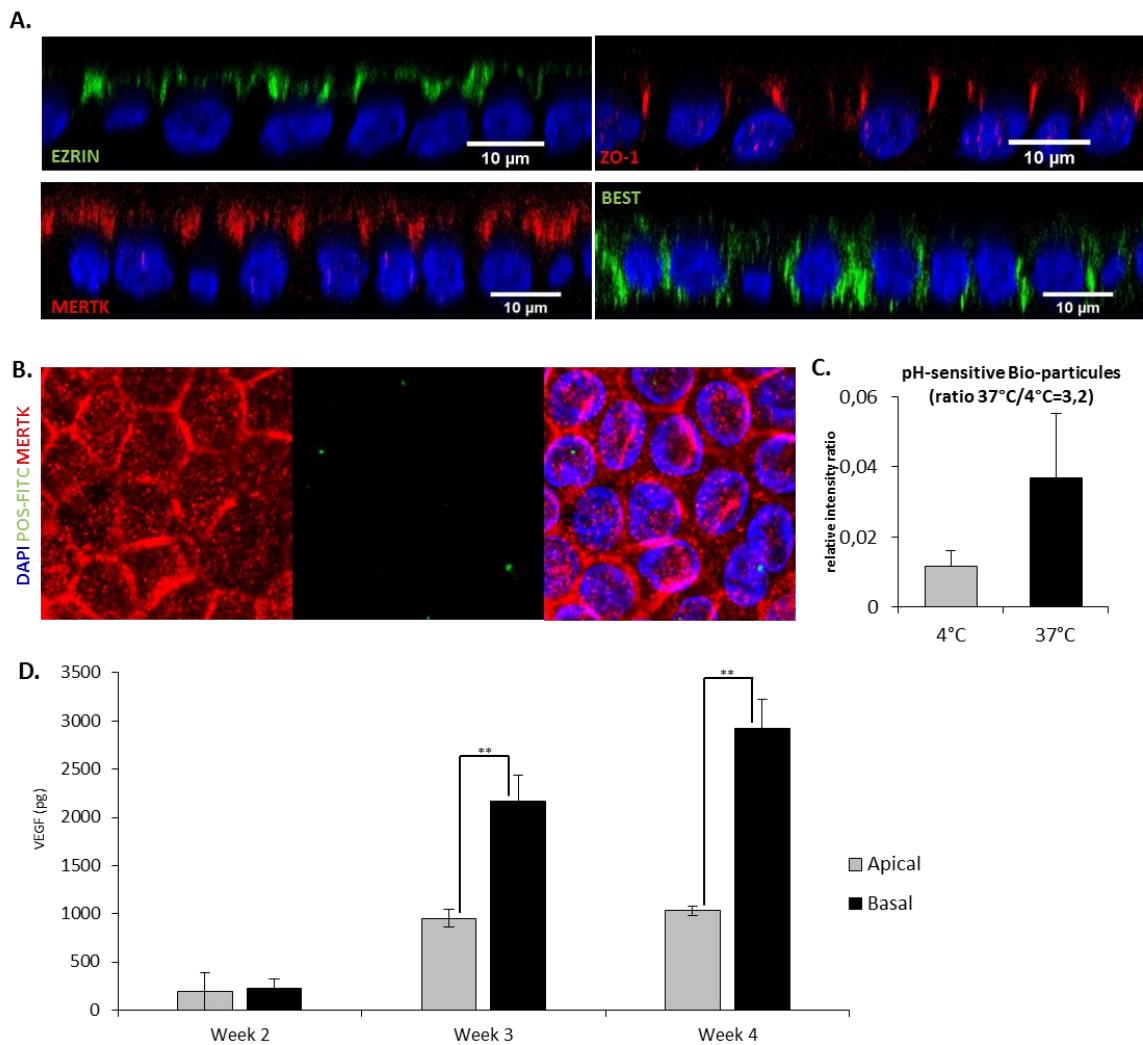
**Figure 2: Directed differentiation protocol improves RPE differentiation.** (A) Schematic representation of the directed differentiation protocol (black star: cell contaminants). (B) Representative macroscopic observation of the culture dishes after 42 days of differentiation (blue circles: quantified areas) and (C) quantification of the pigmented area ( $n = 3$ , mean  $\pm$  SD), (D) Representative immunofluorescence images for the RPE markers PAX6 and MITF after 42 days of differentiation.



**Figure 3: Flowchart of the automated passaging of RPE cells using the Compact Select automation platform.**

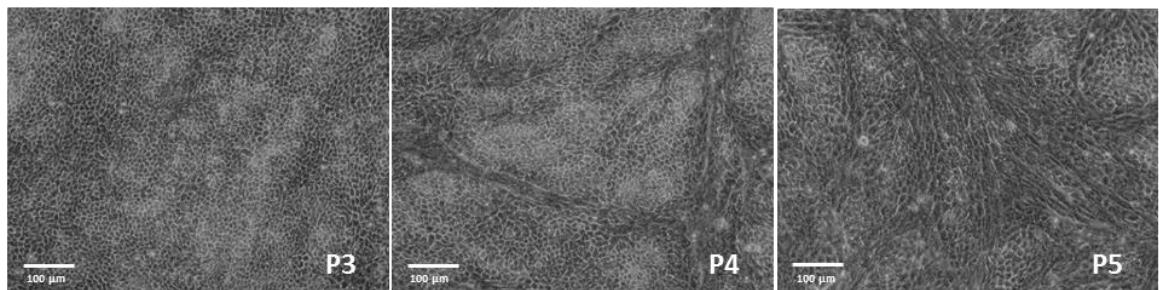


**Figure 4: Automated differentiation and amplification of a pure population of RPE without manual selection.** (A) Representative immunofluorescence for the RPE markers MITF and PAX6 at passage 2 after 21 days of culture. (B) Relative gene expression of RPE markers quantified by RT-qPCR ( $n = 3$ , except for spontaneous differentiation ( $n = 1$ ), mean  $\pm$  SD). (C) Representative flow cytometry histogram for the pigmentation marker TYRP1.

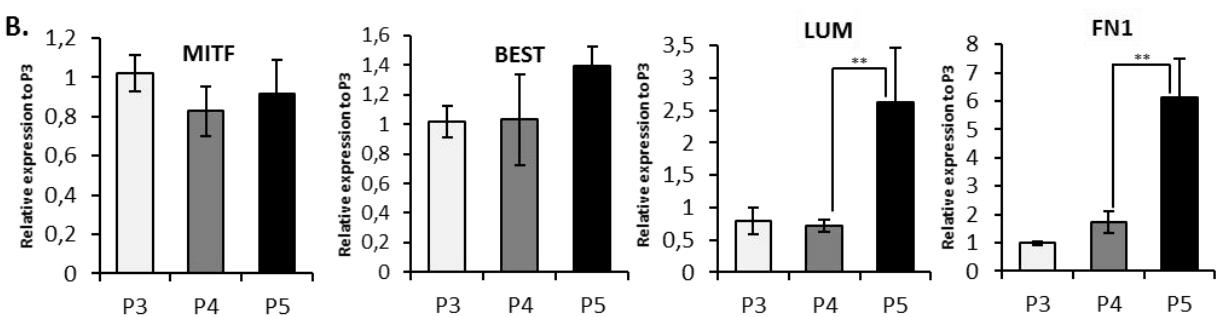


**Figure 5: RPE obtained by automated differentiation are mature and functional.** (A) Confocal images (projection of XZ planes) for the RPE markers EZRIN, BEST, ZO-1 and MERTK. (B) Fluorescence intensity quantification of hESC-RPE cells after exposure to pH-sensitive bioparticles (n = 3, mean  $\pm$  SD). (C) Images of hESCs derived RPE after 4 hours of exposure to fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled pig photoreceptor cell outer segment (FITC-POS; green). (D) Quantification of vascular endothelial growth factor (VEGF) secreted by hESC-RPE cells at different time points using an ELISA assay (n = 3, mean  $\pm$  SD).

**A.**

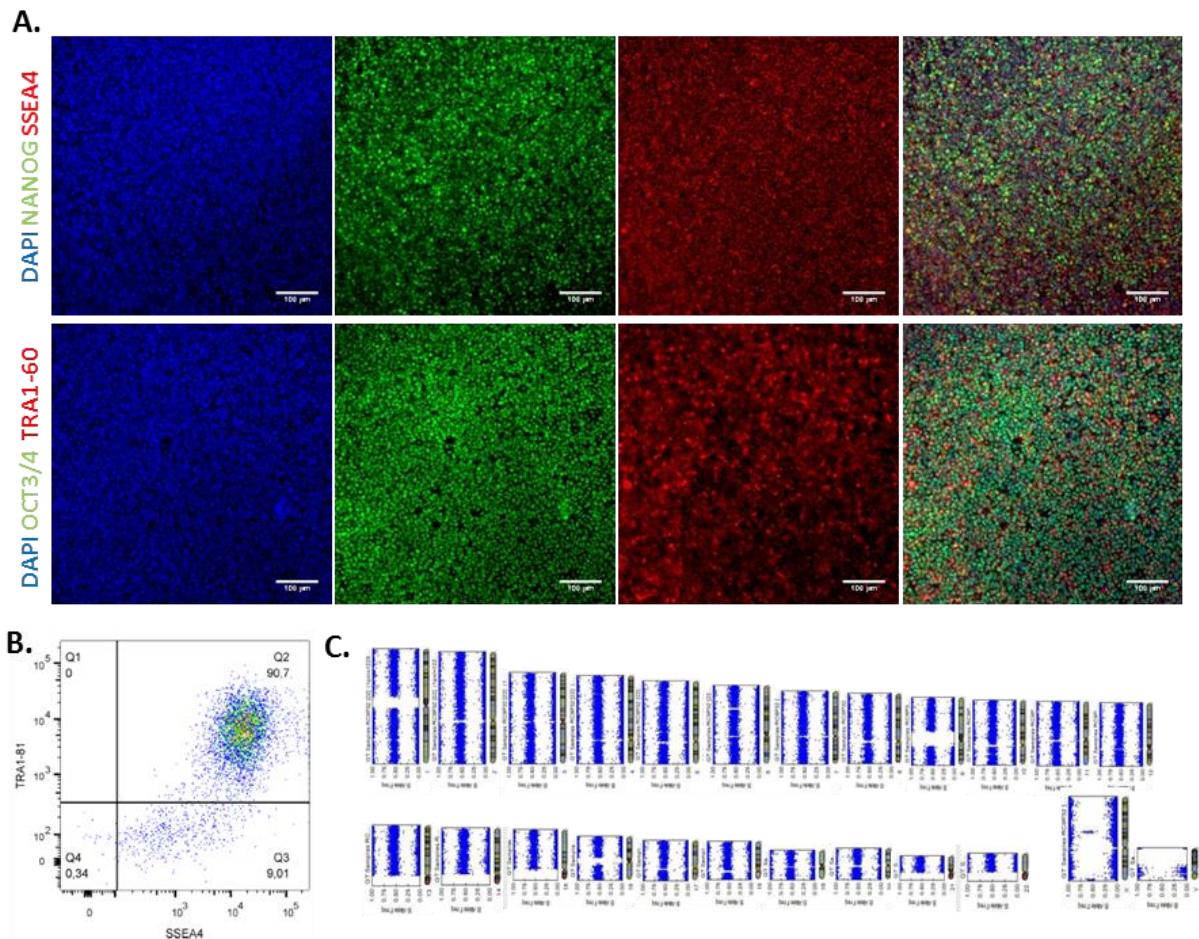


**B.**



**Figure 6: RPE obtained by automated differentiation can be maintained in culture until passage 3.**

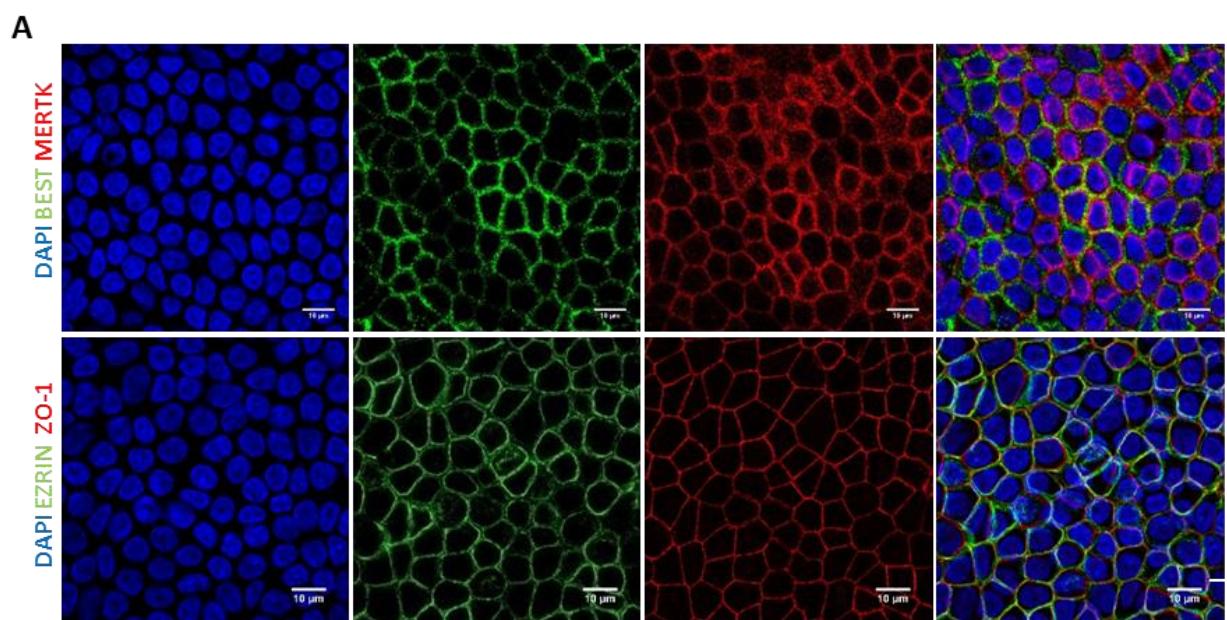
(A) Light microscopy images of hESC-RPE at passage 3, 4 and 5. (B) Relative gene expression of EMT (LUM and FN1) and RPE (MITF and BEST) markers quantified by RT-qPCR (n= 3, mean ± SD).



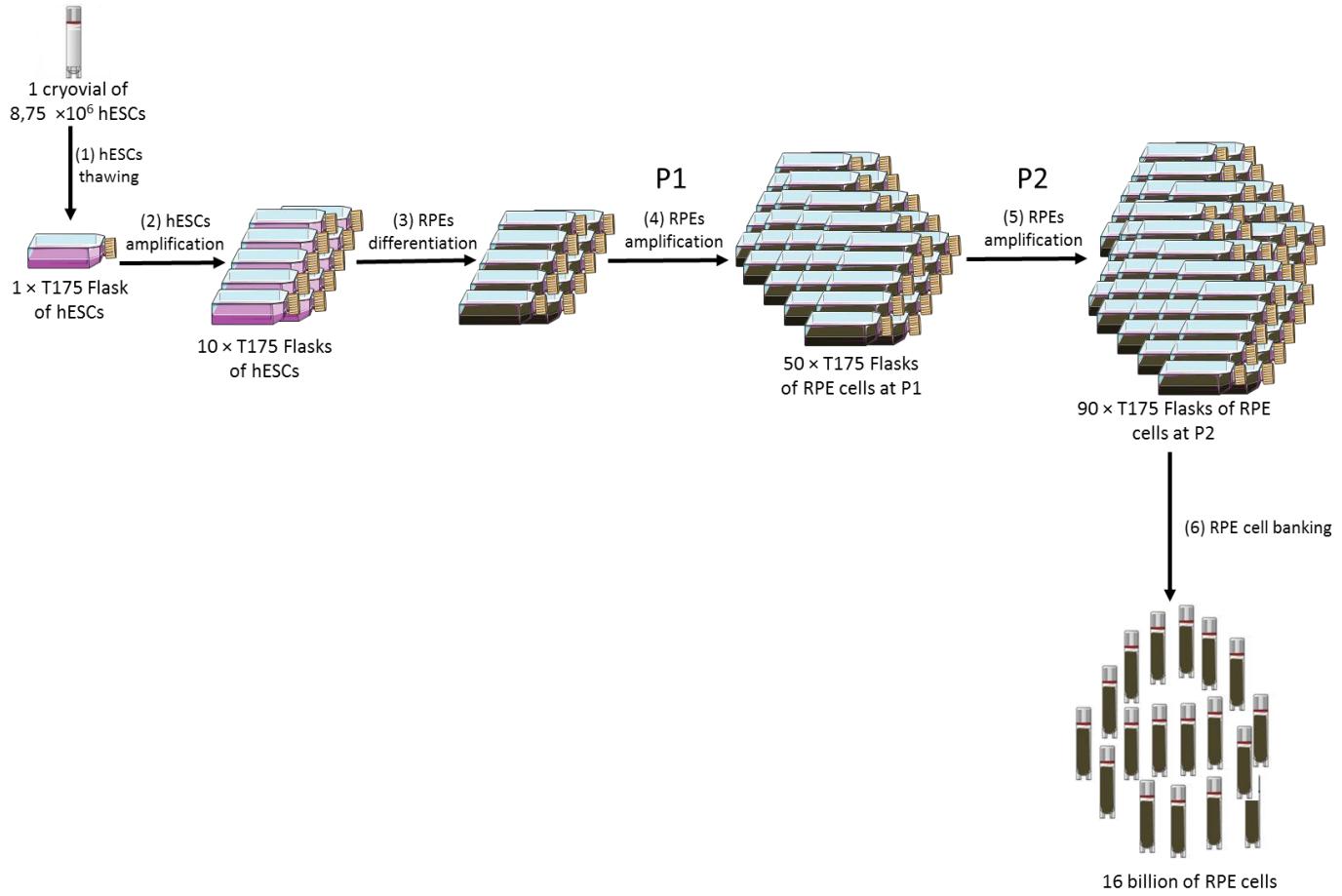
**Figure S1: Characterization of the clinical-grade hESC line RC-09.** (A) Fluorescence images for the pluripotent markers NANOG, SSEA4, OCT3/4 and TRA1-60. (B) Representative flow cytometry histogram for the pluripotency markers TRA1-81 and SSEA4. (C) Analysis of copy number chromosome using high-density single-nucleotide polymorphism-based genotype arrays.



**Figure S2: Overview of the CompacT Select platform.** (A) Flask carousel incubator, (B) Plate incubator, (C) Media pumps, (D) Decappers, (E) Robot arm, (F) Pipette head.



**Figure S3: Characterization of hESCs derived RPE cells. (A)** Fluorescence images for the RPE markers BEST, MERTK, EZRIN and ZO-1 at passage 2 (D35).



**Figure S4. Schematic representation of the automated RPE production process.** Steps (2) to (5) can be performed using the CompacT SelecT system automation platform. Step (6) can be performed using automated cryovial filing system Fill-it and the controlled-rate freezing system Cryomed.

Gene		SEQUENCE
18S	FRW	GAGGATGAGGTGGAACGTGT
	REV	TCTTCAGTCGCTCCAGGTCT
NANOG	FRW	CAAAGGCAAACAACCCACTT
	REV	TCTGCTGGAGGCTGAGGTAT
RAX	FRW	GGCAAGGTCAACCTACCAGAG
	REV	CATGGAGGACACTCCAGCTT
SIX3	FRW	CCTCCCACTTCTTGTGCCA
	REV	CGCTACTCGCCAGAAGTATGG
PAX6	FRW	GCCAGCAACACACCTAGTCA
	REV	TGTGAGGGCTGTGCTGTTC
VSX2	FRW	CTGCCGGAAGACAGGATACA
	REV	TAGAGCCCATACTCCGCCA
MITF	FRW	CCGGGTGCAGAATTGTAAC
	REV	GGACAATTTGGCATTGG
RPE65	FRW	AGCACTGAGTTGAGCAAGCA
	REV	GGCCTGTCTCACAGAGGAAG
CRALBP	FRW	CACGCTGCCAAGTATGATG
	REV	CCAGGACAGTTGAGGAGAGG
TYROSYNASE	FRW	GTGTAGCCTTCTTCAACTCAG
	REV	GTTCCCTCATTACCAAATAGCATCC
BEST1	FRW	GTCAGAGGCTCCTCCTCCT
	REV	TCTGCTCCACCAGTGTCTG
LUM	FRW	TCACATGCCACACCACAAGA
	REV	CAGTCACGCCAGTCTCTGAA
FN1	FRW	CTGGCCAGTCCTACAACCAG
	REV	CGGGAATCTTCTCTGTCAGCC

**Table S1.** List of quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR) primers.

Antibody	Host	Company	Reference	Dilution	Application
PAX6	Rabbit	Biolegend	PRB-278P	1/500	Immunofluorescence
MITF	Mouse	Dako	M3621	1/250	Immunofluorescence
VSX2	Goat	Santa Cruz Biotechnology	sc-21690	1/250	Immunofluorescence
TYRP1	Mouse	LifeSpan BioSciences	MS-771-P1	1/500 - 1/100	Flow cytometry
EZRIN	Mouse	Sigma	E8897	1/250	Immunofluorescence
ZO-1	Rabbit	Invitrogen	402300	1/500	Immunofluorescence
BEST	Mouse	Abcam	ab2182	1/250	Immunofluorescence
MERTK	Rabbit	Abcam	Y323	1/500	Immunofluorescence
NANOG	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology	sc-33760	1/500	Immunofluorescence
OCT 3/4	Goat	Santa Cruz Biotechnology	sc-5279	1/500	Immunofluorescence
SSEA4	Mouse	R&D systems	FAB1435A	1/100	Flow cytometry
TRA1-60	Mouse	Santa Cruz Biotechnology	sc-21705	1/500	Immunofluorescence
TRA1-81	Mouse	Santa Cruz Biotechnology	sc-21706	1/500	Immunofluorescence
TRA1-81	Mouse	eBioscience	12-8883-82	1/100	Flow cytometry

**Table S2. List of primary antibodies.**

## 2. Discussion et perspectives

Dans cet article, nous décrivons pour la première fois la différenciation automatisée de CSPhs en cellules de l'EPR. Pour cela, la nicotinamide, l'Activine A ainsi que le CHIR99021 ont été utilisés de manière séquentielle afin de récapituler les principales étapes de la rétinogenèse.

Le choix d'utiliser la nicotinamide pour induire la différenciation neuroectodermique des CSPhs a été motivé par les nombreuses études ayant rapporté l'amélioration de la différenciation des cellules de l'EPR grâce à son utilisation (Buchholz et al., 2013; Idelson et al., 2009; Maruotti et al., 2015) ainsi que par la possibilité d'utiliser cette forme de la vitamine B3 en clinique. Cependant, les mécanismes via lesquels la nicotinamide agit demeurent incompris. En effet, bien que Buchholz et al. aient décris que l'utilisation d'un inhibiteur de PARP1, le 3-aminobenzamide (3-ABA), permettait de récapituler partiellement les effets de la nicotinamide sur la différenciation des CSPhs, l'efficacité de ce composé reste très inférieure à celle de la nicotinamide suggérant l'implication de mécanismes additionnels. De plus, dans cet article les auteurs démontrent seulement que l'inhibition de PARP1 et l'utilisation de la Nicotinamide présentent un effet similaire sur l'expression de certains gènes impliqués dans la pluripotence et la différenciation des CSPhs en progéniteurs rétiniens mais ne démontrent pas clairement que l'effet de la nicotinamide passe par ce mécanisme (Buchholz et al., 2013). Or, la nicotinamide étant un précurseur du NAD<sup>+</sup>, une co-enzyme impliquée dans de nombreuses réactions métaboliques, son ajout au milieu de culture module probablement de nombreuses autres voies de signalisation pouvant expliquer cet effet. Il a par exemple été démontré que la nicotinamide était un inhibiteur de la Sirtuine 1 (SIRT-1) (Avalos et al., 2005), une désacétylase dépendante de NAD<sup>+</sup> qui est impliquée dans le maintien de la pluripotence et dont il a déjà été démontré que l'inhibition promouvait la différenciation neurale (Hu et al., 2014; Kim et al., 2016; Liu et al., 2014). Il est donc possible que l'effet de la nicotinamide sur les premières étapes de la différenciation rétinienne passe également par l'inhibition de cette enzyme. Mettre en évidence le mécanisme d'action de la nicotinamide pourrait permettre d'identifier un composé plus spécifique et encore plus efficace que cette dernière dans le cadre de la différenciation rétinienne et revêt donc un réel intérêt.

D'autre part, nous rapportons ici l'augmentation de l'expression de VSX2, un marqueur de la rétine neurale, suite à l'utilisation de l'Activine A. Or, les études développementales menées *in vivo* suggèrent que ce facteur favorise la différenciation des cellules de l'EPR plutôt que celle des cellules de la rétine neurale (Fuhrmann et al., 2000). Cependant, nos résultats sont cohérents avec ceux de Leach et al. qui observent également la présence de deux populations, l'une exprimant VSX2 et l'autre *MITF*, suite au traitement des progéniteurs rétiniens avec l'Activine A et la petite molécule SU5402, un inhibiteur des voies FGFs (Leach et al., 2015). De manière semblable, Lane et al.

rapportent que l'utilisation de l'activine A ne permet pas de réprimer l'expression de VSX2 induite par le traitement précoce des CSPhs avec un inhibiteur des voies BMPs (Lane et al., 2014). Dans notre cas, ce problème est résolu par l'activation de la voie Wnt/β qui diminue drastiquement l'expression de VSX2, de manière semblable à ce que Leach et al. ont rapporté préalablement (Leach et al., 2015). Ceci suggère qu'au cours du développement de la rétine, ce serait la sécrétion des signaux Wnt par les tissus adjacents plutôt que celle de l'activine A qui serait responsable de la répression de l'expression de VSX2 chez les futures cellules de l'EPR. Meyer et al. ont cependant rapporté que le traitement de vésicules optiques dérivées de CSPhs avec de l'activine A aboutissait à une diminution de l'expression de VSX2 (Meyer et al., 2011). Des études supplémentaires seront donc nécessaires afin de déterminer l'effet de l'activine A sur l'expression de VSX2 et la différenciation des progéniteurs rétiniens.

Quoiqu'il en soit, ce nouveau protocole automatisé devrait permettre à l'avenir la production de cellules de l'EPR à plus grande échelle tout en réduisant les biais de culture et le coût de la différenciation. Avec les résultats encourageants, du moins au niveau tolérance, des premiers essais cliniques visant à greffer des cellules de l'EPR dérivées de CSPhs, un protocole de différenciation robuste, viable économiquement et compatible avec des applications cliniques devient nécessaire. Dans cet optique, quelques ajustements seront nécessaires afin que notre protocole réponde aux critères de bonnes pratiques de fabrication. Tout d'abord, le matrigel qui est préparé à partir de cellules de sarcomes murins doit être remplacé par une matrice xéno-free de composition définie permettant également l'adhérence des CSPhs et des cellules de l'EPR. L'utilisation de la matrice L7 (Lonza), une matrice de synthèse répondant aux critères de bonne pratique de fabrication et qui est adaptée à la culture des CSPhs est actuellement en cours d'essai. Après quelques ajustements concernant notamment la densité d'ensemencement des CSPhs, les premiers résultats semblent probants et des essais de différenciation automatisée avec cette matrice devraient être lancés prochainement.

Un autre point, cette fois plus difficile à résoudre, est de faire en sorte que le Compact Select réponde aux normes de bonnes pratiques de fabrication. Cela nécessite, entre autres, que l'automate soit placé dans une pièce de culture dédiée de classe B. D'autre ajustement sont nécessaire mais il est à noter que le Compact Select a déjà été placé en condition GMPs (good manufacturing process) par d'autres laboratoires tel que le centre d'ingénierie biologique de l'université de Loughborough. Un article a d'ailleurs été publié afin de rapporter la complexité administrative et technique d'une telle opération (Hourd et al., 2014). Pour le reste, les milieux de culture, le sérum de remplacement, les cytokines, les petites molécules ainsi que la TRYPLE utilisés pour ce protocole sont tous utilisables en clinique ou possèdent des équivalents qui le sont.

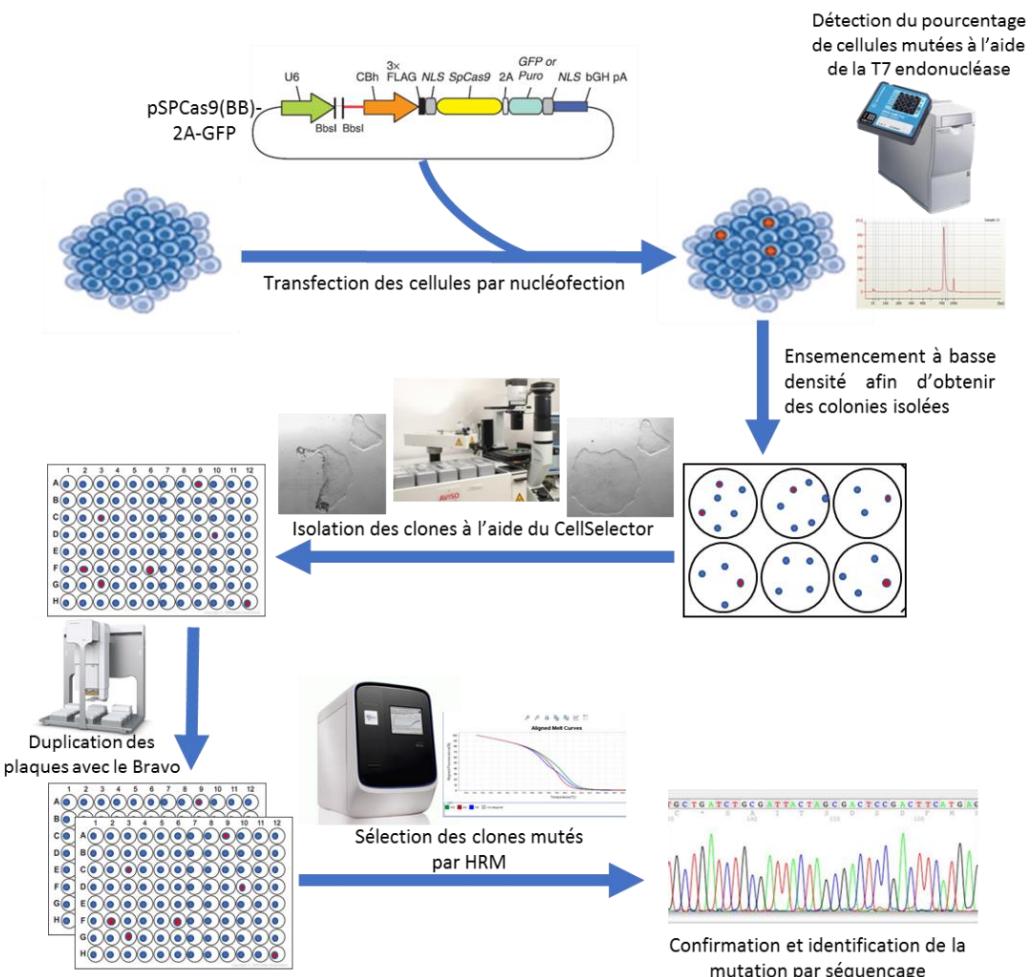
## II. Caractérisation du phénotype des cellules de l'EPR mutantes APC

### 1. Matériels et méthodes

Seules les méthodes non décrites dans l'article ci-dessus seront présentées ici.

#### d. *Édition génétique avec la technologie CRISPR/Cas9 et sélection des clones mutants*

La génération d'une lignée d'hESCs mutante APC a constitué la première utilisation de la technologie CRISPR/Cas9 au sein d'ISTEM. Ceci a donc nécessité l'optimisation des protocoles de transfection des CSPhs utilisés au laboratoire et la mise en place de techniques permettant la détection et l'isolation rapide des clones mutés. Ce travail a finalement abouti à la mise en place d'une stratégie globale désormais utilisée par l'ensemble du laboratoire pour générer des lignées de CSPhs mutantes (**Figure 26**).



**Figure 26. Stratégie utilisée pour la génération d'une lignée d'hESCs mutante APC.**

### **Insertion d'une mutation dans l'exon 9 d'APC avec la technologie CRISPR/Cas9**

Afin d'induire une mutation dans l'exon 9 d'APC, les hESCs RC-09 ont été transfectées par nucléofection (Amaxa, Nucleofector, Lonza) avec le plasmide pSpCas9-(BB)-2A-GFP (Ran et al., 2013). Ce plasmide permet à la fois l'expression de la Cas9 sous le contrôle du promoteur EF1- $\alpha$  et celle de l'ARNg de son choix sous le control du promoteur U6 (**Figure 26**). Ici, l'ARNg a été choisi à l'aide du site [crispr.mit.edu/](http://crispr.mit.edu/) de manière à cibler la séquence CACCGCGCTTACTGTGAAACCTGT afin d'induire une mutation proche du nucléotide 1278 d'APC. Puisque l'objectif était d'induire une mutation aboutissant à la synthèse d'une protéine tronquée, il fut décidé de ne pas apporter de cassette de recombinaison homologue à la cellule et de compter sur les erreurs induites par la jonction d'extrémités non-homologues (NHEJ) lors de la réparation des cassures doubles brins de l'ADN induites par la Cas9.

### **Quantification de la proportion de cellules mutées après transfection**

Afin de quantifier la proportion de cellules mutées 48h après transfection, un test basé sur l'utilisation de la T7 endonucléase (NEB) a été réalisé en suivant les instructions du fournisseur. En résumé, après extraction de l'ADN génomique à l'aide du kit QIAamp DNA Blood mini plus (Qiagen), un fragment de 741 pb a été amplifié par PCR à l'aide d'amorces encadrant la séquence ciblée par l'ARNg (**Annexe 2**). Puis après une étape de dénaturation et de ré-appariement aboutissant à la formation d'hétéroduplex entre des brins d'ADN sauvages et mutés, le produit de PCR a été incubé avec la T7 endonucléase, une enzyme de restriction capable de reconnaître et de cliver les zones de mésappariement de l'ADN. Le pourcentage de fragments clivés a ensuite été quantifié à l'aide d'une puce et d'un Bioanalyseur Agilent.

### **Isolation et détection des clones mutants APC**

Afin d'obtenir une population clonale de cellules mutantes APC, les cellules RC-09 transfectées ont tous d'abord été ensemencées à une faible densité de 250 cellules/cm<sup>2</sup>. Par la suite, afin de limiter au maximum les risques de contamination, des colonies bien isolées ont été individuellement repiquées dans des plaques 96 puits à l'aide d'un automate, le Cellcelector (Aviso). Ces plaques ont ensuite été dupliquées à l'aide d'un second automate (Bravo, Agilent), l'une des plaques filles étant utilisée pour réaliser une extraction d'ADNg tandis que l'autre était conservée en culture ou congelée. L'extraction d'ADNg a cette fois été réalisée à l'aide du kit « Quick DNA 96 » (Zymo research).

Par la suite, la présence ou non d'une mutation a été détectée pour chaque clone par HRM (high resolution melt curve), une technique permettant de déterminer rapidement la présence d'une délétion ou d'une insertion de nucléotides en se basant sur l'allure de la courbe de dénaturation d'un fragment d'ADN amplifié par PCR. Pour cela des amorces différentes de celles utilisées pour le test

T7 endonucléase ont été conçues afin de diminuer la taille de l'amplicon et ainsi augmenter la sensibilité du HRM (**Annexe 2**). Ce test a été réalisé sur un QuantStudio 12K Flex (TermoFisher) à l'aide du kit MeltDoctor HRM (TermoFisher).

#### **Clonage et séquençage des produits de PCR**

Une fois les clones mutants identifiés, une PCR a été réalisée à partir de l'ADNg de chacun d'entre eux afin d'amplifier la zone mutée. Les produits de PCR ont ensuite été clonés dans des vecteurs plasmidiques Zero Blunt TOPO (ThermoFisher) avant d'être utilisés pour transformer des bactéries *E.Coli* Stbl3 par choc thermique (TermoFisher). L'ADN plasmidique de 18 clones bactériens a ensuite été extrait pour chaque clone mutant sélectionné par HRM puis envoyé à séquencer chez Eurofins.

#### *e. Caractérisation du phénotype mutant APC*

#### **Culture des hESCs**

Nous disposons au sein du laboratoire de deux lignées hESCs porteuses de mutations hétérozygotes sur APC détectées au cours d'un DPI (STR-355-APC/FE09-0271-L1 et STR-305-APC/FE09-073-L1). La première, qui sera appelée APC-1 dans les pages qui vont suivre, est porteuse d'une mutation sur l'exon 15 d'APC (3736dG) tandis que la seconde, qui sera nommée APC-2, est porteuse d'une mutation sur l'exon 9 (1273dG). Dans les 2 cas, ces mutations aboutissent à un décalage du cadre de lecture entraînant l'apparition d'un codon stop et la synthèse d'une protéine tronquée de 137 et 47KDa respectivement. Ces cellules ainsi que les cellules saines RC-09 et SA01 (nommées respectivement WT-1 et WT-2 par la suite) ont été cultivées en condition feeder free sur un coating de Matrigel (Corning) et avec du milieu mTeSR™1 (Stem cells).

#### **Différenciation en cellules de l'EPR des hESCs mutantes APC**

Les deux lignées d'hESCs mutantes APC (APC-1 et APC-2) ainsi que la lignée RC-09 mutante APC (RC-09 APC<sup>+/−</sup>) générée par mutagénèse dirigée ont été différencierées en cellules de l'EPR en utilisant le protocole dirigé décrit dans l'article présenté précédemment. Cependant, la différenciation des cellules mutantes APC demeure moins efficace que celles des cellules sauvages même avec ce protocole, un enrichissement manuel a dû être réalisé lors du premier passage afin d'obtenir une population pure de cellules de l'EPR.

#### **PCR quantitative, Immunofluorescence, cytométrie en flux et acquisition des images**

Ces expériences ont été réalisées en utilisant des protocoles identiques à ceux décrit dans l'article présenté précédemment. Les amorces et les anticorps utilisés pour cette étude sont récapitulés respectivement dans les **annexes 2 et 3**.

### Western Blot

Les cellules ont été lysées dans du tampon RIPA (Sigma-Aldrich) supplémenté avec des anti-phosphatases (Roche) et un cocktail d'anti-protéase (Sigma-Aldrich). Les électrophorèses ont été réalisées avec 15µg de protéines totales déposées sur des gel pré-coulés Mini-PROTEAN® TGX™ 4-15% (Biorad). Suite à la migration, les protéines ont été transférés sur membrane de nitrocellulose 0.2µm en utilisant l'appareil Trans-Blot Turbo transfert starter (BioRad).

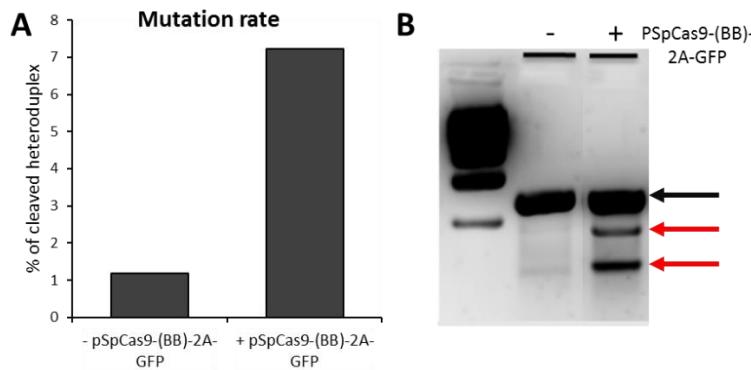
Après incubation avec les anticorps primaires, les membranes ont été incubées avec des anticorps secondaires couplés soit à la peroxydase (GE Healthcare), soit à un fluorochrome (Licor). Dans le premier cas la révélation a été réalisée à l'aide du kit Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) et de l'imageur Image Quant LAS4000 mini. Dans le second cas la révélation a été effectuée grâce à un imageur Odyssey CLx (Licor).

## 2. Résultats

### a. Génération d'une lignée d'hESCs mutante APC avec la technologie CRISPR/Cas9

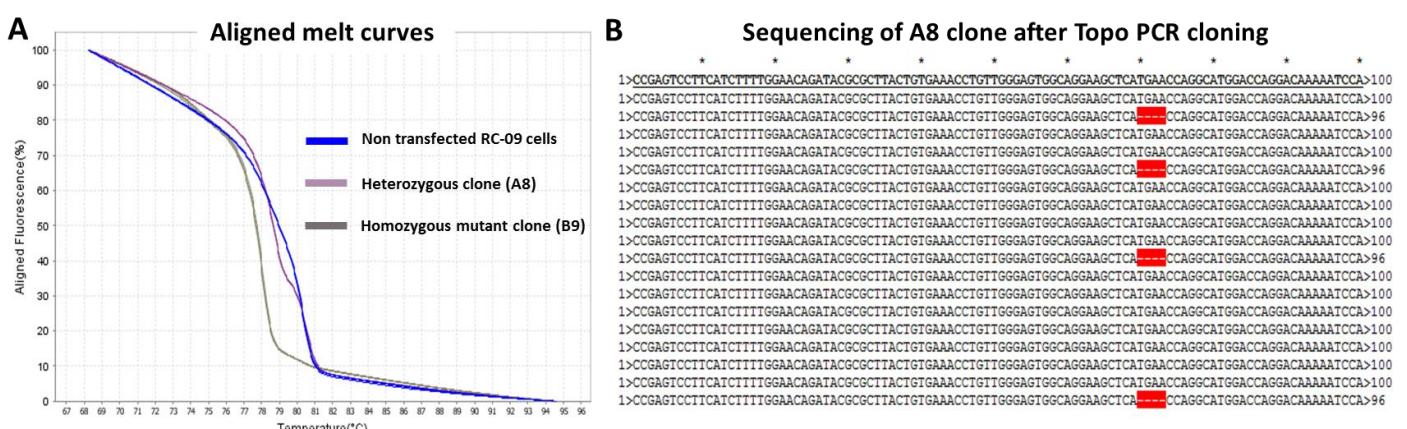
Puisque les cellules de l'EPR sont extrêmement difficiles à transfecter que ce soit par lipofection, nucléofection ou même via l'utilisation de lentivirus, cela rendait compliqué l'utilisation de siRNA pour confirmer l'implication directe de la mutation d'APC dans les différences phénotypiques observées entre lignées saines et mutantes. En effet, ces lignées provenant d'embryons différents, ces variations auraient également pu être dues à des différences de fond génétique, des variations épigénétiques ou encore à l'adaptation des cellules aux conditions de culture. De plus, la forme tronquée d'APC pouvant exercer un effet gain de fonction, la simple extinction de l'expression d'APC n'était pas suffisante pour copier les effets de la mutation. Pour pallier à cela, il fut décidé de générer par mutagénèse dirigée via l'utilisation de la technologie CRISPR/Cas9 une lignée d'hESCs RC-09 porteuse de la même mutation sur APC que la lignée APC-2.

Pour se faire, les cellules RC-09 ont été transfectées au stade pluripotent avec le plasmide pSpCas9-(BB)-2A-GFP qui permet à la fois l'expression de la Cas9, de la GFP et celle d'un ARNg ciblant l'exon 9 d'APC. 48h après transfection, environ 7% des cellules étaient porteuses d'une mutation dans la zone ciblée (**Figure 27**). Cette proportion de cellules mutées relativement peu élevée peut s'expliquer par la faible efficacité de transfection des CSPhs (environ 35% de cellules GFP<sup>+</sup>). Pour pallier à cela, nous avons tout d'abord essayé de trier par cytométrie en flux les cellules exprimant la GFP. Cependant, le tri entraînant une forte mortalité cellulaire ainsi que la différenciation des cellules récupérées, il fut finalement décidé d'isoler des clones mutants à partir du pool de cellules non triées.



**Figure 27. Proportion de cellules RC-09 mutées 48h après transfection avec le plasmide permettant l'expression de la Cas9.** (A) Quantification par puce Agilent de la proportion de fragments d'ADN clivés par la T7 endonucléase. (B) Confirmation par PCR « classique » de la présence des bandes attendues pour les fragments d'ADN clivés (flèches rouges). (La flèche noire correspond à la taille attendue pour le produit de PCR non clivé).

Afin d'isoler les clones mutés, les cellules RC-09 transfectées ont été ensemencées à basse densité pour permettre l'émergence de colonies isolées formées par une cellule unique. Ces colonies ont ensuite été repiquées dans des plaques 96 et la technique du HRM a été choisie afin de cibler rapidement un grand nombre de clones (Figure 28).

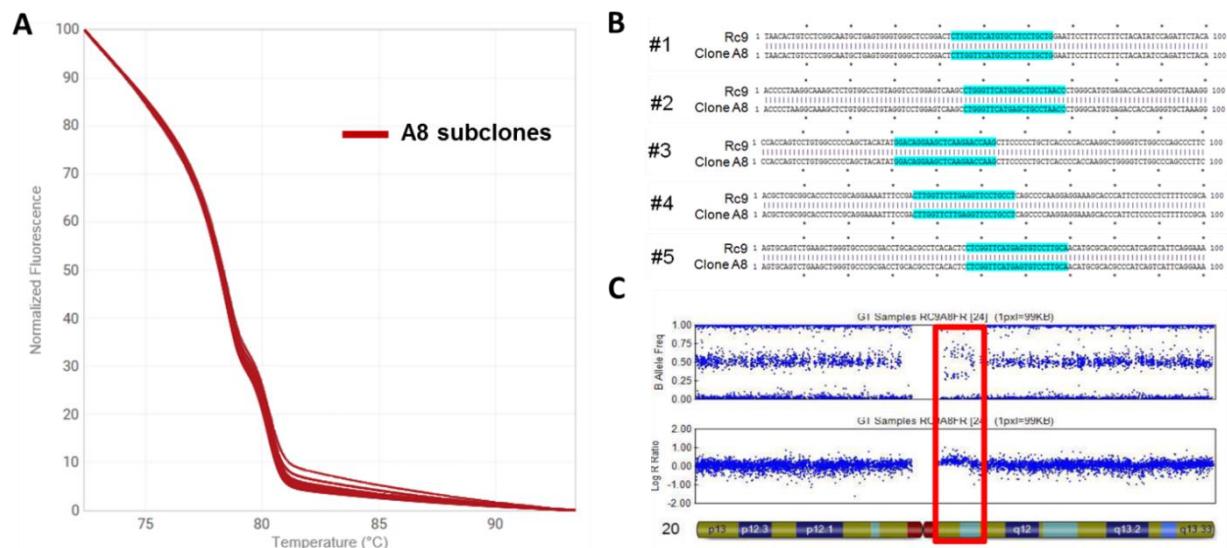


**Figure 28. Sélection des clones mutés et identification de leurs mutations par séquençage.** (A) Exemple de 2 clones mutants APC identifiés par HRM, l'un porteur d'une mutation hétérozygote et l'autre d'une mutation homozygote (B) Résultat du séquençage des 18 produits de PCR obtenue à partir de l'ADNg du clone A8 clonés dans des vecteurs TOPO BLUNT.

Sur les 96 clones testés, 11 clones hétérozygotes et 2 clones homozygotes mutants APC ont été identifiés. Malheureusement, après séquençage il s'est avéré que les 2 clones homozygotes étaient porteurs de délétion de 6 et 27 pbs n'aboutissant pas à un décalage du cadre de lecture et à

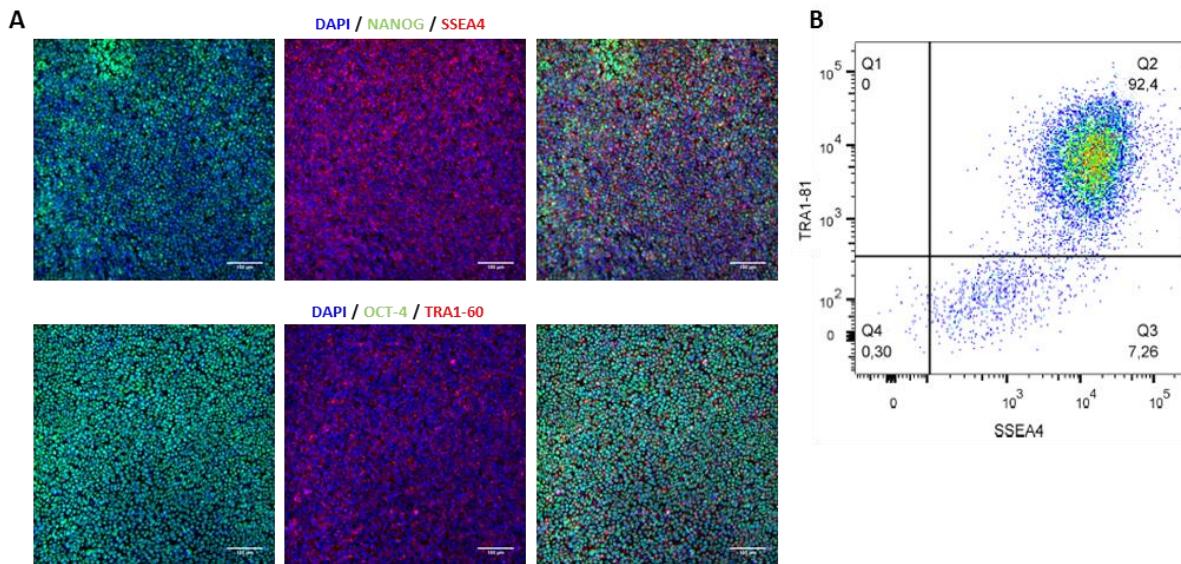
l'apparition d'un codon stop. Les clones hétérozygotes étaient quant à eux porteurs de mutations variées et c'est le clone A8 qui fut finalement sélectionné. Le choix d'utiliser ce clone plutôt qu'un autre a été motivé par le fait que la délétion de 4 pbs en position 1281 (1281dTGGA) détectée chez ce dernier aboutit à l'apparition, 76 pbs plus loin, du même codon stop que celui présent chez la lignée APC-2. De plus, le séquençage n'a révélé la présence d'aucune cellules contaminantes porteuses d'une autre mutation sur APC chez ce clone (**Figure 28**).

Par la suite, la pureté du clone A8 a été contrôlée en réalisant un nouvel ensemencement à basse densité et en vérifiant que les profils HRM de 20 sous clones étaient identiques. De plus, l'absence d'effet « off-target » a été vérifiée en séquençant les 5 séquences de l'ADN présentant le plus de chance d'être ciblées par notre ARNg en dehors de la zone voulue selon le site [crispr.mit.edu/](http://crispr.mit.edu/). Aucune mutation n'a été détectée. Enfin, nous avons vérifié l'intégrité du génome de ces cellules et avons malheureusement détecté une duplication du locus 20q11.21 (**Figure 20**). Cependant puisqu'il s'agit d'un défaut couramment observé chez les hESCs en culture (Lefort et al., 2008), cette duplication n'a probablement aucun rapport avec l'utilisation de la Cas9.



**Figure 29. Contrôle de la pureté et de l'intégrité génomique du clone A8.** (A) Profil HRM identique de 20 sous clones du clone A8. (B) Séquence des 5 sites de mutations off target les plus probables selon le site [crispr.mit.edu/](http://crispr.mit.edu/). (C) Présence d'une duplication du locus 20q11.21.

Enfin, nous avons vérifié la pluripotence des cellules obtenues en contrôlant notamment l'expression des marqueurs de surface SSEA4 et TRA1-60 ainsi que celle des facteurs de transcription OCT-4 et NANOG par immunofluorescence. L'expression des marqueurs SSEA4 et TRA1-81 a également été quantifiée par cytométrie en flux et une co-expression de plus de 90% pour ces deux marqueurs a été constatée (**Figure 30**). Dans les pages qui suivront, l'appellation RC-09 APC<sup>+/−</sup> fera référence aux cellules dérivées du clone A8.



**Figure 30. Pluripotency du clone A8.** (A) Expression des marqueurs de pluripotence NANOG, SSEA4, OCT4, et TRA1-60. (B) Quantification de l'expression des marqueurs TRA1-81 et SSEA4 par cytométrie en flux.

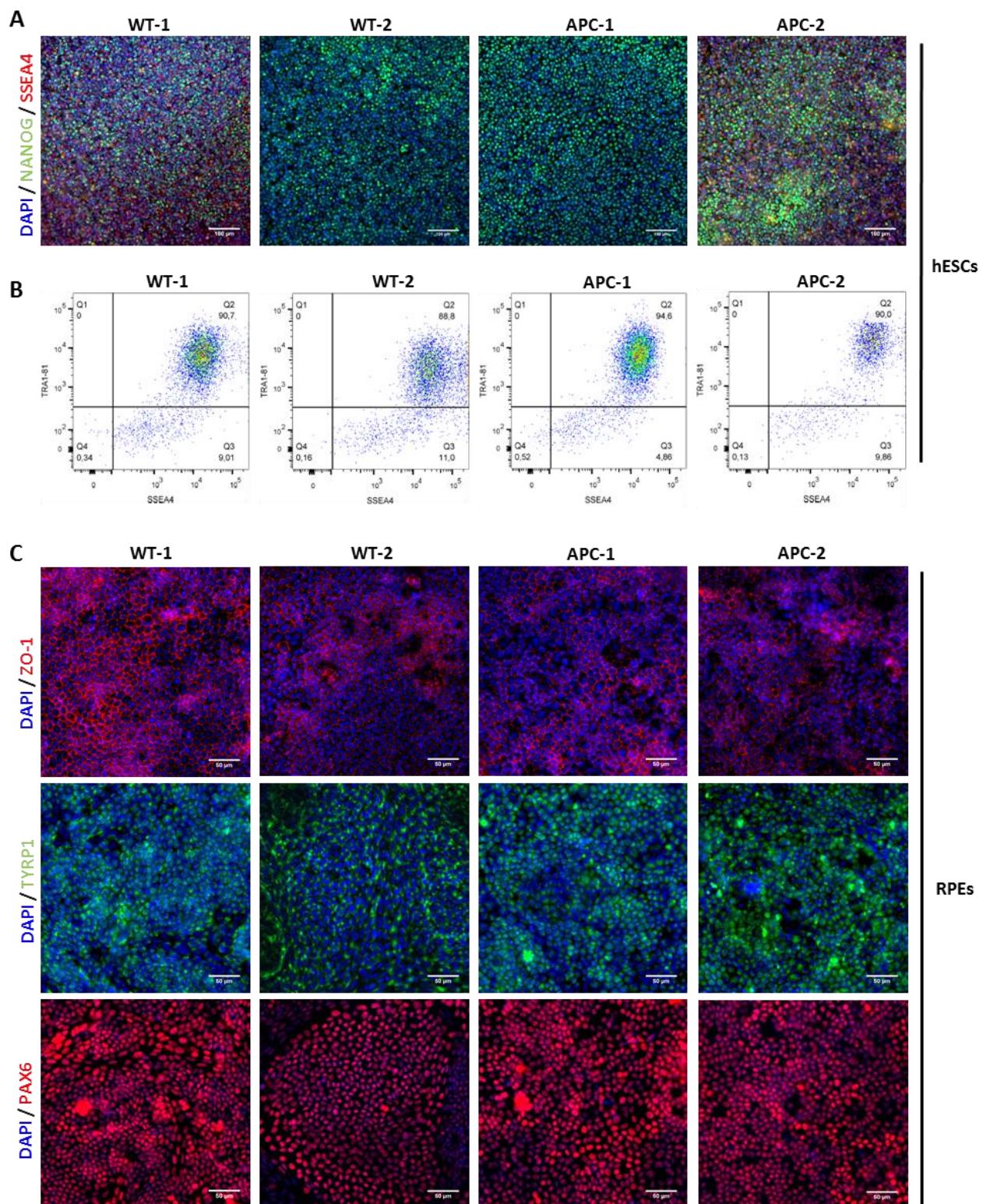
*b. Pigmentation et prolifération anormales des cellules de l'EPR mutantes APC (résultats préliminaires)*

Afin de modéliser les atteintes de l'EPR associées à la mutation d'APC, 5 lignées d'hESCs dont 2 saines, 2 mutantes APC ainsi que la lignée modifiée par ingénierie génétique décrite un peu plus haut ont été utilisées. Les informations concernant ces cellules sont récapitulées dans le Tableau 4.

	WT-1 (RC-09)	WT-2 (SA01)	APC-1 (STR-355-APC)	APC-2 (STR-305-APC)	RC-09 APC <sup>+/−</sup>
Sexe	XY	XY	XY	XY	XY
Caryotype	Normal	Normal	Duplication 20q11,21 and 3q13.11	Normal	Duplication 20q11,21
Statut APC	Sauvage	Sauvage	Hétérozygote, 3736delG (exon, codon 1246)	Hétérozygote, 1273delG (Exon 9, codon 425)	Hétérozygote, 1281dTGGA (Exon 9, Codon 427)

**Tableau 4. Récapitulatif des lignées hESCs utilisées.**

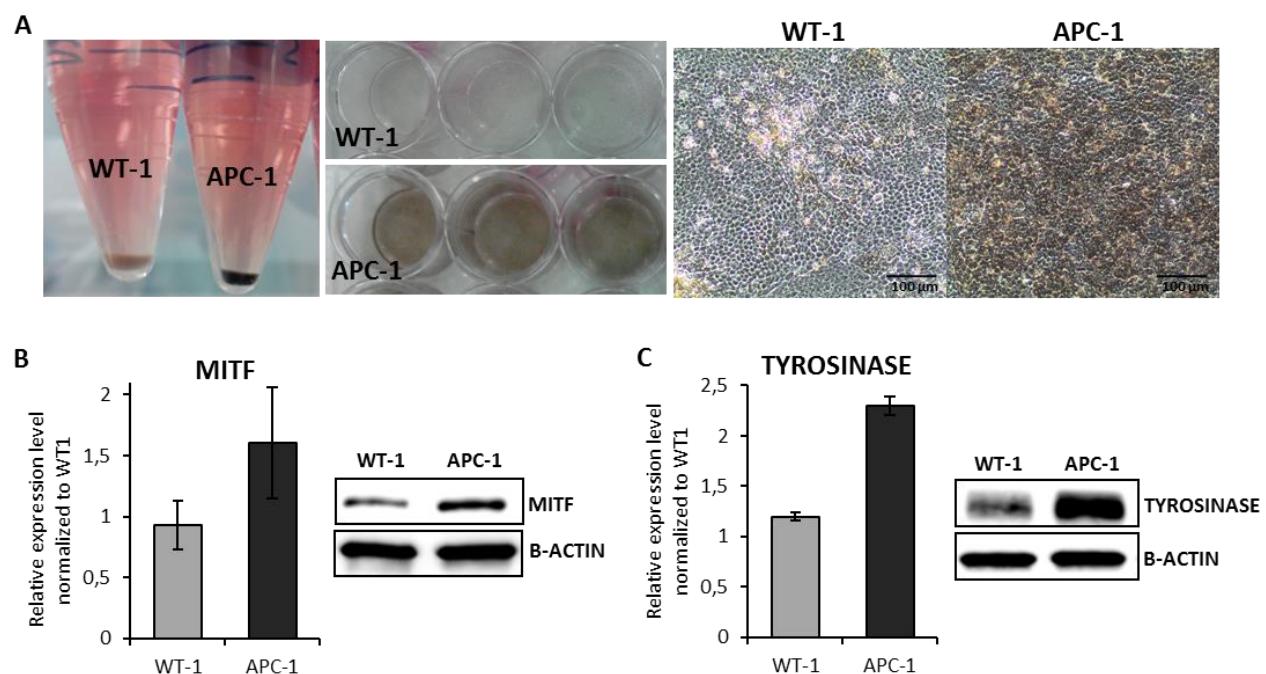
La pluripotency de ces lignées a été vérifiée avant différenciation et chacune d'entre elles présentaient une morphologie typique des hESCs et exprimaient les deux marqueurs de surfaces TRA1-81 et SSEA4 à plus de 85% (**Figure 31A et B**).



**Figure 31. Caractérisation des lignées hESCs utilisées et des cellules de l'EPR différenciées à partir de ces lignées. (A) Expression des marqueurs de pluripotence NANOG et SSEA4. (B) Quantification de l'expression des marqueurs TRA1-81 et SSEA4 par cytométrie en flue. (C) Expression des marqueurs des cellules de l'EPR ZO-1, TYRP1 et PAX6**

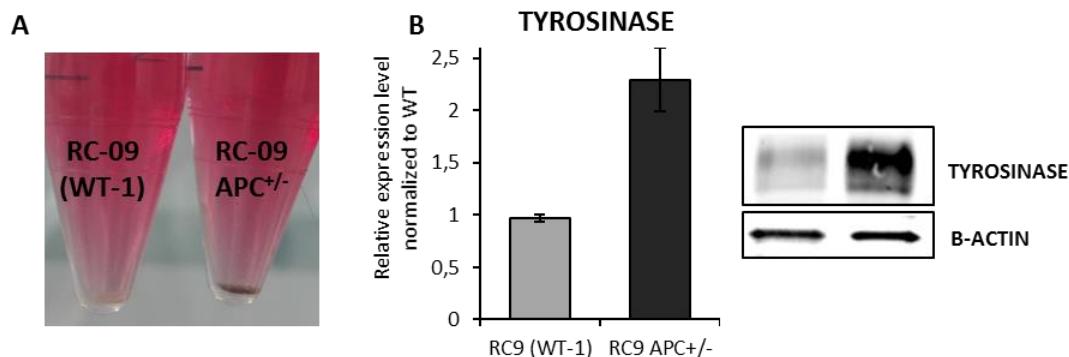
Ces 5 lignées ont ensuite été différencierées en cellules de l'EPR avec, comme évoqué précédemment, une efficacité beaucoup plus faible pour les cellules mutantes APC. Malgré tout, grâce à l'utilisation du protocole dirigé décrit plus haut et à une sélection manuelle des zones pigmentées lors du premier passage, nous sommes parvenus à obtenir des populations de cellules de l'EPR mutantes APC exprimant entre autres les marqueurs ZO1, PAX6 et TYRP1 de manière homogène à passage 2 (Figure 31c).

Nous avons alors recherché la présence d'un phénotype pathologique chez les cellules de l'EPR mutantes APC en accordant une attention particulière à leur pigmentation ainsi qu'à leur prolifération. L'observation macroscopique des cellules en cultures ainsi que celle des culots cellulaires réalisés à partir de cellules de l'EPR saines WT-1 et mutantes APC-1 suffit à se rendre compte que ces dernières sont nettement plus pigmentées (Figure 32a). Au vu de cette différence flagrante, nous avons décidé de quantifier par Western Blot l'expression de MITF, un facteur de transcription clé de la mélanogénèse ainsi que celle de la Tyrosinase, une enzyme impliquée dans la synthèse de la mélanine. Nous avons ainsi observé une expression deux fois plus importante de la tyrosinase chez les cellules mutantes APC-1 associée à une hausse de l'expression de MITF bien que plus modeste (Figure 32b).



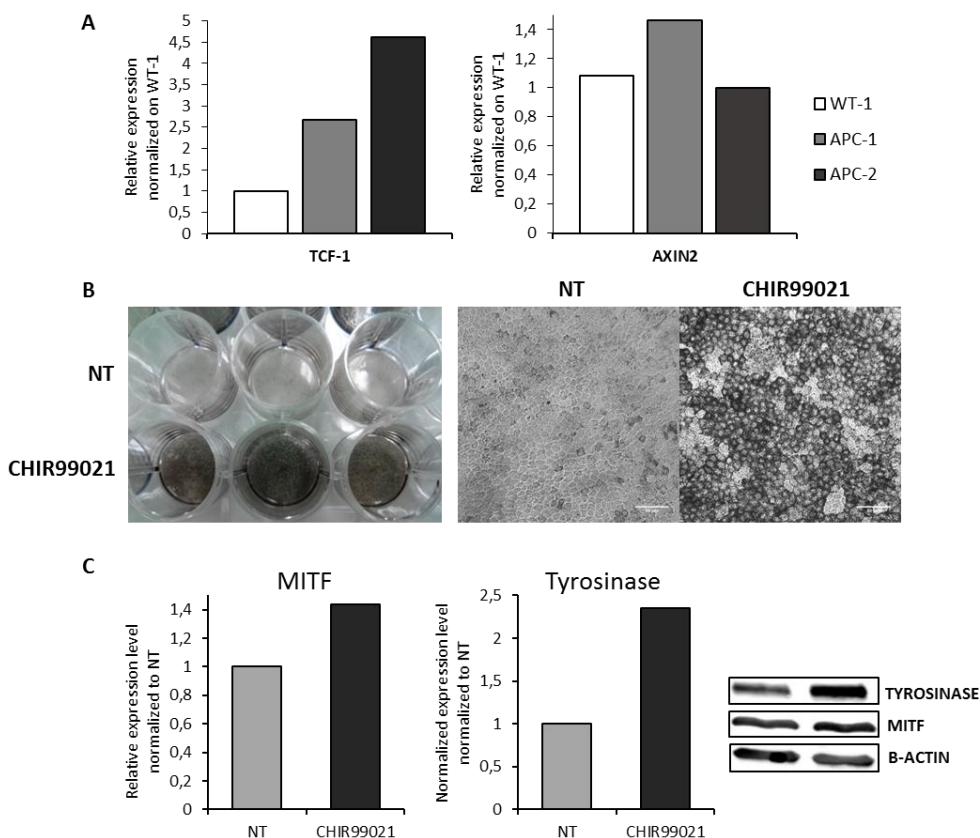
**Figure 32. Hyperpigmentation des cellules de l'EPR mutantes APC.** (A) Observation macroscopique et microscopique des cellules de l'EPR sauvages (WT-1) et mutantes APC (APC-1). (B) et (C) Quantification de l'expression de MITF et de la Tyrosinase par Western Blot ( $n = 3$ ).

Afin de confirmer que ce phénotype était bien dû à la mutation d'APC et non pas à la différence de fond génétique entre les lignées APC-1 et WT-1, nous avons également comparé la pigmentation des cellules RC-09 saines (WT-1) avec celles des cellules RC-09  $APC^{+/-}$ . Une fois de plus nous avons constaté que les cellules mutantes APC présentaient une pigmentation nettement plus marquée, associée à une expression 2 fois plus importante de la Tyrosinase au niveau protéique, confirmant l'implication de la mutation d'APC dans ce phénotype (Figure 33).



**Figure 33. Confirmation du phénotype d'hyperpigmentation chez les cellules RC-09  $APC^{+/-}$ .** (A) Culots cellulaires réalisés à partir des cellules de l'EPR RC-09 (WT-1) et RC-09  $APC^{+/-}$ . (B) Quantification de l'expression de la Tyrosinase par Western Blot ( $n = 3$ ).

Nous avons ensuite cherché à déterminer si l'hyperpigmentation des cellules mutantes APC pouvaient être due à une activation anormale de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine chez ces dernières. Pour cela, nous avons tout d'abord vérifié par immunofluorescence si la mutation hétérozygote d'APC suffisait à induire une accumulation nucléaire de la  $\beta$ -caténine chez les cellules de l'EPR, mais aucune différence entre les cellules saines et les cellules mutantes APC n'a été constatée. Nous nous sommes alors intéressés à l'expression de certains gènes tels que TCF-1 et l'AXIN2 dont il est connu que l'expression est régulée par la voie Wnt canonique. Si l'expression de TCF-1 semble bel et bien accrue chez les cellules mutantes APC, aucune différence n'a été observée pour l'AXIN2 (Figure 34a) et des expériences supplémentaires seront donc nécessaires afin de déterminer si la voie Wnt est anormalement activée chez ces cellules. Malgré cela, nous avons décidé de vérifier si l'activation de cette voie de signalisation était suffisante pour induire l'hyperpigmentation des cellules de l'EPR. Pour cela nous avons traité des cellules saines (WT-1) avec du CHIR99021 et avons constaté chez les cellules traitées une pigmentation plus importante associée à une surexpression de MITF et de la Tyrosinase de manière semblable à ce qui est observée chez les cellules mutantes APC (Figure 34b et c). Par conséquent, il est possible que l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine soit responsable de l'augmentation de la pigmentation chez les cellules de l'EPR mutantes APC mais des expériences supplémentaires demeurent nécessaire afin d'établir un lien direct entre les deux dans ce contexte.

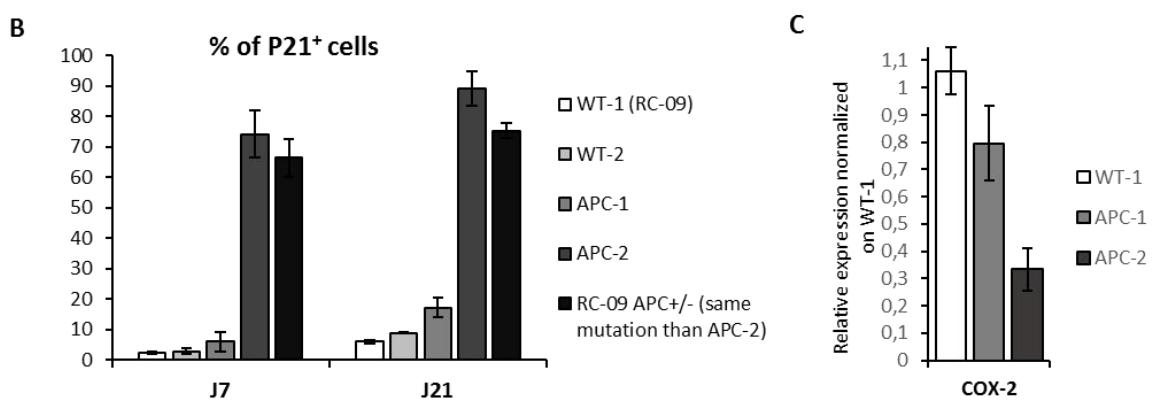
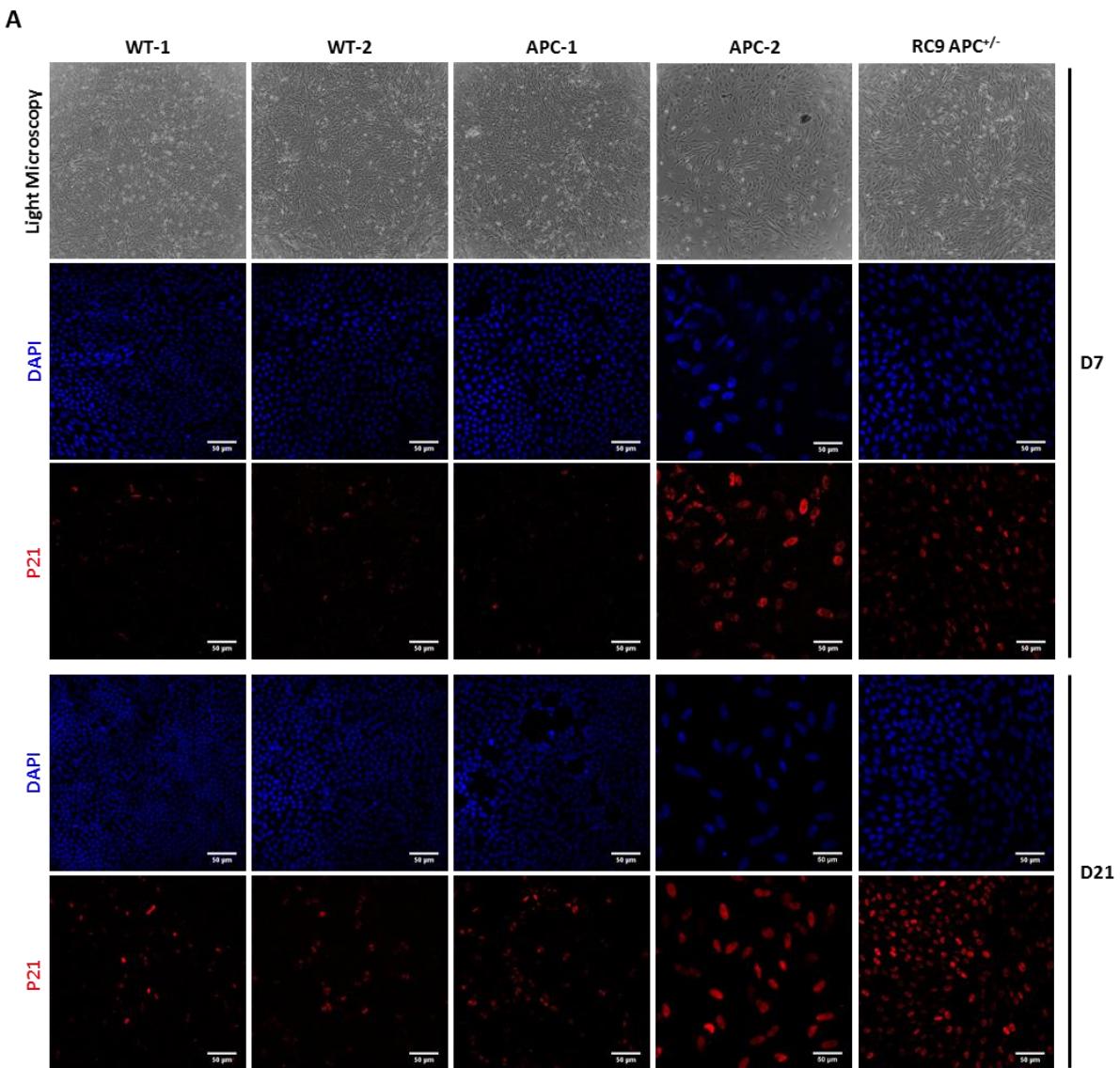


**Figure 34. Effet de l'activation de la voie Wnt/β-caténine sur la pigmentation des cellules de l'EPR.**

(A) Expression relative des gènes TCF-1 et AXIN2 quantifiée par qPCR (B) Observation macroscopique et microscopique des cellules de l'EPR traitées avec du CHIR99021 ou non après 21 jours de culture.

(c) Quantification de l'expression de MITF et de la Tyrosinase par Western Blot (n = 1).

D'un autre côté, nous avons rapidement constaté que les cellules de l'EPR porteuses d'une mutation sur l'exon 9 d'APC (APC-2 et RC-09 APC<sup>+/−</sup>) proliféraient moins rapidement que les cellules saines. Un phénotype qui apparaît en revanche moins marqué chez les cellules porteuses d'une mutation sur l'exon 15 (APC-1) (Figure 35a). Nous avons donc décidé de nous intéresser chez ces cellules à l'expression de P21, un marqueur de la sénescence. De manière cohérente avec les observations faites en culture, près de 75% des cellules de l'EPR mutantes APC-2 expriment P21 à passage 2 après seulement 7 jours de culture contre un peu moins de 3% pour les deux lignées saines (WT-1 et WT-2) et un peu plus de 6% pour la lignée APC-1. Qui plus est, ce phénotype est retrouvé chez la lignée RC-09 APC<sup>+/−</sup> avec plus de 66% de cellules exprimant P21 ce qui suggère que c'est bien la mutation d'APC qui en est responsable. Après 21 jours de culture les cellules APC-1 semblent également exprimées P21 de manière un peu plus importante que les cellules saines (17,3% contre 6,0% pour la lignée WT1 et 8,9% pour la WT-2) bien que cela reste très inférieur à ce qui est observé pour les lignées APC-2 et RC-09 APC<sup>+/−</sup> à ce stade (89,2 et 75,6%) (Figure 35b).



**Figure 35. Ralentissement de la prolifération des cellules de l'EPR mutantes APC.** (A) Expression du marqueur de la sénescence P21 par les cellules de l'EPR sauvages (WT-1 et WT-2) et mutantes APC (APC-1, APC-2 et RC-09 APC<sup>+/−</sup>) (n = 3). (B) Pourcentage de cellules exprimant P21 après 7 et 21 jours de culture. (C) Expression relative du gène COX-2 quantifiée par qPCR (n = 3).

Puisqu'aucun retard de prolifération n'avait été observé chez les cellules traitées avec du CHIR99021 lors des expériences visant à reproduire le phénotype d'hyperpigmentation, il est peu probable que l'activation de la voie WNT/β-caténine soit responsable du ralentissement de la croissance des cellules de l'EPR porteuses d'une mutation sur l'exon 9 d'APC. Nous avons donc recherché d'autres voies de signalisation dérégulées par cette mutation pouvant potentiellement être impliquées dans ce phénotype. De manière surprenante et à l'inverse de ce qui a été décrit dans le colon, nous avons observé par qPCR une forte diminution de l'expression de COX-2 chez les cellules de l'EPR mutantes APC-2 (**Figure 35C**). Or, il a déjà été mise en évidence dans d'autres contextes que l'inhibition de COX-2 pouvait induire une augmentation de l'expression de P21. De plus, la diminution de l'expression de COX-2 apparaît moins importante chez les cellules mutantes APC-1 ce qui serait cohérent avec le phénotype moins marqué de ces dernières. La diminution de l'expression de COX-2 chez les cellules de l'EPR porteuses d'une mutation sur l'exon 9 d'APC apparaît donc comme un mécanisme pouvant potentiellement être impliqué dans le ralentissement de leur prolifération bien que des expériences additionnelles soient nécessaire pour le démontrer.

### 3. Discussion et perspectives

La différenciation des hESCs mutantes APC en cellules de l'EPR s'est révélée beaucoup plus compliquée que prévue et plusieurs raisons peuvent être avancées pour l'expliquer. Tout d'abord, il est possible que la mutation d'APC aboutisse à une activation anormale de la voie Wnt/β-caténine chez les hESCs. Or, si l'effet de l'activation de cette voie de signalisation à ce stade est sujet à débat, certains ayant démontré qu'elle permettait de maintenir les hESCs à l'état indifférencié (Sato et al., 2004) tandis que d'autres suggèrent qu'elle permet l'engagement de ces cellules vers le lignage mésodermique (Davidson et al., 2012), il semble clair qu'elle n'induit pas la différenciation des CSPhs en progéniteurs neuro-ectodermiques et représente donc un désavantage pour la différenciation des cellules de l'EPR. Une autre explication plausible provient du fait que l'un des phénotypes observés chez les cellules de l'EPR mutantes APC et dont il sera question un peu plus bas est un ralentissement de la prolifération potentiellement associé à une sénescence prématûrée. Il est donc possible que le faible rendement observé ne soit pas dû à un défaut de différenciation mais plutôt à un désavantage sélectif pour les cellules de l'EPR mutantes APC en culture favorisant l'émergence d'autres types cellulaires.

Quelles qu'en soient les raisons, cette difficulté à obtenir des cellules de l'EPR mutantes APC a considérablement ralenti l'avancement de ce projet tout au long de ma thèse. C'est pourquoi les résultats présentés ci-dessus restent très préliminaires et doivent par conséquent être interprétés avec précaution. Toutefois, la comparaison entre les cellules de l'EPR dérivées d'hESCs saines et

mutantes APC suggèrent fortement un rôle de cette protéine dans la régulation de la mélanogénèse et de la prolifération de ces cellules.

#### *a. Hyperpigmentation des cellules de l'EPR mutantes APC*

La première chose que l'on constate lorsque l'on compare les cellules de l'EPR saines et mutantes APC est l'hyperpigmentation des cellules mutantes. Ce phénotype coïncide avec l'observation post-mortem de granules pigmentaires de tailles anormales chez des patients atteints de PAF (Kasner et al., 1992; Traboulsi et al., 1990). Cependant, il est à noter que ce phénomène semble largement amplifié dans nos cultures par rapport à ce qui est observé chez les patients. Il est difficile de savoir avec certitude les raisons d'une telle exacerbation. Mais il est possible que cela soit dû au fait qu'en culture, les cellules de l'EPR dérivées d'hESCs synthétisent de la mélanine en continu tandis qu'*in vivo* cette synthèse n'a lieu qu'au cours d'une fenêtre de temps restreinte lors du développement embryonnaire (Boulton, 2014). Ceci permet sans doute la mise en place d'une différence plus marquée entre cellules saines et mutantes APC au fil du temps. D'autre part, l'augmentation de la synthèse de la mélanine par les cellules de l'EPR mutantes APC n'est pas la seule explication possible à l'aspect plus pigmenté de ces dernières en culture. En effet, puisque nous avons observé en parallèle que les cellules mutantes proliféraient moins rapidement que les cellules saines, cette impression peut également être due à une dilution moins importante des granules pigmentaires entre cellules filles résultant d'un plus faible nombre de division cellulaire. Cela dit, l'augmentation de l'expression de MITF et de la Tyrosinase observée par Western Blot semble tout de même confirmer l'augmentation de la mélanogénèse chez les cellules mutantes APC.

Nous avons donc recherché les mécanismes responsables de ce phénotype. Puisque que le rôle le plus décris d'APC est celui de répresseur de la voie Wnt/β-caténine et qu'il a été démontré que cette voie de signalisation régulait l'expression de MITF chez les mélanocytes (D'Mello et al., 2016), nous avons commencé par chercher à déterminer si son activation était responsable de l'hyperpigmentation des cellules de l'EPR mutantes APC. Mais bien que nous ayons observé que l'activation de la voie Wnt canonique à l'aide du CHIR99021 induisait bel et bien une augmentation de la pigmentation des cellules de l'EPR associée à une hausse de l'expression de MITF et de la Tyrosinase, nous ne sommes pas parvenus à mettre clairement en évidence une activation anormale de cette voie de signalisation chez les cellules mutantes APC. Il nous est donc pour le moment impossible de conclure sur le rôle joué par l'activation de la voie Wnt/β-caténine dans l'hyperpigmentation de ces cellules. Il est à noter qu'il existe plusieurs systèmes rapporteurs tel que le plasmide TOPFlash (TCF Reporter Plasmid) qui permettent de mesurer plus précisément l'activation de la voie Wnt canonique que les méthodes que nous avons employé. Cependant,

puisque il est difficile de transfecter efficacement les cellules de l'EPR, leur utilisation était compliquée dans notre cas.

Ainsi, des expériences supplémentaires seront nécessaires pour comprendre les mécanismes responsables de l'augmentation de la mélanogénèse chez les cellules de l'EPR mutantes APC. L'observation par microscopie électronique du stade de maturation des mélanosomes chez les cellules de l'EPR saines et mutantes pourrait, par exemple, se révéler pertinente dans le but d'identifier quelles étapes de la mélanogénèse sont affectées par la mutation d'APC. L'identification de ces mécanismes devrait permettre de mieux comprendre la régulation d'un phénomène qui, jusqu'à présent, a principalement été étudié dans les mélanocytes. Or, puisqu'à l'inverse de ces dernières les cellules de l'EPR ne produisent plus de mélanine après la naissance, il est probable que la régulation de la mélanogénèse varie entre ces 2 types cellulaires. L'absence de mélanogénèse chez les cellules de l'EPR adultes aboutit d'ailleurs à une diminution du contenu en mélanine chez ces cellules au cours du vieillissement. L'impact fonctionnel de cette diminution demeure ambigu mais elle pourrait considérablement réduire la protection des cellules de l'EPR contre le stress photo-oxydatif participant ainsi à l'étiologie de la DMLA (Dontsov et al., 2017; Sarna et al., 2003). Comprendre les mécanismes régulant la mélanogénèse chez les cellules de l'EPR pourrait donc permettre de jouer sur la synthèse de la mélanine et ainsi prévenir l'augmentation du stress photo-oxydatif de la rétine au cours du vieillissement.

D'une manière plus générale, les résultats présentés ici suggèrent qu'il est possible d'utiliser les CSPhs afin de modéliser les maladies affectant la pigmentation des cellules l'EPR telle que l'albinisme oculaire qui regroupe un ensemble de pathologies se caractérisant par une hypopigmentation de l'EPR et de l'iris associées à une acuité visuelle réduite et une photophobie. Bien que la cause la plus fréquente d'albinisme oculaire soit la mutation du gène AO1, le rôle de cette protéine lors de la mélanogenèse demeure flou et ceci en partie à cause de l'absence de modèle pertinent permettant l'étude des fonctions de cette protéine *in vitro* (Burgoyne et al., 2015; Schiaffino, 2010). En effet, puisque la plupart des lignées primaires ou immortalisées de cellules de l'EPR ne synthétisent pas de mélanine, les fonctions de cette protéine ont jusqu'à présent principalement été étudiées chez les mélanocytes, bien que les patients atteints par cette mutation présentent rarement des défauts pigmentaires au niveau de la peau. Par conséquent, les cellules de l'EPR dérivées de CSPhs représentent une opportunité unique d'étudier dans un contexte humain les mécanismes responsables de l'albinisme oculaire de type 1.

### *b. Défaut de prolifération des cellules de l'EPR mutantes APC*

Le ralentissement de la prolifération que nous avons observé chez les cellules de l'EPR mutantes APC n'était pas attendu et donc plutôt surprenant. Pour autant, ce n'est pas la première fois qu'une augmentation de l'expression de P21 suite à la mutation d'APC est rapportée. En effet, en 2010 Cole et al. ont démontré que la délétion d'APC au niveau des cellules de l'épithélium rénal induisait la sénescence de ces dernières, sénescence caractérisée par une forte expression de P21 (Cole et al., 2010). Dans ce papier, les auteurs suggèrent que ce phénomène non retrouvé chez les cellules intestinales explique le fait que cette mutation ne soit pas un élément déclencheur du cancer du rein. Dès lors, il n'est pas exclu que ce mécanisme protecteur fonctionne dans d'autres tissus. En effet, APC étant exprimée de manière ubiquitaire, il est intrigant que l'intestin soit affecté dans de telles proportions tandis que les cancers extra-intestinaux dus à la mutation de ce gène demeurent relativement rares.

Dans notre cas, bien que cela reste à confirmer, il est intéressant de constater que les cellules de l'EPR porteuses d'une mutation sur l'exon 9 d'APC semblent présenter une expression de P21 et un ralentissement de la prolifération beaucoup plus important que celles porteuses d'une mutation sur l'exon 15. En supposant que cette différence soit bien due à la position de la mutation sur APC, cela suggère que la synthèse d'une protéine tronquée trop courte est un désavantage pour la croissance des LPFOs et coïncide avec le fait que les patients porteurs d'une mutation vers l'extrémité 5' d'APC présente rarement ce type de lésions (Nieuwenhuis and Vasen, 2007). Cela suggère également que le ou les domaines d'APC dont la perte est impliquée dans ce phénotype de sénescence, se trouve(nt) entre les codons 427 (mutation APC-2) et 1246 (mutation APC-1). Cette région comprend notamment le domaine Armadillo ainsi que les 3 répétitions de 15 AAs et une des sept répétitions de 20 AAs permettant à APC de se lier à la  $\beta$ -caténine. L'activation plus importante de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine chez les cellules de l'EPR porteuses d'une mutation sur l'exon 9 d'APC que chez les cellules porteuses d'une mutation sur l'exon 15 semblait donc une explication plausible au phénotype plus marqué des premières. Cependant, puisque le traitement des cellules saines avec du CHIR99021 qui est un activateur fort de cette voie de signalisation n'a semblé entraîner aucun retard de prolifération chez ces dernières, il est peu probable que l'activation de la voie Wnt canonique soit impliquée dans ce phénomène. Nous avons donc recherché d'autres mécanismes dérégulés par la mutation d'APC pouvant expliquer l'augmentation de l'expression de P21. De manière surprenante, nous avons constaté qu'à l'inverse de ce qui est décrit aux niveaux des adénomes colorectaux, la mutation d'APC induisait une diminution de l'expression de COX-2 chez les cellules de l'EPR et que cette diminution était particulièrement importante chez les cellules porteuses d'une mutation sur l'exon 9. Or, il a déjà été mis en évidence dans d'autres types cellulaires que l'inhibition de COX-2

pouvait induire un processus de sénescence via l'augmentation de l'expression de P21 (Chen et al., 2008; Toyoshima et al., 2002). Bien qu'à l'heure actuelle rien ne nous permette de faire le lien entre la diminution de l'expression de COX-2 et l'augmentation de celle de P21 chez les cellules de l'EPR, il s'agit d'une piste intéressante à explorer. Si cette hypothèse se révélait exacte, l'utilisation d'inhibiteur de COX-2 dans le cadre de rétinopathies impliquant une prolifération anormale des cellules de l'EPR, telles que les vitréorétinopathies prolifératives, pourrait se révéler pertinente. Des inhibiteurs de ce type tel que le Célécoxib présentent l'avantage d'être déjà utilisés en clinique dans le cadre de pathologies non rétiniennes.

Là encore, des expériences supplémentaires seront donc nécessaires afin de déterminer comment la mutation d'APC induit l'expression de P21 chez les cellules de l'EPR. De multiples voies de signalisation ont été impliquées dans la régulation de l'expression de P21 et sont généralement classées en 2 grandes catégories selon qu'elles soient dépendantes ou non de p53 (Jung et al., 2010). Ainsi, déterminer si l'augmentation de l'expression de P21 induite par la mutation d'APC chez les cellules de l'EPR est dépendante de P53 permettrait d'apporter un premier éclairage sur les mécanismes impliqués.

## DISCUSSION GENERALE

Une discussion propre aux résultats obtenus aux cours de ma thèse a déjà été réalisée dans la partie précédente. Celle qui va suivre sera donc consacrée à des réflexions plus générales sur l'utilisation des CSPhs pour la modélisation et le traitement de pathologies rétiniennes ainsi que sur leur possible utilisation pour la modélisation des symptômes non rétiniens associés à la PAF.

### I. Utilisation des CSPhs pour modéliser et traiter les rétinopathies

Les problématiques liées à l'utilisation des cellules souches pluripotentes seront abordées dans le cadre des pathologies rétiniennes, mais il est à noter que la plupart des limites soulevées s'appliquent à l'utilisation des CSPhs en général.

#### 1. Différenciations rétiniennes des CSPhs : le plus dur reste à faire

D'une manière générale, que ce soit pour des applications de thérapie cellulaire ou de modélisation pathologique, l'un des principaux obstacles à l'utilisation des CSPhs est le manque de protocoles robustes permettant la différenciation de ces dernières vers le type cellulaire d'intérêt. Concernant la différenciation des cellules rétiniennes, des efforts considérables ont été réalisés ces dernières années afin de récapituler les premières étapes de la rétinogenèse *in vitro*. Cependant, bien qu'il soit désormais possible de générer des CPRs de manière efficace à partir de CSPhs, notre capacité à orienter la différenciation terminale de ces dernières vers un type cellulaire en particulier demeure très limitée et seule la différenciation des cellules de l'EPR est bien maîtrisée à ce jour. Malheureusement, contrairement à la différenciation des cellules de l'EPR qui est principalement induite par des facteurs extrinsèques pouvant facilement être récapitulés *in vitro* tels que les signaux Wnt et Activine sécrétés par le mésenchyme péri-oculaire, la spécification des cellules composant la rétine neurale semble être régulée par des mécanismes beaucoup plus complexes et ne dépend pas uniquement de cytokines pouvant être ajoutées au milieu de culture. Certaines études suggèrent même qu'*in vivo*, cette différenciation serait en grande partie stochastique dépendant simplement d'une certaine probabilité partagée par tous les CPRs de donner l'un ou l'autre des types cellulaires de la rétine (Gomes et al., 2011; He et al., 2012). Il risque par conséquent d'être difficile d'orienter efficacement ces dernières vers un type cellulaire en particulier.

Ceci étant dit, plusieurs équipes ont déjà démontré qu'il était possible de favoriser *in vitro* la différenciation des CPRs en photorécepteurs via l'utilisation de diverses molécules telles que la Taurine, l'A.R (Osakada et al., 2008) ou encore le facteur COCO (Zhou et al., 2015), bien que le rôle de ces molécules dans la spécification des cellules rétiniennes *in vivo* au cours du développement

embryonnaire demeure ambigu. De la même manière, il a été démontré que l'utilisation de la Forsekoline permettait de favoriser la différenciation des cellules ganglionnaires par un mécanisme qui reste à déterminer (Sluch et al., 2015). Mais malgré ces améliorations, les protocoles décrits jusqu'à aujourd'hui demeurent relativement inefficaces et impliquent le plus souvent une étape de tri par cytométrie en flux à partir de structures de type « optic cup » si l'on souhaite obtenir une population cellulaire pure, ce qui est difficilement compatible avec des applications cliniques ou simplement la production de grandes banques de cellules. De plus, la différenciation des CSPhs vers les autres types cellulaires de la rétine telles que les cellules bipolaires et amacrines a été largement délaissée jusqu'ici.

Ainsi, l'absence de protocoles efficaces permettant d'orienter la différenciation terminale des CPRs demeure pour le moment un frein à la modélisation et au traitement par thérapie cellulaire de nombreuses rétinopathies telles que les glaucomes qui entraînent la dégénérescence des cellules ganglionnaires ou la rétinopathie diabétique qui affecte la plupart des cellules rétiniennes. L'amélioration de ces protocoles se révèle donc d'une importance capitale et puisque les études développmentales menées jusqu'ici n'apporte que peu de pistes à explorer dans ce sens, il est nécessaire d'établir de nouvelles stratégies afin d'identifier des facteurs extrinsèques permettant d'orienter le devenir des CPRs *in vitro* même si ces facteurs n'interviennent pas nécessairement dans ce processus lors du développement embryonnaire. Afin de découvrir de tels composés, des campagnes de criblage semblables à celles ayant permis à *Maruotti et al* ( Maruotti et al., 2015) d'identifier la Chetomin comme un inducteur de la différenciation des cellules de l'EPR pourraient être envisagées pour chaque type cellulaire de la rétine. Ce genre de criblage semble d'autant plus réalisable que ces types cellulaires sont extrêmement bien caractérisés et que des marqueurs spécifiques ont été identifiés pour chacun d'entre eux permettant ainsi d'évaluer rapidement l'effet d'une molécule sur le devenir des CPRs. Au laboratoire I-stem, des criblages à haut débit sont régulièrement réalisés afin d'identifier de nouveaux composés thérapeutiques dans le cadre de maladies monogéniques variées, il est donc tout à fait envisageable d'utiliser notre savoir-faire dans ce domaine pour cibler des composés influençant la différenciation des CPRs. Toutefois, de tels criblages nécessitent des étapes importantes de miniaturisation et d'optimisation des coûts d'autant plus que dans le cadre d'un projet visant à mettre au point un protocole de différenciation, le facteur temps est à prendre en compte et multiplie donc le nombre de conditions à tester.

## 2. Utilisation des CSPhs pour la thérapie cellulaire : leçons à tirer de la greffe des cellules de l'EPR

La thérapie cellulaire est sans doute l'utilisation la plus évidente et la plus prometteuse des CSPhs. En effet, la possibilité de pouvoir remplacer un tissu endommagé ou malade par des cellules saines produites en laboratoire apparaît comme une solution attractive pour traiter bon nombre de pathologies. Dans ce contexte ultra compétitif, les cellules de l'EPR furent parmi les premières cellules dérivées de CSPhs à avoir été greffées chez l'homme il y a de cela 7 ans (Schwartz et al., 2012). Plusieurs facteurs peuvent expliquer le choix de ces cellules pour les premiers essais de thérapie cellulaire. Tout d'abord, comme expliqué précédemment l'œil est un organe présentant de nombreux avantages facilitant la transplantation, la survie et le suivi du greffon (Introduction partie IV.4). Ensuite, le fait qu'en culture les CSPhs se différencient spontanément en cellules de l'EPR associé à la possibilité de facilement reconnaître et purifier ces cellules grâce à leur pigmentation et leur morphologie a permis de rapidement obtenir une population pure de cellules de l'EPR tout en respectant les contraintes de bonnes pratiques de fabrication. Ces avantages couplés au fait que le dysfonctionnement et la dégénérescence des cellules de l'EPR sont impliqués dans certaines cas de rétinites pigmentaires et dans la DMLA ont poussé de nombreuses équipes à se lancer dans des essais cliniques visant à greffer ces cellules chez des patients atteints par ces pathologies (da Cruz et al., 2018; Kashani et al., 2018; Mandai et al., 2017a; Schwartz et al., 2015). Dans leur ensemble, ces premiers essais ont permis de démontrer la sûreté et dans une certaine mesure l'efficacité de la greffe de CSPhs différenciées, ce qui est très prometteur pour l'avenir. Ces essais ont également permis de mettre en place l'ensemble des procédures nécessaires à la translation clinique d'un produit de thérapie cellulaire dérivé de CSPhs ce qui facilitera les prochaines tentatives de greffe chez l'homme, que ce soit pour le remplacement de cellules de l'EPR ou d'un autre type cellulaire. Toutefois, certaines erreurs commises ont également permis d'identifier des facteurs clefs à prendre en compte avant de se lancer dans un projet de thérapie cellulaire car difficilement modifiable en cours de route.

Avec le recul, il me semble par exemple qu'il aurait été souhaitable de perfectionner le protocole de différenciation des CSPhs en cellules de l'EPR avant de se lancer dans des essais cliniques afin d'anticiper une application à grande échelle dès le départ. En effet, jusqu'à présent les cellules de l'EPR greffées chez l'homme ont toutes été générées avec un protocole de différenciation incluant un enrichissement manuel des zones pigmentées. Or, comme précisé précédemment, si cette stratégie permet effectivement d'obtenir une population pure de cellule de l'EPR, elle n'est pas envisageable à grande échelle et ne pourra donc pas être utilisée en routine même si les essais cliniques se révèlent fructueux. Des protocoles plus efficaces (Buchholz et al., 2013; Idelson et al.,

2009; Maruotti et al., 2015), dont notre protocole automatisé, sont dorénavant disponibles et doivent être rapidement adaptés aux exigences de bonnes pratiques de fabrication afin de permettre leurs utilisations en clinique. Cependant, il va désormais falloir démontrer que les cellules produites avec ces nouveaux protocoles sont équivalentes à celles greffées jusqu'à présent. Pour cela il faudra probablement recommencer les études pré-cliniques et cliniques ayant permis de prouver que l'utilisation de ces cellules ne représente aucun danger, ce qui va nécessiter du temps et des ressources non négligeables. Ainsi, afin de ne pas se retrouver confronté aux mêmes problèmes pour la greffe des photorécepteurs, il serait à mon avis judicieux de perfectionner autant que possible la différenciation des CSPhs vers ce type cellulaire avant d'envisager le passage en essai clinique et ne pas se contenter, par exemple, de les purifier par cytométrie en flux à partir d'«optic-cup ».

Il est également intéressant de constater que la plupart des effets secondaires observés lors des premiers essais cliniques ne sont pas dus à la présence du greffon mais plutôt à la procédure chirurgicale (da Cruz et al., 2018). Ceci suggère qu'il sera nécessaire à l'avenir de perfectionner la manière dont on apporte les cellules aux patients, avec par exemple la création de nouveaux systèmes d'injection, autant que la fabrication du greffon en lui-même.

D'autre part, les difficultés rencontrées par l'équipe du Dr. Takahashi lors de son essai clinique ont permis de mettre en évidence que la greffe de cellules autologues bien que très attractive en théorie pour limiter les risques de rejet était pour le moment inenvisageable en pratique. En effet, même en faisant abstraction des anomalies génomiques observées chez les hiPSCs reprogrammées à partir des cellules du second patient qui l'ont obligé à arrêter l'essai (Garber, 2015), le coût de production d'un greffon était astronomique et s'élevait à plusieurs centaines de milliers d'euros ce qui empêche naturellement toute perspective de commercialisation. Pourtant, certaines équipes continuent d'explorer cette piste et souhaite même corriger la mutation de cellules de patients atteints d'une rétinopathie héréditaire par mutagénèse dirigée avant de les reprogrammer et de les différentier en cellules rétiniennes pour les greffer, ajoutant encore un coût supplémentaire à la production de ces cellules (Burnight et al., 2017). Mais à moins que ces équipes ne parviennent à réduire de manière drastique les coûts liés à la génération de lignées hiPSCs, la greffe autologue est vouée à rester au stade de preuve de concept. Pour l'heure, la greffe allogénique demeure donc l'option la plus réaliste bien que nécessitant un traitement immunosupresseur. Dans le cas de l'œil qui est un organe dis immuno- privilégié, la nécessité d'un tel traitement a souvent été débattu. Cependant puisque plusieurs études suggèrent que ce privilège n'est pas parfait (Algvere et al., 1999; Streilein et al., 2002; Sugita et al., 2017; Zhang and Bok, 1998), tous les patients greffés jusqu'à aujourd'hui ont reçu un traitement immunosupresseur soit par voie orale soit sous la forme d'implants intraoculaires. L'observation qu'un implant local est suffisant pour

maintenir la survie du greffon à long terme devrait d'ailleurs permettre à l'avenir de limiter les effets secondaires liés à un traitement immunosupresseur systémique (da Cruz et al., 2018). Une autre approche, plus réaliste d'un point de vue économique que la greffe autologue, a été envisagé afin de limiter les risques de rejet. Il s'agit de la création de banques d'hiPSCs « haplotypées » à partir de donneurs sélectionnés selon leur profil HLA de manière à ce que ces lignées soient compatibles avec le plus de receveurs possibles. Toutefois des études supplémentaires seront nécessaires afin de déterminer avec précision combien de lignées différentes vont être requises pour couvrir une majorité de la population et dans quelles mesures l'utilisation de ces cellules « haplotypées » permet de diminuer l'utilisation des traitements immunosupresseurs (de Rham and Villard, 2014; Sugita et al., 2016).

Pour conclure, bien que les premiers essais de thérapie cellulaire menés chez l'homme soient très prometteurs, il ne faut pas oublier que le traitement de quelques patients en essai clinique n'est qu'une étape vers la mise au point d'un traitement commercialisable et accessible au plus grand nombre. Ainsi l'adaptation du protocole de différenciation à grande échelle et la maîtrise des coûts liés à la production du greffon sont des éléments trop souvent négligés qui doivent être pris en compte dès le départ lorsqu'on se lance dans ce type de projet.

### 3. Problématiques liées à l'utilisation des CSPhs pour la modélisation pathologique

Comme nous l'avons vu avec la modélisation des atteintes de l'EPR associées à la mutation d'APC, l'utilisation des CSPhs peut permettre, dans une certaine mesure, de récapituler *in vitro* les symptômes d'une pathologie et d'étudier les mécanismes qui en sont responsables. Ce type de modèle se révèle particulièrement intéressant dans le cadre des maladies rétiniennes pour lesquelles très peu de lignées cellulaires humaines pertinentes sont disponibles. Toutefois, l'utilisation des CSPhs pour la modélisation pathologique présente encore de nombreuses limites qu'il faudra dépasser à l'avenir.

Tout d'abord, la variabilité observée entre des lignées de CSPhs provenant d'embryons ou de donneurs différents rend souvent difficile l'interprétation des résultats obtenus. Jusqu'à récemment, 2 stratégies principales étaient utilisées afin de s'assurer qu'un phénotype « pathologique » était bien causé par la mutation d'un gène d'intérêt et non pas par des différences de fond génétique. La première consistait à comparer un grand nombre de lignées saines et mutantes ce qui pouvait s'avérer couteux et fastidieux, sans compter qu'il n'est pas toujours possible d'avoir accès à plusieurs lignées d'hESCs mutantes. La seconde option consistait quant à elle à employer des ARNs interférents dans le but d'essayer de mimer l'effet d'une mutation dans des lignées saines ou à l'inverse d'utiliser des plasmides permettant de réexprimer le gène sauvage dans des lignées mutantes pour restaurer

leurs phénotypes. Cependant, il faut garder à l'esprit que les ARNs interférents n'ont en général pas une efficacité parfaite, que leur effet est temporaire et que leur utilisation ne permet pas de mimer le potentiel gain de fonction d'une protéine tronquée. De plus, puisque dans notre cas il nous était difficile de transfecter efficacement les cellules de l'EPR, l'utilisation de siRNA ou de plasmide pour confirmer que les phénotypes observés étaient bien dus à la mutation d'APC n'était pas envisageable. Heureusement, au cours des dernières années l'avènement de la technologie CRISPR/Cas9 a permis de résoudre en grande partie les problèmes de variabilités liées aux différences de fond génétique via la génération par mutagénèse dirigée de lignées de CSPhs isogéniques ayant pour seule différence la mutation d'un gène d'intérêt.

Lorsque j'ai débuté ma thèse en 2014, l'utilisation du système CRISPR/Cas9 sur les CSPhs en était à ses balbutiements et, comme nous l'avons vu, l'efficacité d'édition du génome bien que très supérieure à ce qui était obtenu auparavant avec les TALENs ou les méga-nucléases demeurait relativement faible dans ce type cellulaire. C'est pourquoi nous avons opté pour la stratégie la plus simple possible en comptant sur les erreurs induites par la jonction d'extrémités non-homologues lors de la réparation des cassures doubles brins de l'ADN pour générer une lignée de CSPhs isogéniques mutantes APC. Depuis, de multiples stratégies ont été employées afin d'améliorer l'efficacité de l'édition du génome des CSPhs. Ces stratégies diverses et variées vont de l'utilisation de Cas9 modifiées pour en augmenter l'efficacité et la spécificité jusqu'à l'utilisation de petites molécules permettant de diminuer l'activité du NHEJ pour favoriser la recombinaison homologue, en passant par l'amélioration des protocoles de transfection via l'utilisation, par exemple, de complexes ribonucléoprotéiques permettant d'apporter la Cas9 à la cellule directement sous forme protéique associée à l'ARNg de son choix (Zhang et al., 2017). Au-delà de la génération de contrôles isogéniques pour confirmer l'existence d'un phénotype pathologique, il est désormais possible de générer des lignées de CSPhs rapportrices de l'expression d'un gène, d'introduire plusieurs mutations dans une même lignée cellulaire, d'y introduire des mutations conditionnelles ou encore d'y introduire des transgènes dont l'expression est inductible. Ainsi, le perfectionnement de la technologie CRISPR/Cas9 a considérablement élargi le champ des possibilités concernant l'utilisation des CSPhs pour la modélisation pathologique.

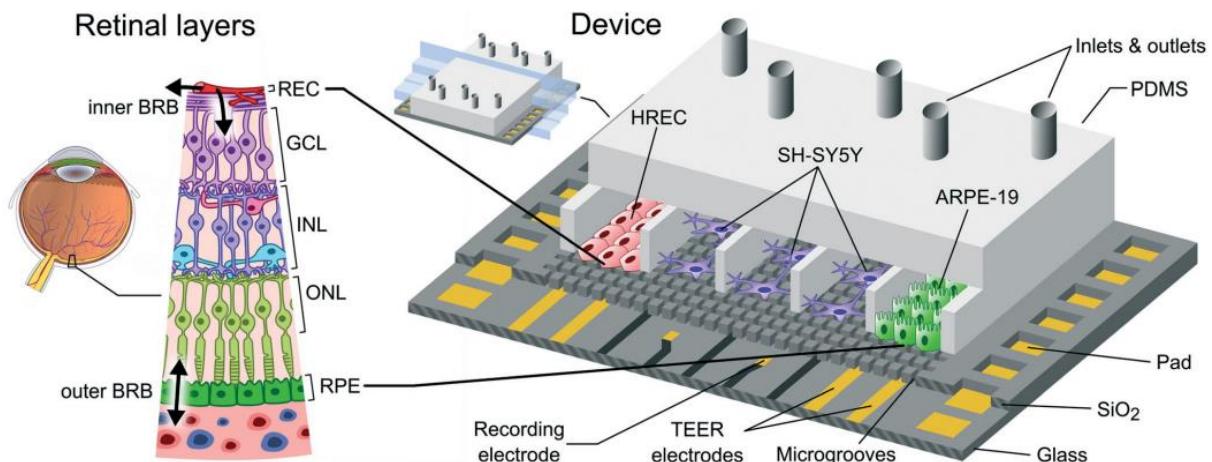
Une autre limite liée à l'utilisation des CSPhs pour la modélisation de certaines maladies provient du fait que les cellules différenciées à partir de ces dernières conservent généralement un phénotype fœtal, comme en témoigne les cellules de l'EPR qui synthétisent de la mélanine en continue ou le temps nécessaire à l'obtention de photorécepteurs exprimant des marqueurs matures tels que l'opsine. De ce fait, l'utilisation de ces cellules pour modéliser des pathologies se manifestant tardivement, telle que la DMLA, pose question. Afin de pouvoir modéliser efficacement

ce type de maladie il faudrait en réalité parvenir à induire la maturation des cellules dérivées de CSPhs d'une part et réussir à reproduire les effets du vieillissement sur ces dernières d'autre part (Cornacchia and Studer, 2017). Concernant l'obtention de cellules matures plusieurs approches sont envisageables. La culture prolongée par exemple est souvent suffisante pour induire l'expression de marqueurs de plus en plus matures mais cela peut prendre plusieurs mois et se révèle donc long et fastidieux. Afin d'accélérer ce processus il est bien évidemment possible d'essayer d'améliorer les protocoles de différenciation via l'ajout de cytokines ou de petites molécules visant à reproduire les étapes tardives du développement mais ces dernières sont généralement moins bien caractérisées que les étapes précoces car plus complexes. Enfin, puisqu'il a été observé à de nombreuses reprises que greffer des progéniteurs permettait d'induire leur maturation, il est également possible d'essayer de reproduire en culture l'environnement « normal » de ces cellules via la mise en place de système de coculture ou l'application de stress mécaniques pour les cellules qui y sont normalement soumises. La manière de reproduire en culture les effets du vieillissement demeure de son côté plus énigmatique. Certaines équipes ont tout de même tenté de l'induire via différentes stratégies comme le raccourcissement des télomères ou l'expression de la progérine, la protéine responsable de ce qui ressemble à un vieillissement accéléré chez les patients atteints de Progéria (Miller et al., 2013; Vera et al., 2016). Mais ces méthodes bien qu'induisant l'apparition de certains marqueurs associés au vieillissement restent très artificielles et ne permettent certainement pas de récapituler toutes les caractéristiques du vieillissement « naturel ».

Enfin, jusqu'à récemment les modèles pathologiques créés à partir de CSPhs demeuraient relativement simples et n'offraient la possibilité d'étudier l'effet d'une mutation que sur un seul type cellulaire à la fois. Or, dans de nombreux cas de rétinites pigmentaires par exemple, la mutation responsable de la pathologie affecte le fonctionnement des cellules de l'EPR ce qui entraîne de manière indirecte la dégénérescence des photorécepteurs et la perte de la vision. Par conséquent, il est impossible de récapituler pleinement ces pathologies *in vitro* en cultivant ces 2 types cellulaires séparément. De la même manière, le symptôme de néovascularisation de la choroïde observé dans la forme humide de la DMLA ne peut être reproduit *in vitro* sans reconstituer la barrière hémato-rétinienne dans son ensemble. Un premier pas vers la génération de modèles plus complexes a été réalisé au cours des dernières années avec la différenciation des CSPhs en organoïdes 3D, tels que les « optic cup », qui permettent d'étudier les interactions entre plusieurs types cellulaires en condition saines et pathologiques. Toutefois, ce type de modèle est compliqué à manipuler et permet difficilement, par exemple, d'introduire une mutation dans un seul type cellulaire afin d'observer l'effet indirect que cela a sur les autres et ainsi, faire la différence entre les mécanismes cellulaires autonomes et non autonomes. C'est pourquoi des approches d'ingénierie tissulaire ont récemment

été utilisées dans le but de créer des modèles qui représenteraient la diversité cellulaire d'un tissu, tout en restant facilement manipulables. Lors du congrès ARVO en 2017, l'équipe du Dr. Bharti a par exemple présenté un modèle de barrière hémato-rétinienne constituée de cellules endothéliales et de cellules de l'EPR dérivées de CSPhs séparées par un polymère, le tout généré par Bio-impression 3D. Les résultats préliminaires présentés ce jour-là tendaient à montrer que ce modèle permettait de reproduire la néovascularisation de la choroïde observée chez les patients atteint de la forme humide de la DMLA en utilisant des hiPSCs reprogrammées à partir de fibroblastes provenant de ces patients.

Les puces microfluidiques se révèlent également être un outil intéressant pour la reconstruction de tissu *in vitro* en permettant la communication de type cellulaires différents tout en compartimentant leur culture. Récemment, un modèle de barrière hémato-rétinienne a également été générée grâce à cette technologie (Figure 36) (Yeste et al., 2017). Les lignées cellulaires utilisées dans l'étude en question étaient rudimentaires mais le concept n'en demeure pas moins intéressant et l'on peut facilement imaginer les remplacer par des cellules dérivées de CSPhs afin de créer un modèle plus physiologique. L'avantage ici étant qu'il est possible par exemple, d'introduire des cellules mutées dans un seul compartiment cellulaire et d'observer l'effet « cellulaire non autonome » de cette mutation sur les autres cellules.



**Figure 36. Représentation schématique d'une puce microfluidique visant à reconstituer la barrière hémato-rétinienne. HREC (human retinal endothelial cells), SH-SY5Y (human neuroblastoma cell line), ARPE19 (human retinal pigment epithelial cell line) (Yeste et al., 2017).**

Ainsi, les avancées technologiques réalisées au cours des dernières années tels que le développement de la technologie CRISPR/Cas9, de la Bio-impression 3D ou encore des puces microfluidiques ouvrent de nouvelles perspectives dans le cadre de la modélisation pathologiques avec les CSPhs. Toutefois, rendre ces nouvelles technologies compatibles avec les techniques d'analyse à haut débit afin de pouvoir en tirer pleinement profit promet d'être un sacré challenge.

## II. Intérêt des CSPhs pour la modélisation des symptômes non rétiniens associées à la PAF

Au cours de ma thèse je me suis focalisé sur la modélisation des atteintes rétiniennes associées à la mutation d'APC afin de comprendre le rôle de cette protéine dans la régulation de la mélanogénèse et de la prolifération de ces cellules. Cependant, comme décrit dans l'introduction, la PAF est une maladie multi-systémique dont l'atteinte principale se situe au niveau du colon. Dès lors, il est naturel de se demander s'il est également faisable et pertinent d'utiliser les CSPhs mutantes APC pour modéliser ce symptôme.

Pour répondre à cette question, il faut tout d'abord se demander s'il est actuellement possible de différencier des CSPhs en cellules intestinales. En 2011, Spence et al. ont décrit un protocole permettant de générer de manière efficace à partir de CSPhs des organoïdes intestinaux comprenant tous les types cellulaires de l'épithélium intestinal dans des proportions similaires à ce qui est observé *in vivo* (Spence et al., 2011). Il apparaît donc tout à fait envisageable d'utiliser ce protocole pour différencier des CSPhs mutantes APC afin de rechercher un phénotype pathologique chez les organoïdes ainsi générés. Cela a même déjà été réalisé par Crespo et al. qui, dans une étude parue en 2017, ont utilisé une version légèrement modifiée du protocole de Spence et al. afin d'induire la différenciation d'hiPSCs reprogrammées à partir de fibroblastes de patients atteints de PAF en organoïdes coliques. Dans cette étude, les auteurs observent une augmentation de l'activité de la voie Wnt/β-caténine et une prolifération accrue de l'épithélium intestinal chez les organoïdes mutants APC. De plus, les auteurs y démontrent que l'utilisation de la Généticine permet de restaurer une prolifération normale chez les organoïdes mutants sans affecter celle des organoïdes sauvages (Crespo et al., 2017).

Ainsi, les organoïdes intestinaux différenciés à partir de CSPhs mutantes APC semblent être un modèle pertinent des atteintes intestinales de la PAF. Aux vues de l'implication de la mutation de ce gène dans plus de 80% des cancers colorectaux, on peut alors se demander pourquoi si peu d'études utilisant ce modèle sont parues depuis 2011 et la publication du protocole de Spence et al. Cela pose en réalité la question de l'utilité d'un tel modèle. Dans le cas des atteintes de l'EPR l'utilisation des CSPhs se justifiait par l'absence d'autres modèles cellulaires humains pertinent pour la modélisation de ce symptôme. En effet, les cellules de l'EPR adultes primaires étant extrêmement difficile à maintenir en culture au-delà de quelques passages, leur emploi dans la recherche est très limité. D'un autre côté, les lignées immortalisées de cellules de l'EPR telle que la lignée ARPE-19 ont une morphologie très différente des cellules *in vivo* et leur pigmentation est rarement observée en culture. Les cellules de l'EPR dérivées de CSPhs apparaissaient donc comme le meilleur modèle

humain pour étudier le rôle d'APC dans ce tissu. Dans le cas des atteintes intestinales en revanche, la situation est très différente. Tout d'abord, de multiples lignées cellulaires sont disponibles et ont déjà prouvé leur utilité pour l'étude des fonctions d'APC dans ce tissu. Mais surtout, il est possible de générer des organoïdes à partir de cryptes intestinales récoltées lors de biopsies qui ressemblent fortement à ceux obtenus par différenciation des CSPhs (Sato et al., 2009). On peut ainsi non seulement générer des organoïdes à partir de cryptes provenant de personnes saines et de patients atteints de PAF, mais on peut en plus en générer à partir de cryptes provenant d'adénome plus ou moins avancés pour étudier les différents stades de leur progression (Fujii et al., 2016). Récemment, ce type d'organoïde a même été utilisé en combinaison avec la technologie CRISPR/Cas9 afin de modéliser *in vitro* la progression du cancer colorectal en introduisant de manière successive des mutations dans les gènes *APC*, *K-RAS*, *SMAD4*, *P53* et *PIK3CA* (Matano et al., 2015). Par conséquent, bien que les organoïdes intestinaux dérivés de CSPhs soient un outil précieux dans d'autres domaines tels que l'étude du développement de l'intestin, ils ne représentent qu'un intérêt limité pour la modélisation de la PAF et du cancer colorectal. Leur unique avantage dans ce contexte réside dans la facilité d'accès des CSPhs par rapport aux cryptes intestinales humaines et dans la quantité d'organoïdes qu'il est possible de générer à partir de ces cellules, ce qui ne représente un réel atout que dans le cadre d'applications spécifiques nécessitant une quantité très importante de matériel biologique. Le criblage de composées pharmaceutiques à haut débit est l'une de ces applications mais, pour l'heure, la variabilité des structures 3D obtenues après différenciation ainsi que la nécessité d'inclure les organoïdes dans du matrigel rend difficile la miniaturisation de leur culture et l'identification de marqueurs biologiques quantifiables à haut débit. Toutefois, il est à noter que la miniaturisation de la différenciation et de la culture d'organoïdes rénaux a récemment été décrite et a permis la réalisation d'un criblage de molécules à petite échelle sur des organoïdes mutants (Czerniecki et al., 2018), démontrant ainsi la faisabilité de ce type d'approche. Il est donc très probable que la différenciation et la culture des organoïdes intestinaux dérivés de CSPhs soient très prochainement miniaturisées et automatisées à leur tour afin de permettre la réalisation de criblages à haut débit sur ce modèle.

De la même manière que pour les atteintes intestinales, il apparaît possible de modéliser les tumeurs desmoïdes associées à la PAF à l'aide des CSPhs. En effet, plusieurs études semblent démontrer que ces tumeurs dérivent de cellules souches mésenchymateuses (CSMs) (Wu et al., 2010). Or, la différenciation des CSPhs vers ce type cellulaire est relativement bien maîtrisée, même si l'équivalence entre les CSMs adultes et celles dérivées de CSPhs est toujours sujet à débat (West et al., 2016). Mais là encore, d'autres modèles cellulaires humains pertinents sont déjà disponibles ce qui remet en question la nécessité d'un modèle dérivé de CSPhs. En effet, il est possible d'établir des

lignées cellulaires primaires, amplifiables sur plusieurs passages, à partir de fibroblastes ou de CSMs récoltées sur des tumeurs desmoïdes (Carothers et al., 2012; Ghanbari-Azarnier et al., 2013). De plus, si l'on souhaite s'intéresser spécifiquement à l'impact de la mutation d'APC sur ce type cellulaire sans être biaisé par les mutations additionnelles dont sont probablement porteuses des cellules prélevées sur des tumeurs à un stade déjà avancé, il apparaît désormais relativement simple d'introduire une mutation sur ce gène chez des CSMs adultes saines grâce à la technologie CRISPR/Cas9. Par conséquent, le principal intérêt de l'utilisation des CSPhs pour la modélisation des tumeurs desmoïdes réside une nouvelle fois dans leur facilité d'accès et la quantité de matériel biologique qu'il est possible d'obtenir grâce à ces cellules. En effet, bien que les CSMs adultes puissent être amplifiées sur plusieurs passages, il a été démontré que contrairement au CSPhs elles étaient tout de même soumises à la sénescence réplicative qui se caractérise au-delà d'un certain nombre de passage par une diminution de la vitesse de prolifération, des changement morphologiques, la perte de l'expression de certains marqueurs et une diminution de la capacité de différenciation (Wagner et al., 2008). Par conséquent, les fibroblastes et même les CSMs récoltées sur des patients ne représentent pas une ressource biologique intarissable et l'utilisation de CSMs dérivées de CSPhs peut permettre la réalisation de projets nécessitant une quantité très importante de cellules.

En conclusion, avant de s'orienter vers l'utilisation des CSPhs pour modéliser une pathologie il est important de se demander s'il n'existe pas un autre modèle cellulaire plus avantageux pour l'application que l'on envisage. Les CSPhs sont un outil puissant offrant la possibilité d'avoir accès à une quantité quasi-illimitée de matériel biologique et cela même pour des tissus habituellement difficiles d'accès chez l'homme comme la rétine. Toutefois, il ne faut pas oublier que leur utilisation comporte également un certain nombre d'inconvénients tels que le temps de culture nécessaire à la différenciation vers le type cellulaire d'intérêt, les variations observées d'une différenciation à l'autre qui peuvent compliquer la réplication des résultats ou encore la conservation de caractéristiques fœtales par les cellules différencierées. Ainsi, leur utilisation dans le cadre de la modélisation pathologique ne doit pas devenir systématique et doit se faire de manière complémentaire avec celle des modèles animaux et cellulaires déjà disponibles.

## CONCLUSION

Les objectifs de ma thèse étaient : (1) la mise au point d'un protocole de différenciation des CSPhs en cellules de l'EPR suffisamment efficace pour permettre d'automatiser la production de ces cellules et (2) l'utilisation de ce protocole pour la différenciation des hESCs mutantes APC afin de modéliser les atteintes rétiennes associées à la PAF.

En permettant d'envisager la production des cellules de l'EPR à grande échelle, le protocole de différenciation automatisé décrit dans la première partie de cette thèse représente un pas en avant vers la mise au point d'un traitement accessible au plus grand nombre contre la DMLA et certaines rétinites pigmentaires. Toutefois, quelques ajustements demeurent nécessaires avant de pouvoir envisager son utilisation en clinique, tel que le remplacement du Matrigel par une matrice xéno-free. De plus, son efficacité pour la différenciation des hiPSCs reste à démontrer. En effet, pour l'heure, seules des hESCs ont été différencierées avec cette méthode, or puisque plusieurs protocoles préalablement publiés présentent une efficacité de différenciation plus faible à partir d'hiPSCs, il est possible qu'il en soit de même avec le nôtre. C'est pourquoi il faudra rapidement vérifier que l'efficacité de notre protocole demeure suffisante lors de la différenciation de cellules reprogrammées pour permettre l'automatisation du procédé.

D'autre part, la différenciation des hESCs mutantes APC en cellules de l'EPR réalisée dans la seconde partie de cette étude a permis de mettre en évidence, dans un contexte humain, le rôle de cette protéine dans la régulation de la pigmentation et de la prolifération de ces cellules. Ainsi, l'identification des mécanismes responsables de l'hyperpigmentation des cellules mutantes APC devrait permettre de mieux comprendre la régulation de la mélanogénèse chez les cellules de l'EPR, un phénomène jusque-là principalement étudié dans les mélanocytes. D'un autre côté, comprendre les mécanismes responsables de l'arrêt de la division des cellules mutantes APC pourrait permettre d'identifier des voies de signalisation à cibler dans le but de moduler la prolifération des cellules de l'EPR, ce qui représente un réel intérêt dans le cadre de certaines rétinopathies impliquant une atrophie ou une prolifération anormale de ces cellules.

D'un point de vue personnel, les difficultés rencontrées au cours de ma thèse m'ont permis de me rendre compte de certaines problématiques inhérentes à l'utilisation des CSPhs. Notre incapacité à obtenir des cellules de l'EPR avec certains protocoles préalablement publiés souligne par exemple qu'il est extrêmement difficile de mettre au point des méthodes de différenciation reproductibles. L'efficacité d'un protocole de différenciation peut en effet varier d'une lignée cellulaire à une autre mais également d'un laboratoire à un autre pour une même lignée sans que les

raisons en soient clairement établies. Dans le cadre de la modélisation pathologique, vient s'ajouter à cela le fait que la mutation d'intérêt peut interférer dans le processus de différenciation comme ce fut le cas pour nous avec la mutation d'APC. Bien que l'optimisation du protocole de différenciation nous ait permis d'obtenir des cellules mutantes en quantité suffisante pour mener l'étude, l'efficacité de la différenciation de ces cellules est toujours restée très inférieure à celle des cellules sauvages et ce, même pour la lignée mutante générée par ingénierie génétique à partir d'une lignée saine. La mise au point d'un protocole de différenciation spécifique à ces cellules avec, par exemple, l'utilisation d'inhibiteurs de la voie Wnt aurait peut-être pu permettre de compenser cette différence. Toutefois, puisqu'il n'est possible de comparer des cellules mutantes et sauvages que si ces dernières sont cultivées dans les mêmes conditions, il aurait fallu que ce protocole convienne également à ces dernières. De plus, il paraît difficilement concevable de mettre au point un nouveau protocole de différenciation à chaque fois que ce type de problème se présente.

Ainsi, je me suis aperçu durant ma thèse qu'il était important d'optimiser les protocoles de différenciation existant et cela même pour des types cellulaires tel que l'EPR dont la différenciation est considérée comme maîtrisée. Par conséquent, si j'en ai la possibilité, je souhaiterai à l'avenir étudier le développement oculaire afin de participer à l'amélioration des protocoles de différenciation des CSPhs vers les différents types cellulaires de la rétine, voir vers des types cellulaires appartenant à d'autres structures de l'œil.

# ANNEXES

## Annexe 1 : Human ESC-derived retinal epithelial cell sheets potentiate rescue of photoreceptor cell loss in rats with retinal degeneration

SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE | RESEARCH ARTICLE

### RETINAL DISEASES

## Human ESC-derived retinal epithelial cell sheets potentiate rescue of photoreceptor cell loss in rats with retinal degeneration

Karim Ben M'Barek,<sup>1,2,3</sup> Walter Habeler,<sup>1,2,3</sup> Alexandra Plancheron,<sup>1,2,3</sup> Mohamed Jarraya,<sup>4</sup> Florian Regent,<sup>1,2</sup> Angélique Terray,<sup>5</sup> Ying Yang,<sup>5,6</sup> Laure Chatrousse,<sup>1,2,3</sup> Sophie Domingues,<sup>1,2,3</sup> Yolande Masson,<sup>1,2,3</sup> José-Alain Sahel,<sup>5,6,7,8</sup> Marc Peschanski,<sup>1,2,3</sup> Olivier Goureau,<sup>5,\*†</sup> Christelle Monville<sup>1,2,‡</sup>

Copyright © 2017  
The Authors, some  
rights reserved;  
exclusive licensee  
American Association  
for the Advancement  
of Science. No claim  
to original U.S.  
Government Works

Replacing defective retinal pigment epithelial (RPE) cells with those derived from human embryonic stem cells (hESCs) or human-induced pluripotent stem cells (hiPSCs) is a potential strategy for treating retinal degenerative diseases. Early clinical trials have demonstrated that hESC-derived or hiPSC-derived RPE cells can be delivered safely as a suspension to the human eye. The next step is transplantation of hESC/hiPSC-derived RPE cells as cell sheets that are more physiological. We have developed a tissue-engineered product consisting of hESC-derived RPE cells grown as sheets on human amniotic membrane as a biocompatible substrate. We established a surgical approach to engraft this tissue-engineered product into the subretinal space of the eyes of rats with photoreceptor cell loss. We show that transplantation of the hESC-RPE cell sheets grown on a human amniotic membrane scaffold resulted in rescue of photoreceptor cell death and improved visual acuity in rats with retinal degeneration compared to hESC-RPE cells injected as a cell suspension. These results suggest that tissue-engineered hESC-RPE cell sheets produced under good manufacturing practice conditions may be a useful approach for treating diseases of retinal degeneration.

### INTRODUCTION

Human pluripotent stem cells including human embryonic stem cells (hESCs) and human-induced pluripotent stem cells (hiPSCs) are promising cell sources for regenerative medicine. The rationale for their use involves their differentiation into the cell type of interest that has been damaged or injured, and several clinical trials are underway (1, 2). Retinal pigment epithelial (RPE) cells derived from hESCs or hiPSCs are transplanted as a cell suspension rather than as a more physiologically relevant three-dimensional (3D) cell sheet. After the safety results are obtained from the first clinical trials for treating retinal dystrophies (1, 2), the next challenge will be to transplant hESC/hiPSC-derived RPE cell sheets into the subretinal space with the goal of providing longer-term survival and function of transplanted RPE cells (3, 4).

RPE cells form a specialized epithelial cell layer in the retina that is critical for photoreceptor cell homeostasis and survival (5). Several diseases lead to loss of RPE cells with major consequences for vision. Retinitis pigmentosa is a clinically and genetically heterogeneous group of inherited retinal dystrophies. Multiple gene mutations have been shown to cause retinitis pigmentosa and each mutation induces a specific phenotype affecting either the RPE cells or photoreceptor cells or both (6, 7). Age-related macular degeneration is a pathological

condition leading to the degeneration of RPE cells with a complex etiology comprising both genetic and environmental factors (8–10). Age-related macular degeneration is one of the leading causes of blindness and an increasing global burden with 196 million patients projected to suffer from this disease worldwide by 2020 (11).

Currently, there is a crucial lack of specific treatments for these diseases and limited therapeutic options (8, 12). Cell replacement therapy has been proposed as a strategy to replace dead or damaged retinal cells with cells derived from different sources including mesenchymal stem cells, peripheral or fetal RPE cells, or hESCs/hiPSCs (13–21). hESCs and hiPSCs have the capability to self-renew and could be used as an unlimited source of retinal cells for treating retinal dystrophies (16, 19). Recent results have indicated that hESCs/hiPSCs can be differentiated into RPE cells spontaneously after removal of fibroblast growth factor 2 (FGF-2) or by using methods for obtaining nonadherent cells (22–25).

Although injection of an RPE cell suspension into the human eye is relatively easy and has been accomplished in current clinical trials, it is not clear whether cells in suspension engraft efficiently into the retina or how long they survive (1, 2, 26, 27). New systems to deliver RPE cells as a preformed epithelial sheet are under development. This approach requires selection of a substrate on which RPE cells will organize and that will be part of the transplanted material. Different types of substrates have been proposed, including collagen or synthetic biomaterials (20, 27, 28). Another approach is to transplant hESC/hiPSC-derived RPE cell sheets without any supporting artificial substrate (29, 30). Although previous RPE cell sheet approaches improved graft survival after transplantation into athymic nude rats (27), the functional benefit compared to injection of an RPE cell suspension has not been demonstrated. A direct comparison of RPE cell suspensions versus RPE cell sheets without substrate reported similar restoration of vision in a rat model of retinitis pigmentosa (29).

<sup>1</sup>INSERM U861, I-Stem, Association Française contre les Myopathies (AFM), Institute for Stem Cell Therapy and Exploration of Monogenic Diseases, 91100 Corbeil-Essonnes, France. <sup>2</sup>UEVE U861, I-Stem, AFM, Institute for Stem Cell Therapy and Exploration of Monogenic Diseases, 91100 Corbeil-Essonnes, France. <sup>3</sup>CECS, I-Stem, AFM, Institute for Stem Cell Therapy and Exploration of Monogenic Diseases, 91100 Corbeil-Essonnes, France. <sup>4</sup>Banque de tissus humain, Hôpital Saint Louis, AP-HP Paris, France. <sup>5</sup>Institut de la Vision, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, INSERM, CNRS, 75012 Paris, France. <sup>6</sup>CHNO des Quinze-Vingts, DHU Sight Restore, INSERM-DHOS CIC, 75012 Paris, France. <sup>7</sup>Fondation Ophtalmologique Adolphe de Rothschild, 75019 Paris, France. <sup>8</sup>Department of Ophthalmology, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, PA 15213, USA.

\*Corresponding author. Email: cmontville@istem.fr (C.M.); olivier.goureau@inserm.fr (O.G.)

†These authors contributed equally to this work.

Here, we used a human amniotic membrane (hAM) as a substrate for RPE cells derived from hESCs. Compared to synthetic biomaterials, hAM presents advantages for RPE cells as it has a basement membrane and therefore provides the RPE cells with an environment that mimics the *in vivo* retinal environment. In addition, hAM is permeable to nutrients, and its use in ophthalmology for treating corneal ulceration has demonstrated its low immunogenicity and its anti-inflammatory and antimicrobial properties (31–34). There is a well-developed supply chain for hAM from donor patients, as well as good manufacturing practice (GMP) manufacturing sites that include cryopreservation and quality control processes (31). Thus, hAM is an attractive alternative to synthetic biomaterials as a scaffold for the formation of RPE cell sheets. We have developed a tissue-engineered product composed of hESC-derived RPE cells cultured on a hAM substrate. We transplanted this product into the subretinal space of rats with photoreceptor cell degeneration. Using behavioral, electrophysiological, and histological tools, we compared functional outcomes with those of hESC-derived RPE cells injected as a single-cell suspension.

## RESULTS

### Generation of a clinical-grade feeder-free hESC line and its differentiation into RPE cells

A clinical-grade hESC line RC-9 was grown on U.S. Food and Drug Administration-approved human feeder cell layers according to GMP until passage 10 and then was grown under feeder-free culture conditions (35). At passage 25, the RC-9 hESCs were frozen and banked. Throughout the culture process and after final banking, this hESC line was extensively characterized, ensuring quality control and freedom from viruses and bacteria according to international guidelines (fig. S1 and table S1) (36).

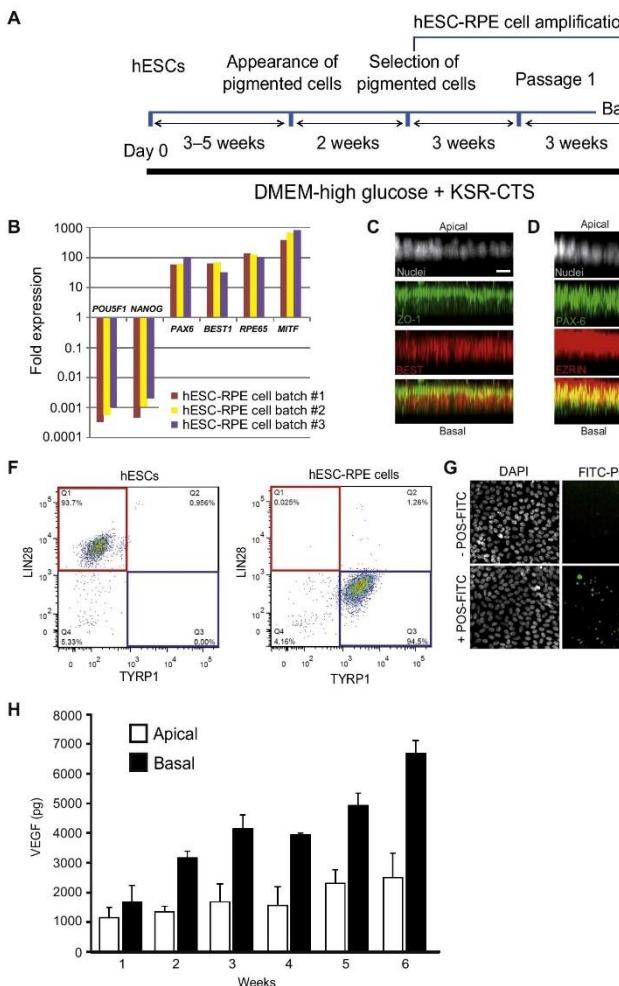
RPE cells were obtained by spontaneous differentiation of confluent hESC cultures (Fig. 1A) (25). Briefly, hESCs were grown to confluence, after which FGF-2 was removed from the culture medium. Pigmented patches that appeared were mechanically harvested and replated (fig. S2). Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction from three representative batches of homogeneous hESC-RPE monolayers at passage 1 demonstrated mRNA expression of typical RPE markers, such as RPE-specific 65-kDa protein (*RPE65*), paired box 6 (*PAX6*), bestrophin 1 (*BEST1*), and microphthalmia-associated transcription factor (*MITF*) relative to undifferentiated cells. As expected, mRNA expression of two pluripotency markers POU class 5 homeobox 1 (*POU5F1*) and nanog (*NANOG*) has stopped (Fig. 1B). In addition, hESC-RPE cells exhibited a classical RPE cobblestone shape and showed polarized localization of proteins. Zonula occludens-1 (ZO-1; a tight junction-associated protein), EZRIN (a protein localized in RPE microvilli), and the proto-oncogene tyrosine-protein kinase MER (MERTK; involved in RPE cell phagocytosis) were found at the apical membrane, and BEST1 (a calcium-activated chloride-ion channel) was found at the basolateral membrane (Fig. 1, C to E, and fig. S3, B to D). The purity of hESC-RPE cells was quantified by counting the percentage of cells expressing *PAX-6* and *MITF*, two markers used as an index of RPE identity (5, 29). *PAX-6* and *MITF* were detected in  $97.9 \pm 0.7\%$  and  $97.6 \pm 0.7\%$  of hESC-RPE cells, respectively, and the markers were co-expressed in  $96.5 \pm 0.5\%$  of hESC-RPE cells (figs. S3A and S4). We also combined this evaluation with fluorescence-activated cell sorting (FACS) and showed that  $99.3 \pm 0.2\%$  of cells expressed cytokeratin (fig. S5), another RPE cell epithelial marker (37–39). FACS analysis of hESC-RPE cells stained for the pluripotency markers LIN28

(an RNA-binding protein that regulates stem cell renewal) and TRA1-81 (Translin-like protein; a protein lost upon differentiation) showed that the number of residual pluripotent stem cells capable of forming teratomas *in vivo* was lower than the detection limit. Compared to predifferentiation stage hESCs, hESC-RPE cells at passage 1 after differentiation showed increased number of cells expressing the melanogenesis marker tyrosinase-related protein 1 (TYRP1) (hESCs, 0.0%; hESC-RPE cells, 94.5%) and a decrease in the number of cells expressing the pluripotency marker LIN28 (hESCs, 93.7%; hESC-RPE cells, 0.025%) (Fig. 1F). We then accurately quantified the presence of residual undifferentiated hESCs in the final hESC-RPE cell population by evaluating the lower limit of detection. We identified a detection threshold of 0.05% for hESC contamination of hESC-RPE cells by mixing ARPE-19 cells, a human RPE cell line, with decreasing concentrations of hESCs from 50 to 0.05% (fig. S6, A and B). No hESCs were detected in hESC-RPE cell populations in any of the batches tested (fig. S6C). Together, our data indicated that our culture process had yielded a pure hESC-derived RPE cell population.

A crucial function of native RPE cells is their ability to phagocytose the shed outer segments of photoreceptor cells (5, 40). We demonstrated that hESC-RPE cells were able to phagocytose pig fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled photoreceptor cell outer segments (Fig. 1G). Using a permeable support to provide independent access to both sides of a hESC-RPE cell layer, we also showed that, similar to native RPE cells, hESC-RPE cells secreted vascular endothelial growth factor (VEGF) preferentially at the basal membrane (Fig. 1H). The hESC-RPE cells obtained with our protocol were banked using GMP-compliant cryopreservation media.

### Characterization of tissue-engineered hESC-RPE cell sheets

To obtain hESC-RPE cell sheets for transplantation, we used a clinical-grade decellularized hAM as a biological scaffold. This hAM contained a basement membrane, which mimicked Bruch's membrane, and could support growth of RPE cell primary cultures (41, 42). RPE cells derived from hESCs using our GMP-compliant protocol were seeded onto the basement membrane side of the decellularized hAM. After 4 weeks in culture, pigmented epithelial cells that expressed classical RPE markers, such as TYRP1 and MITF, appeared (Fig. 2, A to C). The apical location of ZO-1 demonstrated that the hESC-RPE cell sheets formed tight junctions (fig. S7, A and B). The localization of EZRIN at the apical side indicated the presence of microvilli (fig. S7, C to E) (43, 44). Expression of the basolateral marker BEST1 indicated that ion channels had formed in the correct location (fig. S7, F and G). The expression and polarization of RPE cell markers in hESC-RPE cell sheets were similar to those for hESC-RPE cells cultured on coated culture dishes (Fig. 1 and fig. S3). We also demonstrated the ability of hESC-RPE cell sheets grown on a hAM scaffold to secrete VEGF (fig. S7H). Ultrastructural studies using transmission and scanning electron microscopy confirmed that hESC-RPE cell sheets cultured on a hAM scaffold showed the correct location on the apical side of microvilli, cilia, tight junctions, and melanosomes; the cell nucleus was located on the basal side of the hESC-RPE cell sheet (Fig. 2, D and E, and fig. S8). Finally, hESC-RPE cell sheets grown on the hAM scaffold were able to phagocytose photoreceptor cell outer segments in the same way as hESC-RPE cells cultured on coated culture dishes (fig. S9, A to D; movie S1; and Fig. 1G). Together, these results showed that the hAM scaffold enabled hESC-RPE cells to form well-organized epithelial sheets that showed the correct localization of key RPE proteins.



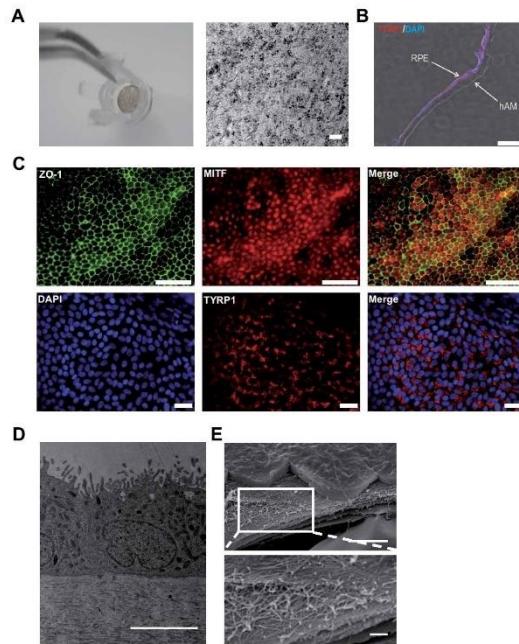
**Fig. 1. Characterization of hESC-RPE cells.** (A) Timeline of the differentiation protocol for generating retinal pigment epithelial (RPE) cells from human embryonic stem cells (hESCs). (B) Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction analysis was performed to measure mRNA expression of RPE markers [paired box 6 (PAX6), retinal pigment epithelium-specific 65-kDa protein (RPE65), bestrophin 1 (BEST1), and microphthalmia-associated transcription factor (MITF)] and pluripotency markers [POU class 5 homeobox 1 (POU5F1) and nanog (NANOG)] in three hESC-RPE cell differentiation batches at passage 1. Expression is presented relative to expression in undifferentiated hESCs. (C to E) Confocal images (maximal projections of zx planes) of hESC-RPE cells after immunostaining for the markers ZO-1 (zonula occludens-1) and BEST1 (C), PAX-6 and EZRIN (D), and MERTK and BEST1 (E). Nuclei were counterstained with DRAQ5 (white). Scale bars, 10  $\mu$ m. (F) Evaluation by flow cytometry of the number of tyrosinase-related protein 1 (TYRP1)-positive and LIN28-positive cells before hESCs and after differentiation into RPE cells (hESC-RPE cells). Four hESC-RPE cell batches were tested in total. (G) Representative images of hESC-RPE cells after 3 hours of exposure or no exposure to fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled pig photoreceptor cell outer segment (FITC-POS; green). Nuclei were counterstained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (white). Scale bars, 10  $\mu$ m. (H) Quantification of vascular endothelial growth factor (VEGF) secreted by hESC-RPE cells at different time points during culture using an enzyme-linked immunosorbent assay. Values plotted are means  $\pm$  SD.

### Development of a surgical method for transplanting hESC-RPE cell sheets into the subretinal space of the rat eye

Introducing a tissue-engineered hESC-RPE cell sheet into the subretinal space of the rat eye without damaging the recipient retina or the tissue-engineered product is technically challenging. We developed a grafting strategy to transplant the tissue-engineered product through a transscleral route while maintaining the polarity of the hESC-RPE cell sheet such that the RPE cells were in contact with the retina (Fig. 3A). We embedded the hESC-RPE cell sheet on a hAM scaffold into a GMP-compliant gelatin carrier to reduce friction between hESC-RPE cells and the injector. The gelatin was rigid at 4°C and liquefied at body temperature and, therefore, was suitable as a carrier for transplantation of the hESC-RPE cell sheet into the subretinal space of the rat eye (45). We then introduced a small piece of the tissue-engineered product (2 to 3 mm<sup>2</sup> containing up to 5  $\times$  10<sup>4</sup> hESC-RPE cells; Fig. 3B) into the head of an injection cannula (Fig. 3, B and C). The cannula could be opened to carefully position the tissue-engineered product into the subretinal space; when the cannula was closed, the tissue-engineered product rolled up. The transparency of the device enabled accurate positioning of the hESC-RPE cell sheet ready for injection (Fig. 3C and movie S2). A terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labeling assay to detect DNA fragmentation during apoptosis was performed on the hESC-RPE cell sheet after extrusion from the injection device; the assay revealed no increase in hESC-RPE cell death compared to the tissue-engineered product before extrusion (fig. S10), validating the safety of the injection device for the delivery of the tissue-engineered product. Finally, optical coherence tomography (OCT) imaging after injection into the subretinal space of rat eyes *in vivo* revealed that the hESC-RPE cell sheet was correctly localized after the surgical procedure (Fig. 3D).

### hESC-RPE cell sheets express MERTK *in vivo*

We grafted athymic nude rats with either a hESC-RPE cell suspension or the



**Fig. 2. In vitro assessment of hESC-RPE cell sheets.** (A) Macroscopic photographic images of a hESC-RPE cell sheet after 6 weeks in culture. The right-hand image shows the hESC-RPE cells on the human amniotic membrane (hAM) scaffold. Scale bar, 50  $\mu$ m. (B) Section of the hESC-RPE cell sheet illustrating the monolayer organization of hESC-RPE cells. Cells were stained for TYRP1 expression (red) and counter-stained with DAPI (blue). The hAM scaffold is indicated. Scale bar, 50  $\mu$ m. (C) hESC-RPE cells cultured on the hAM scaffold and stained for specific RPE markers. Top: ZO-1, green; MITF, red. Bottom: DAPI, blue; TYRP1, red. Scale bars, 50  $\mu$ m. (D) Transmission electron microscopy image of the hESC-RPE cell sheet. Scale bar, 5  $\mu$ m. (E) Scanning electron microscopy images of the hESC-RPE cell sheet showing hESC-RPE cells on the hAM scaffold at different magnifications. The bottom image (a magnification of the area indicated by the rectangle in the top image) shows the basement membrane and extracellular matrix fibers of the hAM scaffold. Scale bars, 5  $\mu$ m (top) and 1  $\mu$ m (bottom). Three different hESC-RPE cell batches were tested.

tissue-engineered hESC-RPE cell sheet and investigated the expression of RPE proteins in transplanted RPE cells 10 days after surgery. We found that grafted hESC-RPE cells, identified by specific staining for human cytochrome c oxidase subunit II (MTCO2), expressed ZO-1 both in the cell suspension and in the epithelial sheet (Fig. 3, E and F). Whereas most of the hESC-RPE cells in the epithelial sheet expressed human MERTK, no cells positive for human MERTK were detected in the hESC-RPE cell suspension (Fig. 3, F and G, and movie S3). Specific staining for human collagen IV indicated the hAM basement membrane in the transplanted tissue-engineered product (Fig. 3G).

#### Transplantation of hESC-RPE cell sheets improves visual acuity in RCS rats with retinal degeneration

The functionality of the tissue-engineered hESC-RPE cell sheet was then tested in the Royal College of Surgeons (RCS) rat, a rodent model of inherited retinal degeneration. These animals are characterized by

defective phagocytosis by the RPE layer due to a mutation in the *Merik* gene (46), which is also mutated in some forms of autosomal recessive retinitis pigmentosa (47). This defect results in an accumulation of photoreceptor cell outer segments in the subretinal space leading to degeneration of photoreceptor cells beginning at 3 weeks of age, with an almost complete loss of the outer nuclear layer at 6 weeks of age. Four-week-old RCS rats were transplanted in one eye with the tissue-engineered product in its final formulation (gelatin embedded) or with the same batch of hESC-RPE cells as a suspension or with an empty gelatin block (sham). The contralateral eye did not receive any transplant and served as a retinal dystrophic control. To evaluate basic visual performance after surgery, we took advantage of the optokinetic head movement reflex of rats in response to a visual stimulus. This optokinetic test allowed evaluation of the visual acuity of the transplanted rats by reducing the width of the moving stripes in the rat's visual field (Fig. 4A). Whereas the visual acuity of untreated and sham-treated eyes of the dystrophic rats was markedly reduced compared to wild-type animals, we observed that the eyes of dystrophic rats transplanted with hESC-RPE cells as either a suspension or a sheet did not show any further reduction in visual acuity for up to 3 months after transplant (Fig. 4B). At 13 weeks after transplant, visual acuity in dystrophic rat eyes transplanted with the hESC-RPE cell sheet ( $0.514 \pm 0.031$  cycles/deg) was significantly preserved compared to sham-operated eyes ( $0.268 \pm 0.043$  cycles/deg; \*\*\* $P < 0.0001$ ) and to dystrophic control eyes ( $0.117 \pm 0.016$  cycles/deg; \*\*\* $P < 0.0001$ ) (Fig. 4B).

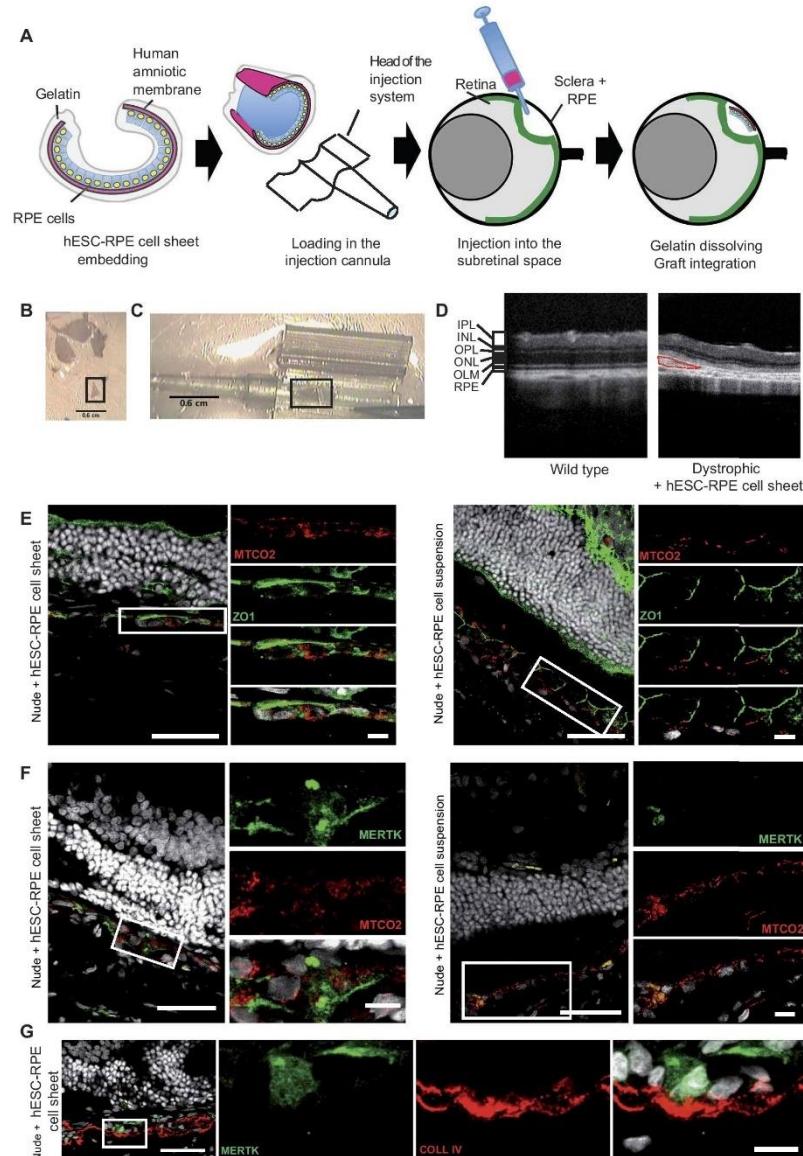
#### Transplantation of hESC-RPE cell sheets improves retinal electrophysiology in the RCS rat retina

Analysis of full-field electroretinograms 5 weeks after surgery showed that transplanted groups responded to increasing light intensity as measured by the b-wave amplitude (Fig. 4C). Calculation of the area under the curve confirmed that transplantation of hESC-RPE cells improved the response of the dystrophic retina to increasing light intensity [analysis of variance (ANOVA)  $F_{3,49} = 59.78$ , \*\*\* $P \leq 0.0001$ ] (Fig. 4D). By 9 weeks after surgery, dystrophic retinas transplanted with the tissue-engineered hESC-RPE cell sheets responded to increasing light intensities with greater sensitivity than did the hESC-RPE cell suspension transplantation group (Fig. 4, E and F). At a light intensity of  $-0.7 \log \text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ , mean b-wave responses of dystrophic rat retinas transplanted with the tissue-engineered product ( $198.86 \pm 11.12 \mu\text{V}$ ) were double the intensity of dystrophic retinas transplanted with the hESC-RPE cell suspension ( $95.78 \pm 22.56 \mu\text{V}$ ; \*\*\* $P < 0.0001$ ). At 12 weeks after transplant, the b-wave amplitude was decreased in all transplanted groups; however, the response to light stimulation was greater in dystrophic retinas transplanted with the tissue-engineered hESC-RPE cell sheet compared to dystrophic retinas transplanted with the hESC-RPE cell suspension or gelatin alone (sham) (Fig. 4, G and H).

To determine the specific impact of the hAM scaffold, we also transplanted RCS rats with the hAM scaffold embedded in gelatin but without any hESC-RPE cells. A transitory improvement was observed in the electroretinogram and the optokinetic test 5 weeks after surgery (fig. S11, A and B). The mean b-wave observed at 9 weeks after surgery was improved by 41% in the tissue-engineered product transplant group compared to the group transplanted with hAM in gelatin alone (flashing light intensity of  $-0.7 \log \text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ ; \*\* $P < 0.01$ ; fig. S11, C and D). This effect remained for up to 12 weeks after surgery (improvement of 32% in the tissue-engineered product transplant group compared to the hAM-in-gelatin only group and the gelatin-only sham group; \* $P < 0.05$ ; fig. S11E).

**Fig. 3. hESC-RPE cell sheet transplantation and validation of the surgical method.**

**(A)** Steps for the preparation and loading of the hESC-RPE cell sheet on the hAM scaffold into the injection device. **(B)** Image of the hESC-RPE cell sheet embedded in gelatin. A small piece (2 to 3 mm<sup>2</sup>) was cut for injection into the subretinal space of the rat eye (black rectangle). **(C)** Image showing loading of the hESC-RPE cell sheet (black rectangle) into the head of the injection device. **(D)** OCT analysis of the retina of a wild-type control rat and a dystrophic RCS rat after transplantation of the hESC-RPE cell sheet (red line, dystrophic + graft). **(E to G)** Representative immunofluorescence confocal microscopic images of sections of retina from athymic nude rats 10 days after transplantation with either a hESC-RPE cell sheet (left) or a hESC-RPE cell suspension (right). Sections were stained for human MTCO2 and human ZO-1 (E), human MERTK and human MTCO2 (F), or human MERTK and human collagen IV (G). Nuclei were visualized with a DAPI counterstain. Three rat retinas transplanted with hESC-RPE cell suspensions and four rat retinas transplanted with hESC-RPE cell sheets were analyzed. White box indicates regions that are enlarged. Images correspond to maximal projections of z stacks. Scale bars, 50 μm and 10 μm (higher magnification). IPL, inner plexiform layer; INL, inner nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; ONL, outer nuclear layer; OLM, outer limiting membrane.



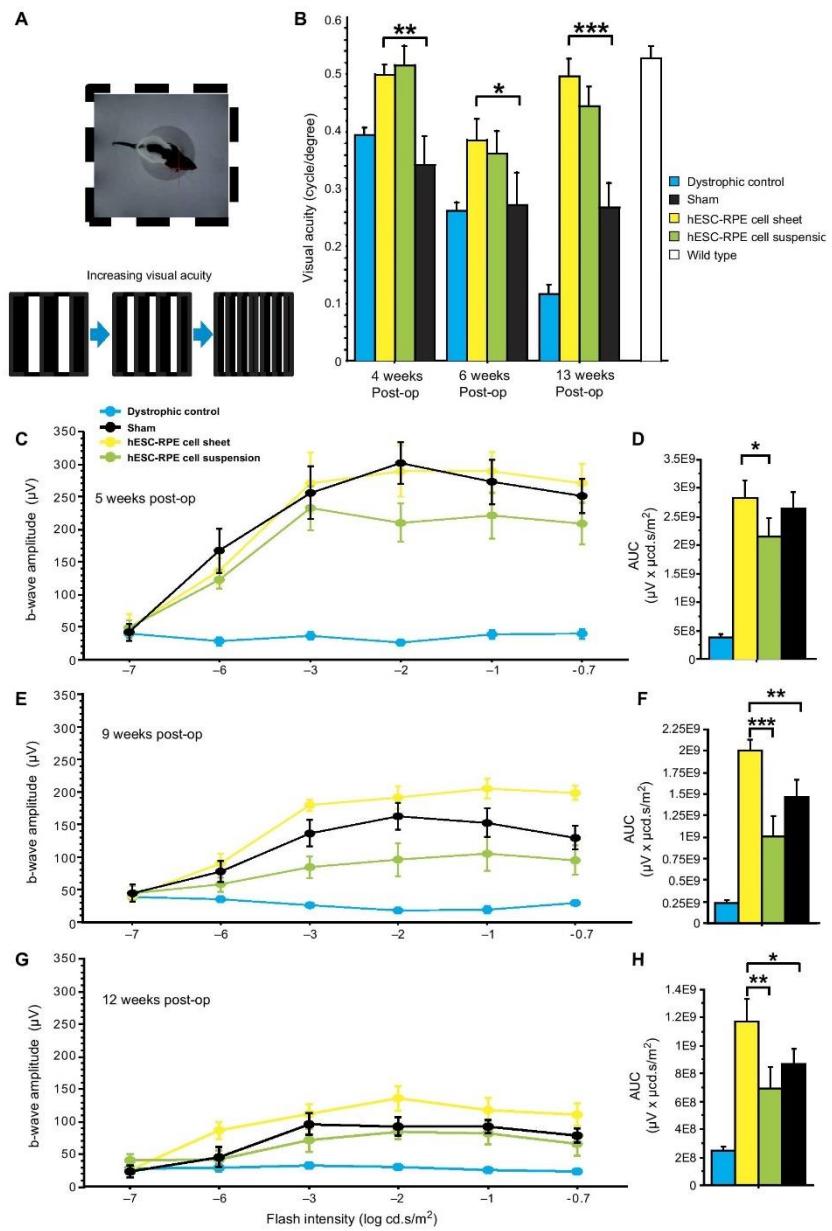
Downloaded from <http://stm.scienmag.org/> by guest on December 20, 2017

#### Transplantation of hESC-RPE cell sheets improves photoreceptor cell survival in the RCS rat retina

The improvements in visual acuity after hESC-RPE cell sheet transplantation suggested that either photoreceptor cell survival or function was improved. Three months after transplantation, OCT imaging

was used to scan the temporodorsal quadrant near the optic nerve of transplanted animals at an advanced stage of retinal degeneration. The heat maps reflecting outer nuclear layer thickness in the OCT scan revealed that hESC-RPE cell sheet transplantation resulted in preservation of a larger area of retinal outer nuclear layer compared

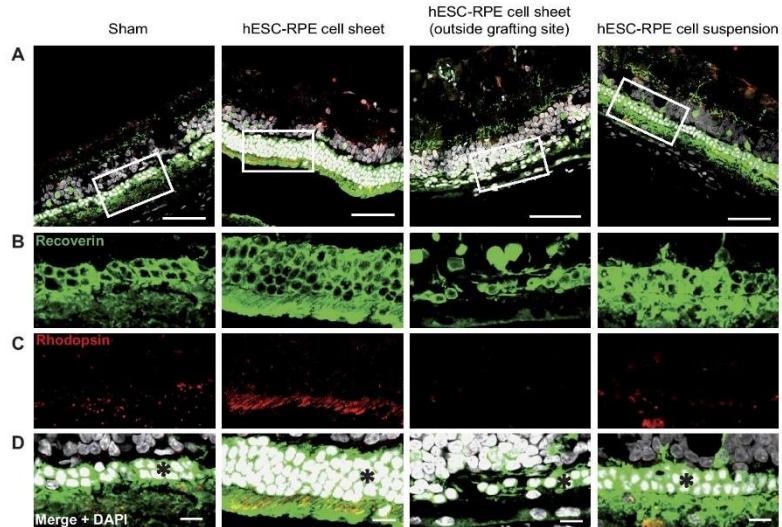
**Fig. 4. Improved visual recovery after hESC-RPE cell sheet transplantation into RCS rats.** (A) Visual representation of the optokinetic test. Animals were placed on an elevated platform and exposed to a rotating stimulus (on four screens) consisting of vertical black and white lines of varying widths. (B) Bar graphs showing the quantification of visual acuity using the optokinetic test in RCS rats at different time points after transplantation (4, 6, and 13 weeks). (C to H) Electoretinogram responses were recorded at 5, 9, and 12 weeks after surgery in RCS rats transplanted with hESC-RPE cell sheets (yellow), gelatin alone (sham, black), or hESC-RPE cell suspensions (green) compared to untreated RCS rats (blue). Results are presented as average response (b-wave) curves (under dim light exposure) to flashing lights of increasing intensity (C, E, and G) and as area under the curve (AUC) measurements for the corresponding graphs for each group (D, F, and H). Six to nine animals per time point. Analysis of variance (ANOVA) followed by Fisher's protected least squares difference (PLSD) test; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$ . Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison post hoc test.



to transplantation with hESC-RPE cell suspensions or gelatin alone (sham control) (Fig. 5A and fig. S12). Further examination of a horizontal temporonasal (Fig. 5B) or vertical dorsoventral (Fig. 5C)

region around the area of recovery suggested that the increase in outer nuclear layer thickness was greater after transplantation of hESC-RPE cell sheets compared to hESC-RPE cell suspensions. This

**Fig. 6. Photoreceptor cell survival in the RCS rat retina after transplantation with hESC-RPE cell sheets.** Immunofluorescence staining for recoverin (green) and rhodopsin (red) in sections of RCS rat retinas 3 months after transplantation with gelatin alone (sham), hESC-RPE cell sheets, or hESC-RPE cell suspensions is shown. Nuclei were counterstained with DAPI (white). White boxes in (A) indicate area of enlargement shown in (B) (recoverin), (C) (rhodopsin), and (D) (merge + DAPI). The asterisks in (D) indicate the position of the ONL. Images correspond to maximal projections of z stacks. Scale bars, 50  $\mu$ m (top row) and 10  $\mu$ m (bottom row).



and rhodopsin confirmed more photoreceptor cell rhodopsin-positive outer segments in rat eyes transplanted with hESC-RPE cell sheets compared to hESC-RPE cell suspensions (Fig. 6, B to D).

We evaluated whether transplantation of an exogenous agent, in this case gelatin alone, could affect the activation of macrophages/microglia in the retina. Using an antibody against ionizing calcium-binding adaptor molecule 1, a protein specifically expressed by activated macrophages/microglia (48), we observed immune cell activation in untreated dystrophic rat retinas and those transplanted with gelatin alone (fig. S14).

## DISCUSSION

Here, we asked whether the delivery of hESC-RPE cell sheets provided greater efficacy than hESC-RPE cell suspensions for retinal dystrophic rescue in the RCS rat model of retinal degeneration. We engineered growth of hESC-RPE cell sheets on a pretreated hAM scaffold and demonstrated improved photoreceptor cell rescue and retinal function after transplantation into the eyes of RCS rats with retinal dystrophy. Transplanting hESC-RPE cells as epithelial sheets rather than as cell suspensions led to improved rescue of photoreceptor cells and improved visual acuity in the RCS rats.

Comparable protocols, some with GMP-compliant components, have been developed for the generation of RPE cells from hESCs and hiPSCs (23, 49–55). For example, Schwartz and collaborators (1) used GMP-compliant hESCs cultured on mouse feeder cells to generate human RPE cells, and Kamao and colleagues (29) used GMP-compliant hiPSCs to generate human RPE cells. Here, we used a feeder-free hESC line cultured and banked under GMP conditions to generate hESC-RPE cells for transplantation into RCS rats with retinal degeneration.

We demonstrated that the hAM scaffold supported hESC-RPE cell growth as epithelial sheets. We cultured hESC-RPE cells on hAM scaffolds derived from different batches and routinely obtained ma-

ture epithelial sheets. The hAM scaffold has been used clinically, for example, in the treatment of corneal ulceration (31). We prepared our hAM scaffolds in small batches and cryopreserved them in tissue banks for future use to demonstrate scalability (31).

Our preclinical data in RCS rats demonstrated that transplantation of tissue-engineered hESC-RPE cell sheets improved visual acuity when compared to transplantation of hESC-RPE cell suspensions. The early photoreceptor cell preservation elicited by gelatin alone (sham control) may reflect debris, that is, shed photoreceptor cell outer segments that were washed into the space created during subretinal surgery (28, 56, 57). The accumulation of debris causes the dysfunction and death of photoreceptor cells, and this transitory washing away of the debris might have delayed photoreceptor cell death. Alternatively, insertion of gelatin alone into the subretinal space could have promoted photoreceptor cell survival by enabling the sustained release of neurotrophic factors (58). Here, we observed that gelatin alone did not correlate with better visual performance on the optokinetic test, highlighting the crucial role that transplanted hESC-RPE cells played in the improvement in visual acuity in the transplanted rats. Electrotoretinogram responses indicated that some photoreceptor cells were still present in the RCS rat retina and were sensitive to light. A few remaining photoreceptor cells could explain the weak protective effect observed after transplantation of gelatin alone.

In our study, hESC-RPE cell suspensions elicited similar or better rescue of electrotoretinogram responses and restoration of visual acuity in RCS rats compared to cell preparations used in other studies (29, 59–61). RPE cell sheets secrete more growth factors and cytokines than do RPE cell suspensions (62) and are less sensitive to oxidative stress-induced cell death (26). This may explain the improvement in visual acuity observed after transplantation of tissue-engineered hESC-RPE cell sheets compared to hESC-RPE cell suspensions. Different substrates and scaffolds have been proposed to generate RPE cell sheets (15, 20, 63–65) in a way that increases the

survival of transplanted cells and helps to reconstruct the damaged Bruch's membrane of the choroid, an injury common to different forms of age-related macular degeneration.

A limitation of our study is the risk of immune responses to the transplanted hESC-RPE cell sheets in human patients. The survival of transplanted cells is limited in xenotransplantation settings (20, 63, 66). Transplantation into genetically immunocompromised athymic nude rats did enable longer graft survival (27). For most experiments, we used RCS rats that were not immunocompromised, and therefore, we had to add the immunosuppressive drug cyclosporine to the rats' drinking water (19, 67). In addition, the transscleral surgery may damage the blood-retina barrier, potentially allowing immune cells to enter the retina. Addressing immune rejection in our xenotransplantation model will not provide information about how hESC-RPE cell sheets will survive in the human eye, an allogeneic transplantation setting. Banking of hESCs and hiPSCs with different haplotypes may help to mitigate this problem (68, 69). Subretinal transplantation of monkey iPSC-RPE cells did not result in immune rejection when the major histocompatibility complex of the donor iPSC-RPE cells matched that of the recipient in the absence of immunosuppression (70). Local application of corticosteroids (for example, intraocular corticosteroid capsules or transitory immune suppression) may also help to mitigate the possibility of immune rejection (2).

Another limitation of this study concerns the larger delivery injector device that would be required for use in human eyes. The head of the injector device used in this study for small rat eyes would need to be elongated to enable it to access the subretinal space of human eyes. For successful clinical translation, a surgical technique ensuring accurate delivery of hESC-RPE cell sheets into the human eye is required. Notably, the transscleral route used in rodent eye transplantation is not appropriate for cell therapy delivery to the human eye. Rather, a subretinal delivery route via a vitrectomy followed by a retinotomy performed by ophthalmology surgeons is more appropriate (4, 71, 72).

On the basis of our preclinical results, we are currently generating GMP-compliant hESC-RPE cell sheets with the goal of launching a phase 1/2 clinical trial to treat patients with retinitis pigmentosa caused by mutations in *RPE65*, lecithin retinol acyltransferase (*LRAT*), or *MERTK*. Our strategy may also be useful for treating other retinal diseases where Bruch's membrane is damaged such as age-related macular degeneration and Bietti's corneoretinal dystrophy (73, 74).

## MATERIALS AND METHODS

### Study design

The goal of this study was to generate GMP-compliant hESC-RPE cell sheets and to characterize the effects of their transplantation into the subretinal space of RCS rats, compared to hESC-RPE cell suspensions. Predefined end point criteria included electroretinogram responses, histological evaluation, OCT analysis, and optokinetic testing. No prespecified effect size was used to determine sample sizes. Sample sizes were estimated from preliminary experiments. No outliers were excluded from data analysis. Operators were blinded to the treatment during acquisition and analysis of data.

### RPE cell differentiation and banking

The differentiation medium was composed of Dulbecco's modified Eagle's medium with 20% knockout serum (KSR, Thermo Fisher Scientific), supplemented with 50 μM β-mercaptoethanol and 1× minimum

essential media–nonessential amino acids (Thermo Fisher Scientific). When pigmented patches appeared in the differentiating culture, these patches were dissected under a stereomicroscope with a fine 15° ophthalmic knife. Only pigmented areas are collected to ensure RPE purity. They are seeded (P0) in 24-well plates (about 10 clumps per well-P24) coated with CTS CELLstart substrate or L7 hPSC matrix, and the medium was then switched to 4% KSR. Both matrices (CTS CELLstart substrate or L7 hPSC matrix) are equivalent and one could be substituted by the other. When hESC-RPE cells reached confluence, they were passaged via enzymatic cell dissociation (TrypLE; Thermo Fisher Scientific) and were banked frozen using Cryostor medium (BioLife Solutions) in liquid nitrogen tanks. The release quality controls that we selected for the future clinical-grade banks are listed in tables S2 and S3.

### Animals

Adult nude rats (Cr:NIH-Foxn1<sup>nu</sup>; Charles River Laboratories) and pigmented dystrophic RCS (*rd<sup>-/-</sup>, p<sup>+</sup>*) rats were kept in a 12-hour light/12-hour dark cycle on plastic cages and allowed to eat and drink ad libitum in the animal facility of the Vision Institute (agreement number A 75-12-02). All experiments were carried out in strict accordance with the Association for Research in Vision and Ophthalmology statement for animal research in ophthalmology. Moreover, protocols were approved by the local ethical committee (Charles Darwin ethical committee for animal experimentation C2EA-05) in strict accordance with French and European regulation for animal use in research (authorization number 01483.02).

### hESC-RPE cell sheet preparation

hESC-RPE cells were directly thawed, washed, and plated over stabilized hAM on Cellcrown for 4/8 weeks before grafting. At the time of injection, the tissue-engineered product (hESC-RPE cells on hAM) was embedded into a GMP-compliant gelatin excipient (Merck). Briefly, a block of 20% gelatin was placed in a vibratome (Leica), and the tissue-engineered product was positioned on top of this block. Then, a solution of 8% gelatin made with CO<sub>2</sub>-independent medium (Thermo Fisher Scientific) at 37°C was added over the tissue-engineered product. After polymerization, the gelatin block containing the tissue-engineered product was then cut with the vibratome to precisely adjust the thickness of the tissue-engineered product.

### Cell transplantation

From 2 days before transplantation to the end of the follow-up, dystrophic RCS rats were maintained under immunosuppression through cyclosporine treatment (210 mg/liter) in the drinking water (75). Twenty-eight-day-old RCS rats were anesthetized with intraperitoneal injection of ketamine (50 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg). Adult nude rats (Cr:NIH-Foxn1<sup>nu</sup>) (8 weeks old) received injections of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). An ophthalmic gel was placed onto each eye (Lacrinorm 0.2%, Bausch & Lomb). A few drops of a local anesthetic (oxybuprocaine; Thea) and tropicamide (Mydriaticum 0.5%; Thea) were added onto the cornea of the eye to be transplanted. After a small scleral incision using a small hook, a local subretinal detachment was created through air injection with a Hamilton syringe under an operating microscope (Leica F18). A hole into the cornea was created with a needle to reduce the intraocular pressure. The incision in the sclera was then enlarged with an ophthalmic knife (WPI) to allow the entry of the head of the injector (Viscoject, Medicel). The tissue-engineered product (2 to 3 mm<sup>2</sup>; up to 5 × 10<sup>4</sup> cells) was slowly delivered in the subretinal space, and the hole in the sclera was then

immediately closed using a 10-0 suture (Peters Surgical). Sham-operated animals received the same protocol with an injection of the equivalent quantity of gelatin. For the cell suspension group, hESC-RPE cells [4  $\mu$ l;  $5 \times 10^6$  cells/ $\mu$ l] in  $\text{CO}_2$ -independent medium (Thermo Fisher Scientific) were slowly injected using a Hamilton syringe just after the formation of the subretinal space. After the surgery, a vitamin A ointment (Allergan) was placed on each eye and animals were kept on a thermostated cage until awakening. Animals from each litter were distributed randomly to each treatment condition. For each litter/session of transplantation, every effort was made to treat at least one animal per condition. Animals with signs of major intraocular hemorrhage during the surgery or with disrupted retina/absence of graft based on OCT evaluation were excluded (about 20% of animals).

#### Electroretinography

Full-field electroretinographies were performed 5, 9, and 12 weeks after surgery. After 24 hours of dark adaptation, animals were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). Pupils were dilated with tropicamide (Mydriaticum 0.5%; Thea), and the cornea was locally anesthetized (oxybuprocaine chlorhydrate; Thea). Body temperature was maintained at 37°C using a heating pad. Gold electrodes were placed on each cornea, which were humidified with an ophthalmic gel (Lacrinorm 0.2%, Bausch & Lomb). Ground and reference electrodes were placed on the back and cheeks. Full-field electroretinograms were recorded simultaneously in both eyes using Visiosystem (SIEM Bio-Médicale). A Ganzfeld stimulator generated light stimuli (SIEM Bio-Médicale). Each individual response is the mean of five measures. At the end of the procedure, a vitamin A ointment was added in each eye, and animals were placed in a thermostatic cage until awakening. The operator performing electroretinography was blinded to the treatment of each animal.

#### Optical coherence tomography

Spectral domain OCT was performed 12 weeks after surgery on rats anesthetized with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). Tropicamide (Mydriaticum; Thea) and phenylephrine (Neo-Synephrine; Europhtha) were used for pupil dilatation. The OCT imaging device (Bioptrigen 40 nm HHP) was coupled to InVivoVue software (Bioptrigen). Rectangular scans were used to acquire b-scans near the optic nerve. En face OCT images were reconstructed from b-scans using ImageJ software (reslice and maximal projection tools). Four hundred twenty measurements of the outer nuclear layer thickness were taken with ImageJ near the optic nerve in the temporodorsal quadrant, corresponding approximately to the region of transplantation. Data collected were represented as a heat map. The operator performing OCT was blinded to the treatment of each animal. A mean of these 420 measures per eye was also used to evaluate the mean recovery in this quadrant.

#### Behavioral testing

Optokinetic tests were performed 4, 6, and 13 weeks after surgery using the automated OptoMotry system (CerebralMechanics Inc.). The animal was placed over an elevated platform in a chamber composed of four screens, creating a virtual cylinder centered on the animal head. The software automatically modifies the width of the moving stripes according to the animal responses pointed out by the experimenter. Animals that did not stay in the platform were excluded from the test. At the end of the test, the OptoMotry system

gave a value of visual acuity for each eye evaluated. The operator performing the test was blinded to the treatment administered.

#### Statistical analysis

Statview 4.5 software (SAS Institute Inc.) and GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc.) were used for statistical analysis. Normality was checked and evaluated with the Shapiro-Wilk test. *F* test was used to assess equality of variances. For normally distributed data, ANOVA followed by Fisher's protected least squares difference test was performed; significance was set at  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ , and  $***P < 0.001$ . When data were not normally distributed, Kruskal-Wallis nonparametric test was used. Dunn's multiple comparison post hoc test was then performed for comparisons among groups. Data are expressed as means  $\pm$  SEM, except if cited differently.

#### SUPPLEMENTARY MATERIALS

[www.sciencetranslationalmedicine.org/cgi/content/full/9/421/eaai7471/DC1](http://www.sciencetranslationalmedicine.org/cgi/content/full/9/421/eaai7471/DC1)

##### Materials and Methods

- Fig. S1. Characterization of the RC-9 hESC line.
- Fig. S2. Process for hESC-RPE cell generation.
- Fig. S3. Expression of RPE markers by hESC-RPE cells.
- Fig. S4. Purity of hESC-RPE cell preparation by expression of PAX-6 and MITF.
- Fig. S5. Purity of hESC-RPE cell preparation by expression of cytokeratins.
- Fig. S6. Evaluation of hESC-RPE cell preparation by FACS.
- Fig. S7. Visualization of hESC-RPE cell polarity on the hAM scaffold by immunofluorescence.
- Fig. S8. Analysis of hESC-RPE cells on the hAM scaffold by transmission and scanning electron microscopy.
- Fig. S9. Phagocytosis by hESC-RPE cells.
- Fig. S10. Absence of apoptosis in the hESC-RPE cell monolayer after extrusion from the injection device.
- Fig. S11. Functional assessment in RCS rats after transplantation with hESC-RPE cell sheets compared to hAM or gelatin alone.
- Fig. S12. OCT analysis of transplanted retinas.
- Fig. S13. OCT analysis of retinas after transplantation with hESC-RPE cell sheets compared to hAM or gelatin alone.
- Fig. S14. Analysis of inflammation markers in the retina of RCS rats after transplantation of gelatin alone.
- Table S1. Quality control data for the hESC bank.
- Table S2. Quality control data for the hESC-RPE bank.
- Table S3. Targeted regions for virus detection.
- Table S4. List of quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR) probes.
- Table S5. List of primary antibodies.
- Movie S1. 3D reconstructed images of hESC-RPE cell sheets after phagocytosis of photoreceptor cell outer segments.
- Movie S2. Method developed to load the hESC-RPE cell sheet into the injection device.
- Movie S3. 3D reconstructed images of a thin section of normal retina transplanted with the hESC-RPE cell sheet.

Downloaded from <http://stm.sciencemag.org/> by guest on December 20, 2017

#### REFERENCES AND NOTES

1. S. D. Schwartz, J.-P. Hubschman, G. Heilwell, V. Franco-Cardenas, C. K. Pan, R. M. Ostrick, E. Mirkunas, R. Gay, I. Klimanskaya, R. Lanza, Embryonic stem cell trials for macular degeneration: A preliminary report. *Lancet* **379**, 713–720 (2012).
2. S. D. Schwartz, C. D. Regillo, B. L. Lanz, D. Elliott, P. J. Rosenfeld, N. Z. Gregori, J.-P. Hubschman, J. L. Davis, G. Heilwell, M. Spinr, J. Maguire, R. Gay, J. Bateman, R. M. Ostrick, D. Morris, M. Vincent, E. Anglade, L. V. Del Priore, R. Lanza, Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: Follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *Lancet* **385**, 509–516 (2015).
3. M. J. Song, K. Bharti, Looking into the future: Using induced pluripotent stem cells to build two and three dimensional ocular tissue for cell therapy and disease modeling. *Brain Res.* **1638**, 2–14 (2016).
4. H. Shirai, M. Mandai, K. Matsushita, A. Kuwahara, S. Yonemura, T. Nakano, J. Assawachananont, T. Kimura, K. Saito, H. Terasaki, M. Eiraku, Y. Sasai, M. Takahashi, Transplantation of human embryonic stem cell-derived retinal tissue in two primate models of retinal degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113**, E81–E90 (2016).

5. O. Strauss, The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol. Rev.* **85**, 845–881 (2005).
6. D. T. Hartong, E. L. Berson, T. P. Dryja, Retinitis pigmentosa. *Lancet* **368**, 1795–1809 (2006).
7. S. P. Daiger, L. S. Sullivan, S. J. Bowne, Genes and mutations causing retinitis pigmentosa. *Clin. Genet.* **84**, 132–141 (2013).
8. K. M. Gehrs, D. H. Anderson, L. V. Johnson, G. S. Hageman, Age-related macular degeneration—Emerging pathogenetic and therapeutic concepts. *Ann. Med.* **38**, 450–471 (2006).
9. A. Swaroop, E. Y. Chew, C. B. Rickman, G. R. Abecasis, Unraveling a multifactorial late-onset disease: From genetic susceptibility to disease mechanisms for age-related macular degeneration. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **10**, 19–43 (2009).
10. S. Khandhadia, J. Cherry, A. J. Lotery, Age-related macular degeneration. *Adv. Exp. Med. Biol.* **724**, 15–36 (2012).
11. W. L. Wong, X. Su, X. Li, C. M. G. Cheung, R. Klein, C.-Y. Cheng, T. Y. Wong, Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob. Health* **2**, e106–e116 (2014).
12. D. A. Thompson, R. R. Ali, E. Banin, K. E. Branham, J. G. Flannery, D. M. Gamm, W. W. Hauswirth, J. R. Heckenlively, A. Iannaccone, K. T. Jayasundera, N. W. Khan, R. S. Molday, M. E. Pennesi, T. A. Reh, R. G. Weleber, D. N. Zacks; Monaciano Consortium, Advancing therapeutic strategies for inherited retinal degeneration: Recommendations from the Monaciano Symposium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **56**, 918–931 (2015).
13. M. J. Seiler, R. B. Aramant, Cell replacement and visual restoration by retinal sheet transplants. *Prog. Retin. Eye Res.* **31**, 661–687 (2012).
14. S. Binder, B. V. Stanzel, I. Krebs, C. Glittenberg, Transplantation of the RPE in AMD. *Prog. Retin. Eye Res.* **26**, 516–554 (2007).
15. L. da Cruz, F. K. Chen, A. Ahmad, J. Greenwood, P. Coffey, RPE transplantation and its role in retinal disease. *Prog. Retin. Eye Res.* **26**, 598–635 (2007).
16. K. Bharti, M. Rao, S. C. Hull, D. Stroncek, B. P. Brooks, E. Feigal, J. C. van Meurs, C. A. Huang, S. S. Miller, Developing cellular therapies for retinal degenerative diseases. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **55**, 1191–1202 (2014).
17. K. Ben M'Barek, F. Regent, C. Monville, Use of human pluripotent stem cells to study and treat retinopathies. *World J. Stem Cells* **7**, 596–604 (2015).
18. C. Brandl, F. Grassmann, J. Riolfi, B. H. F. Weber, Tapping stem cells to target AMD: Challenges and prospects. *J. Clin. Med.* **4**, 282–303 (2015).
19. H. Nazari, L. Zhang, D. Zhu, G. J. Chader, P. Falabella, F. Stefanini, T. Rowland, D. O. Clegg, A. H. Kashani, D. R. Hinton, M. S. Humayun, Stem cell based therapies for age-related macular degeneration: The promises and the challenges. *Prog. Retin. Eye Res.* **48**, 1–39 (2015).
20. B. V. Stanzel, Z. Liu, S. Somboonthanakij, W. Wongswad, R. Brinken, N. Eter, B. Corneo, F. G. Holz, S. Temple, J. H. Stern, T. A. Blenkinsop, Human RPE stem cells grown into polarized RPE monolayers on a polyester matrix are maintained after grafting into rabbit subretinal space. *Stem Cell Rep.* **2**, 64–77 (2014).
21. E. Salero, T. A. Blenkinsop, B. Corneo, A. Harris, D. Rabin, J. H. Stern, S. Temple, Adult human RPE can be activated into a multipotent stem cell that produces mesenchymal derivatives. *Cell Stem Cell* **10**, 88–95 (2012).
22. S. Boroah, M. J. Phillips, B. Bilican, A. F. Wright, I. Wilmut, S. Chandran, D. Gamm, B. Dhillon, Using human induced pluripotent stem cells to treat retinal disease. *Prog. Retin. Eye Res.* **37**, 163–181 (2013).
23. L. L. Leach, D. O. Clegg, Concise review: Making stem cells retinal: Methods for deriving retinal pigment epithelium and implications for patients with ocular disease. *Stem Cells* **33**, 2363–2373 (2015).
24. S. Reichman, A. Terray, A. Slembruck, C. Nanteau, G. Orieux, W. Habeler, E. F. Nandrot, J.-A. Sahel, C. Monville, O. Goureau, From confluent human iPS cells to self-forming neural retina and retinal pigmented epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**, 8518–8523 (2014).
25. C. Lustremont, W. Habeler, A. Plancheron, O. Goureau, L. Grenot, P. de la Grange, I. Audo, E. F. Nandrot, C. Monville, Human induced pluripotent stem cells as a tool to model a form of Leber congenital amaurosis. *Cell. Reprogram.* **15**, 233–246 (2013).
26. J. Hsuing, D. Zhu, D. R. Hinton, Polarized human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelial cells have higher resistance to oxidative stress-induced cell death than nonpolarized cultures. *Stem Cells Transl. Med.* **4**, 10–20 (2015).
27. B. Diniz, P. Thomas, B. Thomas, R. Ribeiro, Y. Hu, R. Brant, A. Ahuja, D. Zhu, L. Liu, M. Koss, M. Maia, G. Chader, D. R. Hinton, M. S. Humayun, Subretinal implantation of retinal pigment epithelial cells derived from human embryonic stem cells: Improved survival when implanted as a monolayer. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **54**, 5087–5096 (2013).
28. T. Ilmarinen, H. Hildenmaa, P. Kööbi, S. Nymark, A. Sorkio, J.-H. Wang, B. V. Stanzel, F. Thielges, P. Alajuuoma, O. Oksala, M. Kataja, H. Uusitalo, H. Skottman, Ultrathin polyimide membrane as cell carrier for subretinal transplantation of human embryonic stem cell derived retinal pigment epithelium. *PLOS ONE* **10**, e0143669 (2015).
29. H. Kamao, M. Mandai, S. Okamoto, N. Sakai, A. Suga, S. Sugita, J. Kiryu, M. Takahashi, Characterization of human induced pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelium cell sheets aiming for clinical application. *Stem Cell Rep.* **2**, 205–218 (2014).
30. M. Mandai, A. Watanabe, Y. Kurimoto, Y. Hirami, C. Morinaga, T. Daimon, M. Fujihara, H. Akimaru, N. Sakai, Y. Shibata, M. Terada, Y. Nomiyama, S. Tanishima, M. Nakamura, H. Kamao, S. Sugita, A. Onishi, T. Ito, K. Fujita, S. Kawamata, M. J. Go, C. Shinohara, K.-i. Hata, M. Sawada, M. Yamamoto, S. Ohta, Y. Ohara, K. Yoshida, J. Kuwahara, Y. Kitano, N. Amano, M. Umekage, F. Kitakoa, A. Tanaka, C. Okada, N. Takasu, S. Ogawa, S. Yamamoto, M. Takahashi, Autologous induced stem-cell-derived retinal cells for macular degeneration. *N. Engl. J. Med.* **376**, 1038–1046 (2017).
31. A. Paolin, E. Cogliati, D. Trojan, C. Griffoni, A. Grassetto, H. M. Elbadawy, D. Ponzin, Amniotic membranes in ophthalmology: Long term data on transplantation outcomes. *Cell Tissue Bank.* **17**, 51–58 (2016).
32. J. F. Kiltgaard, E. Scherfig, J. U. Prause, M. la Cour, Transplantation of amniotic membrane to the subretinal space in pigs. *Stem Cells Int.* **2012**, 716968 (2012).
33. H. He, Y. Tan, S. Duffort, V. L. Perez, S. C. G. Tseng, In vivo downregulation of innate and adaptive immune responses in corneal allograft rejection by HC-HA/PTX3 complex purified from amniotic membrane. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **55**, 1647–1656 (2014).
34. H. He, S. Zhang, S. Tighe, J. Son, S. C. G. Tseng, Immobilized heavy chain-hyaluronic acid polarizes lipopolysaccharide-activated macrophages toward M2 phenotype. *J. Biol. Chem.* **288**, 25792–25803 (2013).
35. P. A. De Sousa, B. J. Tyre, K. Bruce, P. Dand, G. Russell, D. M. Collins, A. Greenshields, K. McDonald, H. Bradburn, M. A. Canham, T. Kunath, J. M. Downie, M. Bateman, A. Courtney, Derivation of the clinical grade human embryonic stem cell line RCe013-A (RC-9). *Stem Cell Res.* **17**, 36–41 (2016).
36. International Stem Cell Banking Initiative, Consensus guidance for banking and supply of human embryonic stem cell lines for research purposes. *Stem Cell Rev.* **5**, 301–314 (2009).
37. N. M. McKechnie, M. Boulton, H. L. Robey, F. J. Savage, I. Grierson, The cytoskeletal elements of human retinal pigment epithelium: In vitro and in vivo. *J. Cell Sci.* **91** (Pt. 2), 303–312 (1988).
38. A. V. Kuznetsova, A. M. Kurinov, M. A. Aleksandrova, Cell models to study regulation of cell transformation in pathologies of retinal pigment epithelium. *J. Ophthalmol.* **2014**, 801787 (2014).
39. J. P. Heller, J. C. F. Kwok, E. Vecino, K. R. Martin, J. W. Fawcett, A method for the isolation and culture of adult rat retinal pigment epithelial (RPE) cells to study retinal diseases. *Front. Cell. Neurosci.* **9**, 449 (2015).
40. E. F. Nandrot, E. M. Dufour, Merkt in daily retinal phagocytosis: A history in the making. *Adv. Exp. Med. Biol.* **664**, 133–140 (2010).
41. K. Ohno-Matsui, S. Ichinose, K.-i. Nakahama, T. Yoshida, A. Kojima, M. Mochizuki, I. Morita, The effects of amniotic membrane on retinal pigment epithelial cell differentiation. *Mol. Vis.* **11**, 1–10 (2005).
42. B. V. Stanzel, E. M. Espana, M. Gruterich, T. Kawakita, J.-M. Parel, S. C. G. Tseng, S. Binder, Amniotic membrane maintains the phenotype of rabbit retinal pigment epithelial cells in culture. *Exp. Eye Res.* **80**, 103–112 (2005).
43. M. Berryman, Z. Franck, A. Bretscher, Ezrin is concentrated in the apical microvilli of a wide variety of epithelial cells whereas moesin is found primarily in endothelial cells. *J. Cell Sci.* **105** (Pt. 4), 1025–1043 (1993).
44. R. Viswanatha, A. Bretscher, D. Garbett, Dynamics of ezrin and EBP50 in regulating microvilli on the apical aspect of epithelial cells. *Biochem. Soc. Trans.* **42**, 189–194 (2014).
45. Y. Yang, S. Mohand-Said, T. Léveillard, V. Fontaine, M. Simonutti, J.-A. Sahel, Transplantation of photoreceptor and total neural retina preserves cone function in P23H rhodopsin transgenic rat. *PLOS ONE* **5**, e13469 (2010).
46. P. M. D'Cruz, D. Yasumura, J. Weir, M. T. Matthes, H. Abderrahim, M. M. LaVail, D. Vollrath, Mutation of the receptor tyrosine kinase gene Merkt in the retinal dystrophic RCS rat. *Hum. Mol. Genet.* **9**, 645–651 (2000).
47. A. Gal, Y. Li, D. A. Thompson, J. Weir, U. Orth, S. G. Jacobson, E. Apfelstedt-Sylla, D. Vollrath, Mutations in MERTK, the human orthologue of the RCS rat retinal dystrophy gene, cause retinitis pigmentosa. *Nat. Genet.* **26**, 270–271 (2000).
48. A. Noailles, V. Maneu, L. Campello, V. Gómez-Vicente, P. Lax, N. Cuenca, Persistent inflammatory state after photoreceptor loss in an animal model of retinal degeneration. *Sci. Rep.* **6**, 33356 (2016).
49. I. Klimanskaya, J. Hipp, K. A. Rezai, M. West, A. Atala, R. Lanza, Derivation and comparative assessment of retinal pigment epithelium from human embryonic stem cells using transcriptomics. *Cloning Stem Cells* **6**, 217–245 (2004).
50. B. O. Pennington, D. O. Clegg, Z. K. Melkoumian, S. T. Hikita, Defined culture of human embryonic stem cells and xeno-free derivation of retinal pigmented epithelial cells on a novel, synthetic substrate. *Stem Cells Transl. Med.* **4**, 165–177 (2015).
51. H. Vaajasaari, T. Ilmarinen, K. Juutti-Uusitalo, K. Rajala, N. Onnela, S. Narkilahti, R. Suuronen, J. Hyttinen, H. Uusitalo, H. Skottman, Toward the defined and xeno-free differentiation of functional human pluripotent stem cell-derived retinal pigment epithelial cells. *Mol. Vis.* **17**, 558–575 (2011).

52. A. Plaza Reyes, S. Petrus-Reurer, L. Antonsson, S. Stenfelt, H. Bartuma, S. Panula, T. Mader, I. Douagi, H. André, O. Hovatta, F. Lanner, A. Kvanta, Xeno-free and defined human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelial cells functionally integrate in a large-eyed preclinical model. *Stem Cell Rep.* **6**, 9–17 (2016).
53. J. Maruotti, K. Wahlin, D. Gorrell, I. Bhutto, G. Lutty, D. J. Zack, A simple and scalable process for the differentiation of retinal pigment epithelium from human pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl. Med.* **2**, 341–354 (2013).
54. D. E. Buchholz, S. T. Hikita, T. J. Rowland, A. M. Friedrich, C. R. Hinman, L. V. Johnson, D. O. Clegg, Derivation of functional retinal pigmented epithelium from induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* **27**, 2427–2434 (2009).
55. Y. Zhu, M. Carido, A. Melinhardt, T. Kurth, M. O. Karl, M. Ader, E. M. Tanaka, Three-dimensional neuroepithelial culture from human embryonic stem cells and its use for quantitative conversion to retinal pigment epithelium. *PLOS ONE* **8**, e54552 (2013).
56. A.-J. Carr, A. A. Vogler, S. T. Hikita, J. M. Lawrence, C. Gias, L. L. Chen, D. E. Buchholz, A. Ahmad, M. Semo, M. J. K. Smart, S. Hasan, L. da Cruz, L. V. Johnson, D. O. Clegg, P. J. Coffey, Protective effects of human iPS-derived retinal pigment epithelium cell transplantation in the retinal dystrophic rat. *PLOS ONE* **4**, e8152 (2009).
57. F. Gaillard, Y. Sauvé, Cell-based therapy for retina degeneration: The promise of a cure. *Vision Res.* **47**, 2815–2824 (2007).
58. E. G. Faktorovich, R. H. Steinberg, D. Yasumura, M. T. Matthes, M. M. LaVail, Photoreceptor degeneration in inherited retinal dystrophy delayed by basic fibroblast growth factor. *Nature* **347**, 83–86 (1990).
59. R. D. Lund, S. Wang, I. Klimanskaya, T. Holmes, R. Ramos-Kelsey, B. Lu, S. Girman, N. Bischoff, Y. Sauvé, R. Lanza, Human embryonic stem cell-derived cells rescue visual function in dystrophic RCS rats. *Cloning Stem Cells* **8**, 189–199 (2006).
60. M. Idelson, R. Alper, A. Obolensky, E. Ben-Shushan, I. Hemo, N. Yachimovich-Cohen, H. Khaner, Y. Smith, O. Wisser, M. Grupp, M. A. Cohen, S. Even-Ram, Y. Berman-Zaken, L. Matzrafi, G. Rechavi, E. Banin, B. Reubinoff, Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional retinal pigment epithelium cells. *Cell Stem Cell* **5**, 396–408 (2009).
61. B. Lu, C. Malcuit, S. Wang, S. Girman, P. Francis, L. Lemieux, R. Lanza, R. Lund, Long-term safety and function of RPE from human embryonic stem cells in preclinical models of macular degeneration. *Stem Cells* **27**, 2126–2135 (2009).
62. S. Sonoda, P. G. Sreekumar, S. Kase, C. Spee, S. J. Ryan, R. Kannan, D. R. Hinton, Attainment of polarity promotes growth factor secretion by retinal pigment epithelial cells: Relevance to age-related macular degeneration. *Aging* **2**, 28–42 (2009).
63. N. S. Bhatt, D. A. Newsome, T. Fenech, T. P. Hessburg, J. G. Diamond, M. V. Miceli, K. E. Kratz, P. D. Oliver, Experimental transplantation of human retinal pigment epithelial cells on collagen substrates. *Am. J. Ophthalmol.* **117**, 214–221 (1994).
64. R. L. Williams, Y. Krishna, S. Dixon, A. Haridas, I. Girion, C. Sheridan, Polyurethanes as potential substrates for sub-retinal retinal pigment epithelial cell transplantation. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **16**, 1087–1092 (2005).
65. B. B. Thomas, D. Zhu, L. Zhang, P. B. Thomas, Y. Hu, H. Nazari, F. Stefanini, P. Falabella, D. O. Clegg, D. R. Hinton, M. S. Humayun, Survival and functionality of hESC-derived retinal pigment epithelium cells cultured as a monolayer on polymer substrates transplanted in RCS rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **57**, 2877–2887 (2016).
66. L. V. Del Priore, O. Ishida, E. H. Johnson, Y. Sheng, D. B. Jacoby, L. Geng, T. H. Tezel, H. J. Kaplan, Triple immune suppression increases short-term survival of porcine fetal retinal pigment epithelium xenografts. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**, 4044–4053 (2003).
67. B. Xian, B. Huang, The immune response of stem cells in subretinal transplantation. *Stem Cell Res. Ther.* **6**, 161 (2015).
68. C. J. Taylor, E. M. Bolton, S. Pocock, L. D. Sharples, R. A. Pedersen, J. A. Bradley, Banking on human embryonic stem cells: Estimating the number of donor cell lines needed for HLA matching. *Lancet* **366**, 2019–2025 (2005).
69. P. W. Andrews, D. Baker, N. Benvinisty, B. Miranda, K. Bruce, O. Brüstle, M. Choi, Y.-M. Choi, J. M. Crook, P. A. de Sousa, P. Dvorak, C. Freund, M. K. Firpo, M. K. Furue, P. Gokhale, H.-Y. Ha, E. Han, S. Haupt, L. Healy, D. J. Hei, O. Hovatta, C. Hunt, S.-M. Hwang, M. S. Inamdar, R. M. Isasi, M. Jaconi, V. Jekerle, P. Kamthorn, M. C. Kibbey, I. Knezevic, B. B. Knowles, S.-K. Koo, Y. Laabi, L. Leopoldo, P. Liu, G. P. Lomax, J. F. Loring, T. E. Ludwig, K. Montgomery, C. Mummery, A. Nagy, Y. Nakamura, S. Oh, S.-K. Oh, T. Otonkoski, M. Pera, M. Peschanski, P. Pranke, K. M. Rajala, M. Rao, R. Ruttachuk, B. Reubinoff, L. Ricco, H. Rooke, D. Sipp, G. N. Stacey, H. Suemori, T. A. Takahashi, K. Takada, S. Talib, S. Tannenbaum, B.-Z. Yuan, F. Zeng, Q. Zhou, Points to consider in the development of seed stocks of pluripotent stem cells for clinical applications: International Stem Cell Banking Initiative (ISCB). *Regen. Med.* **10**, 1–44 (2015).
70. S. Sugita, Y. Iwasaki, K. Makabe, H. Kamao, M. Mandai, T. Shiina, K. Ogasawara, Y. Hirami, Y. Kurimoto, M. Takahashi, Successful transplantation of retinal pigment epithelial cells from MHC homozygote iPSCs in MHC-matched models. *Stem Cell Rep.* **7**, 635–648 (2016).
71. N. D. Radtke, M. J. Seiler, R. B. Aramant, H. M. Petry, D. J. Pidwell, Transplantation of intact sheets of fetal neural retina with its retinal pigment epithelium in retinitis pigmentosa patients. *Am. J. Ophthalmol.* **133**, 544–550 (2002).
72. N. D. Radtke, R. B. Aramant, H. M. Petry, P. T. Green, D. J. Pidwell, M. J. Seiler, Vision improvement in retinal degeneration patients by implantation of retina together with retinal pigment epithelium. *Am. J. Ophthalmol.* **146**, 172–182.e1 (2008).
73. A. Matafisi, L. Zografos, E. Millà, M. Secrétan, F. L. Munier, Bietti's crystalline corneoretinal dystrophy: A cross-sectional study. *Retina* **24**, 416–426 (2004).
74. K. A. Okialda, N. B. Stover, R. G. Weleber, E. J. Kelly, Bietti crystalline dystrophy, in *GeneReviews(R)*, H. H. Ardinger, R. A. Pagon, S. E. Wallace, Eds. (University of Washington, Seattle, 1993).
75. P. J. Coffey, S. Girman, S. M. Wang, L. Hetherington, D. J. Keegan, P. Adamson, J. Greenwood, R. D. Lund, Long-term preservation of cortically dependent visual function in RCS rats by transplantation. *Nat. Neurosci.* **5**, 53–56 (2002).

**Acknowledgments:** We thank the staff from Animal, Phenotyping and Imaging Facilities of the Institut de la Vision and i-Stem for help and members of the Goureau and Monville laboratories for helpful comments. We thank E. Nandrot for the gift of FITC-labeled photoreceptor cell outer segment preparations from pigs and V. Bazin and G. Toutirais from the electron microscopy facility (IBPS/FR3631-UPMC-Paris 6) for performing transmission and scanning electron microscopy. We thank Roslin Cells for providing RC-9 hESCs. **Funding:** This work was supported by grants from the Agence Nationale pour la Recherche (ANR) (GPIPs: ANR-2010-RFC5005) and the Fondation pour la Recherche Médicale (Bio-engineering program—DBS2014093077) to O.G. and C.M. and by the European Research Council ERC Synergy (Helmholtz) to J.-A.S. It was also performed in the frame of the LABEX LIFESENSES (ANR-10-LABX-65) supported by the ANR within the Investissements d'Avenir program (ANR-11-IDEX-0004-02) to O.G. and supported by NeurATRI: A Translational Research Infrastructure for Biotherapies in Neurosciences (Investissements d'Avenir—ANR-11-INBS-0011) and INGESTEM: the National Infrastructure Engineering for Pluripotent and Differentiated Stem Cells (Investissements d'Avenir—ANR-11-INBS-000) to C.M. K.B.M. was supported by fellowships from DIM Stempole and the LABEX REVIVE (ANR-10-LABX-73). A.T. was supported by a grant from the Fondation de France (Berthe Fouassier). I-Stem is part of the Biotherapies Institute for Rare Diseases supported by the Association Française contre les Myopathies-Téléthon. **Author contributions:** A.P., W.H., and K.B.M. performed cell culture and RPE cell differentiation experiments. M.J. and W.H. prepared hAM scaffolds. W.H. and K.B.M. performed RPE quality control evaluations. F.R. and K.B.M. performed FACS purity experiments. K.B.M. performed in vivo experiments. A.T. contributed to electron microscopy. Y.Y. contributed to surgery experiments. L.C. performed TaqMan Low Density Arrays gene card experiment; S.D. and Y.M. performed karyotyping. J.-A.S., M.P., O.G., and C.M. provided resources. M.P., J.-A.S., K.B.M., O.G., and C.M. designed the study and discussed the data. K.B.M., O.G., and C.M. wrote the manuscript. **Competing interests:** J.-A.S. and O.G. are inventors on pending patent number WO2014174492 entitled "Methods for obtaining retinal progenitors, retinal pigmented epithelial cells and neural retinal cells." J.-A.S. is a consultant for Pixium Vision, GenSight Biologics, and Geni Signal and has personal financial interests in GenSight Biologics, Chronocam, Pixium Vision, Tilak Healthcare, and SparingVision. All other authors declare that they have no competing interests. **Data and materials availability:** The hAM scaffold was provided by the Tissue Bank of Saint Louis Hospital (AP-HP Paris; contact: M. Jarraya). The RC-9 hESC line was provided by Roslin Cells (Roslin Cell Therapies Ltd., United Kingdom; contact: J. Downie).

Submitted 5 August 2016

Resubmitted 6 January 2017

Accepted 6 November 2017

Published 20 December 2017

10.1126/scitranslmed.aai7471

**Citation:** K. Ben M'Barek, W. Habeler, A. Plancheron, M. Jarraya, F. Regent, A. Terray, Y. Yang, L. Chatrousse, S. Domingues, Y. Masson, J.-A. Sahel, M. Peschanski, O. Goureau, C. Monville, Human ESC-derived retinal epithelial cell sheets potentiate rescue of photoreceptor cell loss in rats with retinal degeneration. *Sci. Transl. Med.* **9**, eaai7471 (2017).

# Science Translational Medicine

## Human ESC-derived retinal epithelial cell sheets potentiate rescue of photoreceptor cell loss in rats with retinal degeneration

Karim Ben MBarek, Walter Habeler, Alexandra Plancheron, Mohamed Jarraya, Florian Regent, Angélique Terray, Ying Yang, Laure Chatrousse, Sophie Domingues, Yolande Masson, José-Alain Sahel, Marc Peschanski, Olivier Goureau and Christelle Monville

*Sci Transl Med* 9, eaai7471.  
DOI: 10.1126/scitranslmed.aai7471

### Growing cell sheets for retinal transplantation

Loss of retinal pigment epithelial (RPE) cells is responsible for severe vision impairments in retinal degenerative disorders, such as retinitis pigmentosa. Stem cell-derived RPE cells have shown promise as a cell therapy for treating retinal degeneration in preclinical studies, but long-term positive outcomes require efficient engraftment and survival of the transplanted cells. Taking a step in this direction, Ben MBarek *et al.* have developed a tissue-engineered product comprising human embryonic stem cell (hESC)-derived RPE cells that were grown as sheets on a biological scaffold. Transplantation of these hESC-RPE cell sheets into a rat model of retinal degeneration resulted in greater cell engraftment and survival and improved visual acuity compared to hESC-RPE cells transplanted as cell suspensions. These tissue-engineered cell sheets may improve the efficacy of cell therapy for treating retinal degenerative diseases.

### ARTICLE TOOLS

<http://stm.sciencemag.org/content/9/421/eaai7471>

### SUPPLEMENTARY MATERIALS

<http://stm.sciencemag.org/content/suppl/2017/12/18/9.421.eaai7471.DC1>

### REFERENCES

This article cites 74 articles, 12 of which you can access for free  
<http://stm.sciencemag.org/content/9/421/eaai7471#BIBL>

### PERMISSIONS

<http://www.sciencemag.org/help/reprints-and-permissions>

Downloaded from <http://stm.sciencemag.org/> by guest on December 20, 2017

Use of this article is subject to the [Terms of Service](#)

*Science Translational Medicine* (ISSN 1946-6242) is published by the American Association for the Advancement of Science, 1200 New York Avenue NW, Washington, DC 20005. 2017 © The Authors, some rights reserved; exclusive licensee American Association for the Advancement of Science. No claim to original U.S. Government Works. The title *Science Translational Medicine* is a registered trademark of AAAS.

Annexe 2 : Liste des amorces utilisées

Gene		SEQUENCE
18S	FRW	GAGGATGAGGTGGAACGTGT
	REV	TCTTCAGTCGCTCCAGGTCT
NANOG	FRW	CAAAGGCAAACAACCCACTT
	REV	TCTGCTGGAGGCTGAGGTAT
RAX	FRW	GGCAAGGTCAACCTACCAGAG
	REV	CATGGAGGACACTCCAGCTT
SIX3	FRW	CCTCCCACCTCTTGTGCCA
	REV	CGCTACTGCCAGAAGTATGG
PAX6	FRW	GCCAGCAACACACCTAGTCA
	REV	TGTGAGGGCTGTGTCTGTT
VSX2	FRW	CTGCCGGAAGACAGGATA
	REV	TAGAGCCCATACTCCGCCA
MITF	FRW	CCGGGTGCCAGAATTGTA
	REV	GGACAATTGGCATTGG
RPE65	FRW	AGCACTGAGTTGAGCAAGCA
	REV	GGCCTGTCTCACAGAGGAAG
CRALBP	FRW	CACGCTGCCAAGTATGATG
	REV	CCAGGACAGTTGAGGAGAGG
TYROSYNASE	FRW	GTGTAGCCTCTTCAACTCAG
	REV	GTTCCCTATTACCAAATAGCATCC
BEST1	FRW	GTCAGAGGCTCCTCCTCCT
	REV	TCTGCTCCACCAGTGTCTG
LUM	FRW	TCACATGCCACACCACAAGA
	REV	CAGTCACGCCAGTCTTGAA
FN1	FRW	CTGGCCAGTCCTACAACCAG
	REV	CGGGATCTCTGTGCC
COX-2	FRW	CCCTTCTGCCTGACACCTT
	REV	TTCTGTACTGCGGGTGGAAC
TCF1	FRW	GGCTTCTACTCCCTGACCTC
	REV	TGCTTGTCTTCAGGTTGC
AXIN2	FRW	TAACCCCTCAGAGCGATGGA
	REV	AGTTCCCTCAGCAATCGGC
APC HRM	FRW	CCGAGTCCTCATCTTGG
	REV	TGCTTGAAACATGCACTACG
APC gRNA	FRW	CACCGTGGCAGGAAGCTCATGAACC
	REV	AAACGGTTCATGAGCTTCCTGCCAC

Annexe 3 : Liste des anticorps utilisés

Antibody	Host	Company	Reference	Dilution	Application
PAX6	Rabbit	Biolegend	PRB-278P	1/500	Immunofluorescence
MITF	Mouse	Dako	M3621	1/250	Immunofluorescence
VSX2	Goat	Santa Cruz Biotechnology	sc-21690	1/250	Immunofluorescence
TYRP1	Mouse	LifeSpan BioSciences	MS-771-P1	1/500 1/100	Immunofluorescence - Flow cytometry
EZRIN	Mouse	Sigma	E8897	1/250	Immunofluorescence
ZO-1	Rabbit	Invitrogen	402300	1/500	Immunofluorescence
BEST	Mouse	Abcam	ab2182	1/250	Immunofluorescence
MERTK	Rabbit	Abcam	Y323	1/500	Immunofluorescence
NANOG	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology	sc-33760	1/500	Immunofluorescence
OCT 3/4	Goat	Santa Cruz Biotechnology	sc-5279	1/500	Immunofluorescence
SSEA4	Mouse	R&D systems	FAB1435A	1/100	Flow cytometry
TRA1-60	Mouse	Santa Cruz Biotechnology	sc-21705	1/500	Immunofluorescence
TRA1-81	Mouse	Santa Cruz Biotechnology	sc-21706	1/500	Immunofluorescence
TRA1-81	Mouse	eBioscience	12-8883-82	1/100	Flow cytometry
TYROSYNASE	Mouse	Abcam	ab738	1/1000	Western Blot
MITF	Rabbit	Abcam	ab20663	1/1000	Western Blot
P21	Rabbit	Santa Cruz Biotechnology	sc-397	1/500	Immunofluorescence

## BIBLIOGRAPHIE

- Aasen, T., Raya, A., Barrero, M.J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilić, J., Pekarik, V., Tiscornia, G., et al. (2008). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat. Biotechnol.* *26*, 1276–1284.
- Ablonczy, Z., Dahrouj, M., Tang, P.H., Liu, Y., Sambamurti, K., Marmorstein, A.D., and Crosson, C.E. (2011). Human Retinal Pigment Epithelium Cells as Functional Models for the RPE In Vivo. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *52*, 8614–8620.
- Adler, R., and Canto-Soler, M.V. (2007). Molecular mechanisms of optic vesicle development: complexities, ambiguities and controversies. *Dev. Biol.* *305*, 1–13.
- Adli, M. (2018). The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat. Commun.* *9*, 1911.
- Agathon, A., Thisse, C., and Thisse, B. (2003). The molecular nature of the zebrafish tail organizer. *Nature* *424*, 448–452.
- Algvere, P.V., Gouras, P., and Dafgård Kopp, E. (1999). Long-term outcome of RPE allografts in non-immunosuppressed patients with AMD. *Eur. J. Ophthalmol.* *9*, 217–230.
- Amos-Landgraf, J.M., Kwong, L.N., Kendziora, C.M., Reichelderfer, M., Torrealba, J., Weichert, J., Haag, J.D., Chen, K.-S., Waller, J.L., Gould, M.N., et al. (2007). A target-selected Apc-mutant rat kindred enhances the modeling of familial human colon cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 4036–4041.
- Anokye-Danso, F., Trivedi, C.M., Juhr, D., Gupta, M., Cui, Z., Tian, Y., Zhang, Y., Yang, W., Gruber, P.J., Epstein, J.A., et al. (2011). Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* *8*, 376–388.
- Aoki, K., and Taketo, M.M. (2007). Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. *J. Cell Sci.* *120*, 3327–3335.
- Aoki, K., Aoki, M., Sugai, M., Harada, N., Miyoshi, H., Tsukamoto, T., Mizoshita, T., Tatematsu, M., Seno, H., Chiba, T., et al. (2007). Chromosomal instability by beta-catenin/TCF transcription in APC or beta-catenin mutant cells. *Oncogene* *26*, 3511–3520.
- Araújo, R.S., Santos, D.F., and Silva, G.A. (2018). The role of the retinal pigment epithelium and Müller cells secretome in neovascular retinal pathologies. *Biochimie*.
- Archibald, P.R.T., Chandra, A., Thomas, D., Chose, O., Massouridès, E., Laâbi, Y., and Williams, D.J. (2016). Comparability of automated human induced pluripotent stem cell culture: a pilot study. *Bioprocess Biosyst. Eng.* *39*, 1847–1858.
- Arepalli, S., Kaliki, S., Shields, J.A., and Shields, C.L. (2012). Growth of congenital hypertrophy of the retinal pigment epithelium over 22 years. *J. Pediatr. Ophthalmol. Strabismus* *49 Online*, e73-75.
- Avalos, J.L., Bever, K.M., and Wolberger, C. (2005). Mechanism of Sirtuin Inhibition by Nicotinamide: Altering the NAD<sup>+</sup> Cosubstrate Specificity of a Sir2 Enzyme. *Mol. Cell* *17*, 855–868.
- Ban, Y., and Rizzolo, L.J. (2000). Regulation of glucose transporters during development of the retinal pigment epithelium. *Brain Res. Dev. Brain Res.* *121*, 89–95.

- Ban, H., Nishishita, N., Fusaki, N., Tabata, T., Saeki, K., Shikamura, M., Takada, N., Inoue, M., Hasegawa, M., Kawamata, S., et al. (2011). Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 14234–14239.
- Bardos, J., Sulekova, Z., and Ballhausen, W.G. (1997). Novel exon connections of the brain-specific (BS) exon of the adenomatous polyposis coli gene. *Int. J. Cancer* **73**, 137–142.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A., and Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* **315**, 1709–1712.
- Barry, J., Hyllner, J., Stacey, G., Taylor, C.J., and Turner, M. (2015). Setting Up a Haplobank: Issues and Solutions. *Curr. Stem Cell Rep.* **1**, 110–117.
- Bassett, E.A., and Wallace, V.A. (2012). Cell fate determination in the vertebrate retina. *Trends Neurosci.* **35**, 565–573.
- Bassett, E.A., Williams, T., Zacharias, A.L., Gage, P.J., Fuhrmann, S., and West-Mays, J.A. (2010). AP-2alpha knockout mice exhibit optic cup patterning defects and failure of optic stalk morphogenesis. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 1791–1804.
- Batten, M.L., Imanishi, Y., Maeda, T., Tu, D.C., Moise, A.R., Bronson, D., Possin, D., Van Gelder, R.N., Baehr, W., and Palczewski, K. (2004). Lecithin-retinol acyltransferase is essential for accumulation of all-trans-retinyl esters in the eye and in the liver. *J. Biol. Chem.* **279**, 10422–10432.
- Bazan, N.G., Gordon, W.C., and Rodriguez de Turco, E.B. (1992). Docosahexaenoic acid uptake and metabolism in photoreceptors: retinal conservation by an efficient retinal pigment epithelial cell-mediated recycling process. *Adv. Exp. Med. Biol.* **318**, 295–306.
- Becerra, S.P., Fariss, R.N., Wu, Y.Q., Montuenga, L.M., Wong, P., and Pfeffer, B.A. (2004). Pigment epithelium-derived factor in the monkey retinal pigment epithelium and interphotoreceptor matrix: apical secretion and distribution. *Exp. Eye Res.* **78**, 223–234.
- Belliveau, M.J., and Cepko, C.L. (1999). Extrinsic and intrinsic factors control the genesis of amacrine and cone cells in the rat retina. *Dev. Camb. Engl.* **126**, 555–566.
- Belliveau, M.J., Young, T.L., and Cepko, C.L. (2000). Late retinal progenitor cells show intrinsic limitations in the production of cell types and the kinetics of opsin synthesis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **20**, 2247–2254.
- Ben M'Barek, K., Habeler, W., Plancheron, A., Jarraya, M., Regent, F., Terray, A., Yang, Y., Chatrousse, L., Domingues, S., Masson, Y., et al. (2017). Human ESC-derived retinal epithelial cell sheets potentiate rescue of photoreceptor cell loss in rats with retinal degeneration. *Sci. Transl. Med.* **9**.
- Ben-Yehudah, A., Malcov, M., Frumkin, T., and Ben-Yosef, D. (2012). Mutated human embryonic stem cells for the study of human genetic disorders. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **873**, 179–207.
- Bertario, L., Russo, A., Sala, P., Eboli, M., Giarola, M., D'amico, F., Gismondi, V., Varesco, L., Pierotti, M.A., Radice, P., et al. (2001). Genotype and phenotype factors as determinants of desmoid tumors in patients with familial adenomatous polyposis. *Int. J. Cancer* **95**, 102–107.

- Bertoni, G., Sassatelli, R., Tansini, P., Ricci, E., Conigliaro, R., and Bedogni, G. (1993). Jejunal polyps in familial adenomatous polyposis assessed by push-type endoscopy. *J. Clin. Gastroenterol.* *17*, 343–347, discussion 347-348.
- Bessant, D.A., Ali, R.R., and Bhattacharya, S.S. (2001). Molecular genetics and prospects for therapy of the inherited retinal dystrophies. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *11*, 307–316.
- Bhutani, K., Nazor, K.L., Williams, R., Tran, H., Dai, H., Džakula, Ž., Cho, E.H., Pang, A.W.C., Rao, M., Cao, H., et al. (2016). Whole-genome mutational burden analysis of three pluripotency induction methods. *Nat. Commun.* *7*, 10536.
- Bianchi, L.K., Burke, C.A., Bennett, A.E., Lopez, R., Hasson, H., and Church, J.M. (2008). Fundic gland polyp dysplasia is common in familial adenomatous polyposis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* *6*, 180–185.
- Bielen, H., and Houart, C. (2012). BMP signaling protects telencephalic fate by repressing eye identity and its Cxcr4-dependent morphogenesis. *Dev. Cell* *23*, 812–822.
- Blaug, S., Quinn, R., Quong, J., Jalickee, S., and Miller, S.S. (2003). Retinal pigment epithelial function: a role for CFTR? *Doc. Ophthalmol. Adv. Ophthalmol.* *106*, 43–50.
- Bodmer, W.F., Bailey, C.J., Bodmer, J., Bussey, H.J., Ellis, A., Gorman, P., Lucibello, F.C., Murday, V.A., Rider, S.H., and Scambler, P. (1987). Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature* *328*, 614–616.
- Boije, H., MacDonald, R.B., and Harris, W.A. (2014). Reconciling competence and transcriptional hierarchies with stochasticity in retinal lineages. *Curr. Opin. Neurobiol.* *27*, 68–74.
- Boulton, M.E. (2014). Studying melanin and lipofuscin in RPE cell culture models. *Exp. Eye Res.* *126*, 61–67.
- Boulton, M., and Dayhaw-Barker, P. (2001). The role of the retinal pigment epithelium: topographical variation and ageing changes. *Eye Lond. Engl.* *15*, 384–389.
- Bracht, K., Nicholls, A.M., Liu, Y., and Bodmer, W.F. (2010). 5-Fluorouracil response in a large panel of colorectal cancer cell lines is associated with mismatch repair deficiency. *Br. J. Cancer* *103*, 340–346.
- Bravo-Gil, N., Pozo, M.G., Martín-Sánchez, M., Méndez-Vidal, C., Rúa, E.R. la, Borrego, S., and Antiñolo, G. (2017). Unravelling the genetic basis of simplex Retinitis Pigmentosa cases. *Sci. Rep.* *7*, 41937.
- Breitsprecher, D., Jaiswal, R., Bombardier, J.P., Gould, C.J., Gelles, J., and Goode, B.L. (2012). Rocket launcher mechanism of collaborative actin assembly defined by single-molecule imaging. *Science* *336*, 1164–1168.
- Briggs, M.W., and Sacks, D.B. (2003). IQGAP proteins are integral components of cytoskeletal regulation. *EMBO Rep.* *4*, 571–574.
- Brocardo, M., Näthke, I.S., and Henderson, B.R. (2005). Redefining the subcellular location and transport of APC: new insights using a panel of antibodies. *EMBO Rep.* *6*, 184–190.

Brown, K.E., Keller, P.J., Ramialison, M., Rembold, M., Stelzer, E.H.K., Loosli, F., and Wittbrodt, J. (2010). Nlcam modulates midline convergence during anterior neural plate morphogenesis. *Dev. Biol.* 339, 14–25.

Buchholz, D.E., Hikita, S.T., Rowland, T.J., Friedrich, A.M., Hinman, C.R., Johnson, L.V., and Clegg, D.O. (2009). Derivation of functional retinal pigmented epithelium from induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* 27, 2427–2434.

Buchholz, D.E., Pennington, B.O., Croze, R.H., Hinman, C.R., Coffey, P.J., and Clegg, D.O. (2013). Rapid and efficient directed differentiation of human pluripotent stem cells into retinal pigmented epithelium. *Stem Cells Transl. Med.* 2, 384–393.

Burgoyne, T., O'Connor, M.N., Seabra, M.C., Cutler, D.F., and Futter, C.E. (2015). Regulation of melanosome number, shape and movement in the zebrafish retinal pigment epithelium by OA1 and PMEL. *J. Cell Sci.* 128, 1400–1407.

Burnight, E.R., Gupta, M., Wiley, L.A., Anfinson, K.R., Tran, A., Triboulet, R., Hoffmann, J.M., Klaahsen, D.L., Andorf, J.L., Jiao, C., et al. (2017). Using CRISPR-Cas9 to Generate Gene-Corrected Autologous iPSCs for the Treatment of Inherited Retinal Degeneration. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 25, 1999–2013.

Caberoy, N.B., Alvarado, G., Bigcas, J.-L., and Li, W. (2012). Galectin-3 is a new MerTK-specific eat-me signal. *J. Cell. Physiol.* 227, 401–407.

Cao, W., Wen, R., Li, F., Lavail, M.M., and Steinberg, R.H. (1997). Mechanical injury increases bFGF and CNTF mRNA expression in the mouse retina. *Exp. Eye Res.* 65, 241–248.

Carl, M., Loosli, F., and Wittbrodt, J. (2002). Six3 inactivation reveals its essential role for the formation and patterning of the vertebrate eye. *Dev. Camb. Engl.* 129, 4057–4063.

Carothers, A.M., Rizvi, H., Hasson, R.M., Heit, Y.I., Davids, J.S., Bertagnolli, M.M., and Cho, N.L. (2012). Mesenchymal stromal cell mutations and wound healing contribute to the etiology of desmoid tumors. *Cancer Res.* 72, 346–355.

Carpenter, A.C., Smith, A.N., Wagner, H., Cohen-Tayar, Y., Rao, S., Wallace, V., Ashery-Padan, R., and Lang, R.A. (2015). Wnt ligands from the embryonic surface ectoderm regulate “bimetallic strip” optic cup morphogenesis in mouse. *Dev. Camb. Engl.* 142, 972–982.

Carson, D.J., Santoro, I.M., and Groden, J. (2004). Isoforms of the APC tumor suppressor and their ability to inhibit cell growth and tumorigenicity. *Oncogene* 23, 7144–7148.

Caspari, R., Olschwang, S., Friedl, W., Mandl, M., Boisson, C., Böker, T., Augustin, A., Kadmon, M., Mösllein, G., and Thomas, G. (1995). Familial adenomatous polyposis: desmoid tumours and lack of ophthalmic lesions (CHRPE) associated with APC mutations beyond codon 1444. *Hum. Mol. Genet.* 4, 337–340.

Cepko, C. (2014). Intrinsically different retinal progenitor cells produce specific types of progeny. *Nat. Rev. Neurosci.* 15, 615–627.

Cepko, C.L., Austin, C.P., Yang, X., Alexiades, M., and Ezzeddine, D. (1996). Cell fate determination in the vertebrate retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 589–595.

Chao, J.R., Knight, K., Engel, A.L., Jankowski, C., Wang, Y., Manson, M.A., Gu, H., Djukovic, D., Raftery, D., Hurley, J.B., et al. (2017). Human retinal pigment epithelial cells prefer proline as a nutrient and transport metabolic intermediates to the retinal side. *J. Biol. Chem.* 292, 12895–12905.

Chase, H.B. (1944). Studies on an Anophthalmic Strain of Mice. IV. a Second Major Gene for Anophthalmia. *Genetics* 29, 264–269.

Chen, X., Guo, F., LeBlanc, M.E., Ding, Y., Zhang, C., Shakya, A., and Li, W. (2016). Mesd extrinsically promotes phagocytosis by retinal pigment epithelial cells. *Cell Biol. Toxicol.* 32, 347–358.

Chen, X.J., Xiao, W., Qu, X., and Zhou, S.Y. (2008). NS-398 enhances the efficacy of gemcitabine against lung adenocarcinoma through up-regulation of p21WAF1 and p27KIP1 protein. *Neoplasma* 55, 200–204.

Chhabra, A. (2017). Derivation of Human Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC) Lines and Mechanism of Pluripotency: Historical Perspective and Recent Advances. *Stem Cell Rev.* 13, 757–773.

Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K.E., Corden, J.L., Westphal, H., and Beachy, P.A. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383, 407–413.

Choi, J., Lee, S., Mallard, W., Clement, K., Tagliazucchi, G.M., Lim, H., Choi, I.Y., Ferrari, F., Tsankov, A.M., Pop, R., et al. (2015). A comparison of genetically matched cell lines reveals the equivalence of human iPSCs and ESCs. *Nat. Biotechnol.* 33, 1173–1181.

Choi, S.H., Estarás, C., Moresco, J.J., Yates, J.R., and Jones, K.A. (2013).  $\alpha$ -Catenin interacts with APC to regulate  $\beta$ -catenin proteolysis and transcriptional repression of Wnt target genes. *Genes Dev.* 27, 2473–2488.

Choudhary, P., Booth, H., Gutteridge, A., Surmacz, B., Louca, I., Steer, J., Kerby, J., and Whiting, P.J. (2017). Directing Differentiation of Pluripotent Stem Cells Toward Retinal Pigment Epithelium Lineage. *Stem Cells Transl. Med.* 6, 490–501.

Clevers, H. (2006). Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell* 127, 469–480.

Cockayne, E.A. (1927). Heredity in relation to cancer. *Cancer Rev.*

Cole, A.M., Ridgway, R.A., Derkits, S.E., Parry, L., Barker, N., Clevers, H., Clarke, A.R., and Sansom, O.J. (2010). p21 loss blocks senescence following Apc loss and provokes tumourigenesis in the renal but not the intestinal epithelium. *EMBO Mol. Med.* 2, 472–486.

Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P.D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L.A., et al. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339, 819–823.

Cornacchia, D., and Studer, L. (2017). Back and Forth in Time: Directing Age in iPSC-Derived Lineages. *Brain Res.* 1656, 14–26.

Crespo, M., Vilar, E., Tsai, S.-Y., Chang, K., Amin, S., Srinivasan, T., Zhang, T., Pipalia, N.H., Chen, H.J., Witherspoon, M., et al. (2017). Colonic organoids derived from human induced pluripotent stem cells for modeling colorectal cancer and drug testing. *Nat. Med.* 23, 878–884.

Cripps, W.H. (1882). Two Cases of Disseminated Polypus of the rectum. *Tr Path Soc Lond.* 165–168.

- da Cruz, L., Chen, F.K., Ahmado, A., Greenwood, J., and Coffey, P. (2007). RPE transplantation and its role in retinal disease. *Prog. Retin. Eye Res.* *26*, 598–635.
- da Cruz, L., Fynes, K., Georgiadis, O., Kerby, J., Luo, Y.H., Ahmado, A., Vernon, A., Daniels, J.T., Nommiste, B., Hasan, S.M., et al. (2018). Phase 1 clinical study of an embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium patch in age-related macular degeneration. *Nat. Biotechnol.* *36*, 328–337.
- Cueva, J.G., Haverkamp, S., Reimer, R.J., Edwards, R., Wässle, H., and Brecha, N.C. (2002). Vesicular gamma-aminobutyric acid transporter expression in amacrine and horizontal cells. *J. Comp. Neurol.* *445*, 227–237.
- Cui, D.H., Jiang, K.D., Jiang, S.D., Xu, Y.F., and Yao, H. (2005). The tumor suppressor adenomatous polyposis coli gene is associated with susceptibility to schizophrenia. *Mol. Psychiatry* *10*, 669–677.
- Curcio, C.A., Sloan, K.R., Kalina, R.E., and Hendrickson, A.E. (1990). Human photoreceptor topography. *J. Comp. Neurol.* *292*, 497–523.
- Czerniecki, S.M., Cruz, N.M., Harder, J.L., Menon, R., Annis, J., Otto, E.A., Gulieva, R.E., Islas, L.V., Kim, Y.K., Tran, L.M., et al. (2018). High-Throughput Screening Enhances Kidney Organoid Differentiation from Human Pluripotent Stem Cells and Enables Automated Multidimensional Phenotyping. *Cell Stem Cell* *22*, 929–940.e4.
- Danno, H., Michiue, T., Hitachi, K., Yukita, A., Ishiura, S., and Asashima, M. (2008). Molecular links among the causative genes for ocular malformation: Otx2 and Sox2 coregulate Rax expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 5408–5413.
- Davidson, K.C., Adams, A.M., Goodson, J.M., McDonald, C.E., Potter, J.C., Berndt, J.D., Biechele, T.L., Taylor, R.J., and Moon, R.T. (2012). Wnt/β-catenin signaling promotes differentiation, not self-renewal, of human embryonic stem cells and is repressed by Oct4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 4485–4490.
- Davies, M.L., Roberts, G.T., Stuart, N., and Wakeman, J.A. (2007). Analysis of a panel of antibodies to APC reveals consistent activity towards an unidentified protein. *Br. J. Cancer* *97*, 384–390.
- Day, C.L., and Alber, T. (2000). Crystal structure of the amino-terminal coiled-coil domain of the APC tumor suppressor. *J. Mol. Biol.* *301*, 147–156.
- D'Cruz, P.M., Yasumura, D., Weir, J., Matthes, M.T., Abderrahim, H., LaVail, M.M., and Vollrath, D. (2000). Mutation of the receptor tyrosine kinase gene Mertk in the retinal dystrophic RCS rat. *Hum. Mol. Genet.* *9*, 645–651.
- DE Marchis, M.L., Tonelli, F., Quaresmini, D., Lovero, D., Della-Morte, D., Silvestris, F., Guadagni, F., and Palmirotta, R. (2017). Desmoid Tumors in Familial Adenomatous Polyposis. *Anticancer Res.* *37*, 3357–3366.
- Del Bene, F., Wehman, A.M., Link, B.A., and Baier, H. (2008). Regulation of neurogenesis by interkinetic nuclear migration through an apical-basal Notch gradient. *Cell* *134*, 1055–1065.
- Deng, W.-L., Gao, M.-L., Lei, X.-L., Lv, J.-N., Zhao, H., He, K.-W., Xia, X.-X., Li, L.-Y., Chen, Y.-C., Li, Y.-P., et al. (2018). Gene Correction Reverses Ciliopathy and Photoreceptor Loss in iPSC-Derived Retinal Organoids from Retinitis Pigmentosa Patients. *Stem Cell Rep.* *10*, 1267–1281.

Devic, and Bussy (1912). Un cas de polyposis ade'nomateuse ge'ne' ralise'e a tout l'intestin. *Arch Mal l'App Dig* 1912; 20: 278–89. *Arch Mal L'Appar Dig* 278–289.

Dietrich, W.F., Lander, E.S., Smith, J.S., Moser, A.R., Gould, K.A., Luongo, C., Borenstein, N., and Dove, W. (1993). Genetic identification of Mom-1, a major modifier locus affecting Min-induced intestinal neoplasia in the mouse. *Cell* 75, 631–639.

Dikovskaya, D., Schiffmann, D., Newton, I.P., Oakley, A., Kroboth, K., Sansom, O., Jamieson, T.J., Meniel, V., Clarke, A., and Nähthke, I.S. (2007). Loss of APC induces polyploidy as a result of a combination of defects in mitosis and apoptosis. *J. Cell Biol.* 176, 183–195.

D'Mello, S.A.N., Finlay, G.J., Baguley, B.C., and Askarian-Amiri, M.E. (2016). Signaling Pathways in Melanogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 17.

Dontsov, A.E., Sakina, N.L., and Ostrovsky, M.A. (2017). Loss of Melanin by Eye Retinal Pigment Epithelium Cells Is Associated with Its Oxidative Destruction in Melanolipofuscin Granules. *Biochem. Biokhimiia* 82, 916–924.

Draviam, V.M., Shapiro, I., Aldridge, B., and Sorger, P.K. (2006). Misorientation and reduced stretching of aligned sister kinetochores promote chromosome missegregation in EB1- or APC-depleted cells. *EMBO J.* 25, 2814–2827.

Edelman, J.L., and Miller, S.S. (1991). Epinephrine stimulates fluid absorption across bovine retinal pigment epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 32, 3033–3040.

Edwards, A.O., Ritter, R., Abel, K.J., Manning, A., Panhuysen, C., and Farrer, L.A. (2005). Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science* 308, 421–424.

Eiraku, M., Takata, N., Ishibashi, H., Kawada, M., Sakakura, E., Okuda, S., Sekiguchi, K., Adachi, T., and Sasai, Y. (2011). Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature* 472, 51–56.

Eisinger, A.L., Nadauld, L.D., Shelton, D.N., Prescott, S.M., Stafforini, D.M., and Jones, D.A. (2007). Retinoic acid inhibits beta-catenin through suppression of Cox-2: a role for truncated adenomatous polyposis coli. *J. Biol. Chem.* 282, 29394–29400.

Elliott, J., Jolicoeur, C., Ramamurthy, V., and Cayouette, M. (2008). Ikaros confers early temporal competence to mouse retinal progenitor cells. *Neuron* 60, 26–39.

Ellis, M.F. (1994). Ocular manifestations of familial polyposis adenomatous coli. *Aust. N. Z. J. Ophthalmol.* 22, 215.

Eminli, S., Foudi, A., Stadtfeld, M., Maherli, N., Ahfeldt, T., Mostoslavsky, G., Hock, H., and Hochedlinger, K. (2009). Differentiation stage determines reprogramming potential of hematopoietic cells into iPS cells. *Nat. Genet.* 41, 968–976.

Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154–156.

Fagman, H., Larsson, F., Arvidsson, Y., Meuller, J., Nordling, M., Martinsson, T., Helmbrecht, K., Brabant, G., and Nilsson, M. (2003). Nuclear accumulation of full-length and truncated adenomatous polyposis coli protein in tumor cells depends on proliferation. *Oncogene* 22, 6013–6022.

- Farrokh-Siar, L., Rezai, K.A., Semnani, R.T., Patel, S.C., Ernest, J.T., and van Seventer, G.A. (1999). Human fetal retinal pigment epithelium suppresses the activation of CD4(+) and CD8(+) T-cells. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. Albrecht Von Graefes Arch. Klin. Exp. Ophthalmol.* 237, 934–939.
- Feng, B., Ng, J.-H., Heng, J.-C.D., and Ng, H.-H. (2009). Molecules that promote or enhance reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 4, 301–312.
- Fevr, T., Robine, S., Louvard, D., and Huelsken, J. (2007). Wnt/beta-catenin is essential for intestinal homeostasis and maintenance of intestinal stem cells. *Mol. Cell. Biol.* 27, 7551–7559.
- Field, G.D., and Chichilnisky, E.J. (2007). Information processing in the primate retina: circuitry and coding. *Annu. Rev. Neurosci.* 30, 1–30.
- Finnemann, S.C. (2003). Focal adhesion kinase signaling promotes phagocytosis of integrin-bound photoreceptors. *EMBO J.* 22, 4143–4154.
- Finnemann, S.C., and Silverstein, R.L. (2001). Differential Roles of CD36 and  $\alpha\beta 5$  Integrin in Photoreceptor Phagocytosis by the Retinal Pigment Epithelium. *J. Exp. Med.* 194, 1289–1298.
- Finnemann, S.C., Bonilha, V.L., Marmorstein, A.D., and Rodriguez-Boulan, E. (1997). Phagocytosis of rod outer segments by retinal pigment epithelial cells requires  $\alpha\beta 5$  integrin for binding but not for internalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 12932–12937.
- Fodde, R., and Smits, R. (2001). Disease model: familial adenomatous polyposis. *Trends Mol. Med.* 7, 369–373.
- Fodde, R., Kuipers, J., Rosenberg, C., Smits, R., Kielman, M., Gaspar, C., van Es, J.H., Breukel, C., Wiegant, J., Giles, R.H., et al. (2001). Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat. Cell Biol.* 3, 433–438.
- Fu, Y. (2010). Phototransduction in Rods and Cones. In *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*, H. Kolb, E. Fernandez, and R. Nelson, eds. (Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center), p.
- Fuhrmann, S. (2010). Eye morphogenesis and patterning of the optic vesicle. *Curr. Top. Dev. Biol.* 93, 61–84.
- Fuhrmann, S., Levine, E.M., and Reh, T.A. (2000). Extraocular mesenchyme patterns the optic vesicle during early eye development in the embryonic chick. *Dev. Camb. Engl.* 127, 4599–4609.
- Fujii, M., Shimokawa, M., Date, S., Takano, A., Matano, M., Nanki, K., Ohta, Y., Toshimitsu, K., Nakazato, Y., Kawasaki, K., et al. (2016). A Colorectal Tumor Organoid Library Demonstrates Progressive Loss of Niche Factor Requirements during Tumorigenesis. *Cell Stem Cell* 18, 827–838.
- Fujimura, N. (2016). WNT/ $\beta$ -Catenin Signaling in Vertebrate Eye Development. *Front. Cell Dev. Biol.* 4, 138.
- Furuuchi, K., Tada, M., Yamada, H., Kataoka, A., Furuuchi, N., Hamada, J., Takahashi, M., Todo, S., and Moriuchi, T. (2000). Somatic mutations of the APC gene in primary breast cancers. *Am. J. Pathol.* 156, 1997–2005.

Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., and Hasegawa, M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* *85*, 348–362.

Gagliardi, G., Ben M'Barek, K., Chaffiol, A., Slembrouck-Brec, A., Conart, J.-B., Nanteau, C., Rabesandratana, O., Sahel, J.-A., Duebel, J., Orieux, G., et al. (2018). Characterization and Transplantation of CD73-Positive Photoreceptors Isolated from Human iPSC-Derived Retinal Organoids. *Stem Cell Rep.*

Gal, A., Li, Y., Thompson, D.A., Weir, J., Orth, U., Jacobson, S.G., Apfelstedt-Sylla, E., and Vollrath, D. (2000). Mutations in *MERTK*, the human orthologue of the RCS rat retinal dystrophy gene, cause retinitis pigmentosa. *Nat. Genet.* *26*, 270.

Galea, M.A., Eleftheriou, A., and Henderson, B.R. (2001). ARM domain-dependent nuclear import of adenomatous polyposis coli protein is stimulated by the B56 alpha subunit of protein phosphatase 2A. *J. Biol. Chem.* *276*, 45833–45839.

Garber, K. (2015). RIKEN suspends first clinical trial involving induced pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* *33*, 890–891.

Gardner, E.J. (1951). A genetic and clinical study of intestinal polyposis, a predisposing factor for carcinoma of the colon and rectum. *Am. J. Hum. Genet.* *3*, 167–176.

Gaspar, C., Franken, P., Molenaar, L., Breukel, C., van der Valk, M., Smits, R., and Fodde, R. (2009). A targeted constitutive mutation in the APC tumor suppressor gene underlies mammary but not intestinal tumorigenesis. *PLoS Genet.* *5*, e1000547.

Geng, X., Speirs, C., Lagutin, O., Inbal, A., Liu, W., Solnica-Krezel, L., Jeong, Y., Epstein, D.J., and Oliver, G. (2008). Haploinsufficiency of Six3 fails to activate Sonic hedgehog expression in the ventral forebrain and causes holoprosencephaly. *Dev. Cell* *15*, 236–247.

Ghanbari-Azarnier, R., Sato, S., Wei, Q., Al-Jazrawe, M., and Alman, B.A. (2013). Targeting Stem Cell Behavior in Desmoid Tumors (Aggressive Fibromatosis) by Inhibiting Hedgehog Signaling. *Neoplasia N. Y. N* *15*, 712–719.

Gomes, F.L.A.F., Zhang, G., Carbonell, F., Correa, J.A., Harris, W.A., Simons, B.D., and Cayouette, M. (2011). Reconstruction of rat retinal progenitor cell lineages in vitro reveals a surprising degree of stochasticity in cell fate decisions. *Dev. Camb. Engl.* *138*, 227–235.

Gore, A., Li, Z., Fung, H.-L., Young, J.E., Agarwal, S., Antosiewicz-Bourget, J., Canto, I., Giorgetti, A., Israel, M.A., Kiskinis, E., et al. (2011). Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature* *471*, 63–67.

Gornalusse, G.G., Hirata, R.K., Funk, S.E., Riolobos, L., Lopes, V.S., Manske, G., Prunkard, D., Colunga, A.G., Hanafi, L.-A., Clegg, D.O., et al. (2017). HLA-E-expressing pluripotent stem cells escape allogeneic responses and lysis by NK cells. *Nat. Biotechnol.* *35*, 765–772.

Graw, J. (2010). Eye development. *Curr. Top. Dev. Biol.* *90*, 343–386.

Green, R.A., and Kaplan, K.B. (2003). Chromosome instability in colorectal tumor cells is associated with defects in microtubule plus-end attachments caused by a dominant mutation in APC. *J. Cell Biol.* *163*, 949–961.

- Green, R.A., Wollman, R., and Kaplan, K.B. (2005). APC and EB1 Function Together in Mitosis to Regulate Spindle Dynamics and Chromosome Alignment. *Mol. Biol. Cell* **16**, 4609–4622.
- Groden, J., Thliveris, A., Samowitz, W., Carlson, M., Gelbert, L., Albertsen, H., Joslyn, G., Stevens, J., Spirio, L., and Robertson, M. (1991). Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* **66**, 589–600.
- Groen, E.J., Roos, A., Muntinghe, F.L., Enting, R.H., de Vries, J., Kleibeuker, J.H., Witjes, M.J.H., Links, T.P., and van Beek, A.P. (2008). Extra-Intestinal Manifestations of Familial Adenomatous Polyposis. *Ann. Surg. Oncol.* **15**, 2439–2450.
- Groves, C.J., Saunders, B.P., Spigelman, A.D., and Phillips, R.K.S. (2002). Duodenal cancer in patients with familial adenomatous polyposis (FAP): results of a 10 year prospective study. *Gut* **50**, 636–641.
- Guenther, M.G., Frampton, G.M., Soldner, F., Hockemeyer, D., Mitalipova, M., Jaenisch, R., and Young, R.A. (2010). Chromatin Structure and Gene Expression Programs of Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* **7**, 249–257.
- Gundersen, D., Orlowski, J., and Rodriguez-Boulan, E. (1991). Apical polarity of Na,K-ATPase in retinal pigment epithelium is linked to a reversal of the ankyrin-fodrin submembrane cytoskeleton. *J. Cell Biol.* **112**, 863–872.
- Guo, F., Ding, Y., Caberoy, N., Alvarado, G., Wang, F., Chen, R., and Li, W. (2015). ABCF1 extrinsically regulates retinal pigment epithelial cell phagocytosis. *Mol. Biol. Cell* **26**, 2311–2320.
- Gurdon, J.B. (1962). The Developmental Capacity of Nuclei taken from Intestinal Epithelium Cells of Feeding Tadpoles. *Development* **10**, 622–640.
- Hadjihannas, M.V., Brückner, M., Jerchow, B., Birchmeier, W., Dietmaier, W., and Behrens, J. (2006). Aberrant Wnt/beta-catenin signaling can induce chromosomal instability in colon cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 10747–10752.
- Halberg, R.B., Waggoner, J., Rasmussen, K., White, A., Clipson, L., Prunuske, A.J., Bacher, J.W., Sullivan, R., Washington, M.K., Pitot, H.C., et al. (2009). Long-lived Min mice develop advanced intestinal cancers through a genetically conservative pathway. *Cancer Res.* **69**, 5768–5775.
- Halder, G., Callaerts, P., and Gehring, W.J. (1995). Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in *Drosophila*. *Science* **267**, 1788–1792.
- Half, E., Bercovich, D., and Rozen, P. (2009). Familial adenomatous polyposis. *Orphanet J. Rare Dis.* **4**, 22.
- Hamann, M.J., Lubking, C.M., Luchini, D.N., and Billadeau, D.D. (2007). Asef2 functions as a Cdc42 exchange factor and is stimulated by the release of an autoinhibitory module from a concealed C-terminal activation element. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 1380–1393.
- Hamann, S., Kjilgaard, J.F., la Cour, M., Prause, J.U., and Zeuthen, T. (2003). Cotransport of H<sup>+</sup>, lactate, and H<sub>2</sub>O in porcine retinal pigment epithelial cells. *Exp. Eye Res.* **76**, 493–504.
- Hankey, W., Frankel, W.L., and Groden, J. (2018). Functions of the APC tumor suppressor protein dependent and independent of canonical WNT signaling: Implications for therapeutic targeting. *Cancer Metastasis Rev.* **37**, 159–172.

- Harada, N., Tamai, Y., Ishikawa, T., Sauer, B., Takaku, K., Oshima, M., and Taketo, M.M. (1999). Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the beta-catenin gene. *EMBO J.* **18**, 5931–5942.
- Hartzell, H.C., Qu, Z., Yu, K., Xiao, Q., and Chien, L.-T. (2008). Molecular physiology of bestrophins: multifunctional membrane proteins linked to best disease and other retinopathies. *Physiol. Rev.* **88**, 639–672.
- He, J., Zhang, G., Almeida, A.D., Cayouette, M., Simons, B.D., and Harris, W.A. (2012). How variable clones build an invariant retina. *Neuron* **75**, 786–798.
- Heavner, W., and Pevny, L. (2012). Eye Development and Retinogenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**.
- Heisenberg, C.P., Houart, C., Take-Uchi, M., Rauch, G.J., Young, N., Coutinho, P., Masai, I., Caneparo, L., Concha, M.L., Geisler, R., et al. (2001). A mutation in the Gsk3-binding domain of zebrafish Masterblind/Axin1 leads to a fate transformation of telencephalon and eyes to diencephalon. *Genes Dev.* **15**, 1427–1434.
- Hennessy, M.P., Collins, F., and Coroneo, M.T. (1993). The distinction between multiple retinal pigment epithelial hamartomata (MRPEH) in familial adenomatous polyposis (FAP) and congenital hypertrophy of the retinal pigment epithelium (CHRPE). *Aust. N. Z. J. Ophthalmol.* **21**, 275–276.
- Herrera, L., Kakati, S., Gibas, L., Pietrzak, E., and Sandberg, A.A. (1986). Gardner syndrome in a man with an interstitial deletion of 5q. *Am. J. Med. Genet.* **25**, 473–476.
- Hildebrand, G., and R. Fielder, A. (2011). Anatomy and Physiology of the Retina. In *Pediatric Retina*, pp. 39–65.
- Hill, R.E., Favor, J., Hogan, B.L., Ton, C.C., Saunders, G.F., Hanson, I.M., Prosser, J., Jordan, T., Hastie, N.D., and van Heyningen, V. (1992). Mouse Small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature* **355**, 750.
- Homayouni, M. (2009). Vascular Endothelial Growth Factors and Their Inhibitors in Ocular Neovascular Disorders. *J. Ophthalmic Vis. Res.* **4**, 105–114.
- Horsford, D.J., Nguyen, M.-T.T., Sellar, G.C., Kothary, R., Arnheiter, H., and McInnes, R.R. (2005). Chx10 repression of Mitf is required for the maintenance of mammalian neuroretinal identity. *Dev. Camb. Engl.* **132**, 177–187.
- Hou, P., Li, Y., Zhang, X., Liu, C., Guan, J., Li, H., Zhao, T., Ye, J., Yang, W., Liu, K., et al. (2013). Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science* **341**, 651–654.
- Hourd, P., Chandra, A., Alvey, D., Ginty, P., McCall, M., Ratcliffe, E., Rayment, E., and Williams, D.J. (2014). Qualification of academic facilities for small-scale automated manufacture of autologous cell-based products. *Regen. Med.* **9**, 799–815.
- Hu, B., Guo, Y., Chen, C., Li, Q., Niu, X., Guo, S.-C., Zhang, A., Wang, Y., and Deng, Z. (2014). Repression of SIRT1 Promotes the Differentiation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells into Neural Stem Cells. *Cell. Mol. Neurobiol.* **34**.

- Hughes, B.A., and Takahira, M. (1996). Inwardly rectifying K<sup>+</sup> currents in isolated human retinal pigment epithelial cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37, 1125–1139.
- Hughes, B.A., Miller, S.S., and Machen, T.E. (1984). Effects of cyclic AMP on fluid absorption and ion transport across frog retinal pigment epithelium. Measurements in the open-circuit state. *J. Gen. Physiol.* 83, 875–899.
- Hussein, S.M., Batada, N.N., Vuoristo, S., Ching, R.W., Autio, R., Närvä, E., Ng, S., Sourour, M., Hämäläinen, R., Olsson, C., et al. (2011). Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature* 471, 58–62.
- Idelson, M., Alper, R., Obolensky, A., Ben-Shushan, E., Hemo, I., Yachimovich-Cohen, N., Khaner, H., Smith, Y., Wiser, O., Gropp, M., et al. (2009). Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional retinal pigment epithelium cells. *Cell Stem Cell* 5, 396–408.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., and Nakata, A. (1987). Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.* 169, 5429–5433.
- Ishino, Y., Krupovic, M., and Forterre, P. (2018). History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology. *J. Bacteriol.* 200.
- Iwasaki, Y., Sugita, S., Mandai, M., Yonemura, S., Onishi, A., Ito, S.-I., Mochizuki, M., Ohno-Matsui, K., and Takahashi, M. (2016). Differentiation/Purification Protocol for Retinal Pigment Epithelium from Mouse Induced Pluripotent Stem Cells as a Research Tool. *PLoS One* 11, e0158282.
- Jaiswal, A.S., and Narayan, S. (2008). A novel function of adenomatous polyposis coli (APC) in regulating DNA repair. *Cancer Lett.* 271, 272–280.
- Jellali, A., Stussi-Garaud, C., Gasnier, B., Rendon, A., Sahel, J.-A., Dreyfus, H., and Picaud, S. (2002). Cellular localization of the vesicular inhibitory amino acid transporter in the mouse and human retina. *J. Comp. Neurol.* 449, 76–87.
- Jette, C., Peterson, P.W., Sandoval, I.T., Manos, E.J., Hadley, E., Ireland, C.M., and Jones, D.A. (2004). The tumor suppressor adenomatous polyposis coli and caudal related homeodomain protein regulate expression of retinol dehydrogenase L. *J. Biol. Chem.* 279, 34397–34405.
- Jiang, H., Deng, R., Yang, X., Shang, J., Lu, S., Zhao, Y., Song, K., Liu, X., Zhang, Q., Chen, Y., et al. (2017). Peptidomimetic inhibitors of APC-Asef interaction block colorectal cancer migration. *Nat. Chem. Biol.* 13, 994–1001.
- Jimbo, T., Kawasaki, Y., Koyama, R., Sato, R., Takada, S., Haraguchi, K., and Akiyama, T. (2002). Identification of a link between the tumour suppressor APC and the kinesin superfamily. *Nat. Cell Biol.* 4, 323–327.
- Jin, M., Li, S., Moghrabi, W.N., Sun, H., and Travis, G.H. (2005). Rpe65 is the retinoid isomerase in bovine retinal pigment epithelium. *Cell* 122, 449–459.
- Jin, Z., Tamura, G., Tsuchiya, T., Sakata, K., Kashiwaba, M., Osakabe, M., and Motoyama, T. (2001). Adenomatous polyposis coli (APC) gene promoter hypermethylation in primary breast cancers. *Br. J. Cancer* 85, 69–73.

- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**, 816–821.
- Joslyn, G., Richardson, D.S., White, R., and Alber, T. (1993). Dimer formation by an N-terminal coiled coil in the APC protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 11109–11113.
- Juanes, M.A., Bouguenina, H., Eskin, J.A., Jaiswal, R., Badache, A., and Goode, B.L. (2017). Adenomatous polyposis coli nucleates actin assembly to drive cell migration and microtubule-induced focal adhesion turnover. *J. Cell Biol.* **216**, 2859–2875.
- Jung, Y.-S., Qian, Y., and Chen, X. (2010). Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity. *Cell. Signal.* **22**, 1003–1012.
- Kanth, P., Grimmett, J., Champine, M., Burt, R., and Samadder, N.J. (2017). Hereditary Colorectal Polyposis and Cancer Syndromes: A Primer on Diagnosis and Management. *Am. J. Gastroenterol.* **112**, 1509–1525.
- Kaplan, K.B., Burds, A.A., Swedlow, J.R., Bekir, S.S., Sorger, P.K., and Näthke, I.S. (2001). A role for the Adenomatous Polyposis Coli protein in chromosome segregation. *Nat. Cell Biol.* **3**, 429–432.
- Kashani, A.H., Lebkowski, J.S., Rahhal, F.M., Avery, R.L., Salehi-Had, H., Dang, W., Lin, C.-M., Mitra, D., Zhu, D., Thomas, B.B., et al. (2018). A bioengineered retinal pigment epithelial monolayer for advanced, dry age-related macular degeneration. *Sci. Transl. Med.* **10**, eaao4097.
- Kasner, L., Traboulsi, E.I., Delacruz, Z., and Green, W.R. (1992). A histopathologic study of the pigmented fundus lesions in familial adenomatous polyposis. *Retina Phila. Pa* **12**, 35–42.
- Kawamura, K., Chen, Y., Shu, Y., Cheng, Y., Qiao, J., Behr, B., Pera, R.A.R., and Hsueh, A.J.W. (2012). Promotion of human early embryonic development and blastocyst outgrowth in vitro using autocrine/paracrine growth factors. *PLoS One* **7**, e49328.
- Kawasaki, Y., Senda, T., Ishidate, T., Koyama, R., Morishita, T., Iwayama, Y., Higuchi, O., and Akiyama, T. (2000). Asef, a link between the tumor suppressor APC and G-protein signaling. *Science* **289**, 1194–1197.
- Kawasaki, Y., Sato, R., and Akiyama, T. (2003). Mutated APC and Asef are involved in the migration of colorectal tumour cells. *Nat. Cell Biol.* **5**, 211–215.
- Kay, P., Yang, Y.C., and Paraoan, L. (2013). Directional protein secretion by the retinal pigment epithelium: roles in retinal health and the development of age-related macular degeneration. *J. Cell. Mol. Med.* **17**, 833–843.
- Khan, N., Lipsa, A., Arunachal, G., Ramadwar, M., and Sarin, R. (2017). Novel mutations and phenotypic associations identified through APC, MUTYH, NTHL1, POLD1, POLE gene analysis in Indian Familial Adenomatous Polyposis cohort. *Sci. Rep.* **7**, 2214.
- Kim, B.S., Lee, C.-H., Chang, G.-E., Cheong, E., and Shin, I. (2016). A potent and selective small molecule inhibitor of sirtuin 1 promotes differentiation of pluripotent P19 cells into functional neurons. *Sci. Rep.* **6**, 34324.

Kim, C.-H., Oda, T., Itoh, M., Jiang, D., Bruk Artinger, K., Chandrasekharappa, S.C., Driever, W., and Chitnis, A.B. (2000). Repressor activity of Headless/Tcf3 is essential for vertebrate head formation. *Nature* *407*, 913–916.

Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., Kim, J., Aryee, M.J., Ji, H., Ehrlich, L.I.R., et al. (2010). Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* *467*, 285–290.

Kim, K., Zhao, R., Doi, A., Ng, K., Unternaehrer, J., Cahan, P., Huo, 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. *Nat. Biotechnol.* *29*, 1117–1119.

Kim, S.B., Zhang, L., Yoon, J., Lee, J., Min, J., Li, W., Grishin, N.V., Moon, Y.-A., Wright, W.E., and Shay, J.W. (2018). Truncated Adenomatous Polyposis Coli Mutation Induces Asef-Activated Golgi Fragmentation. *Mol. Cell. Biol.* *38*.

Klimanskaya, I., Hipp, J., Rezai, K.A., West, M., Atala, A., and Lanza, R. (2004). Derivation and comparative assessment of retinal pigment epithelium from human embryonic stem cells using transcriptomics. *Cloning Stem Cells* *6*, 217–245.

Kolb, H. (2007). Inner Plexiform Layer. In *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*, H. Kolb, E. Fernandez, and R. Nelson, eds. (Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center), p.

Kolb, H. (2009). Neurotransmitters in the Retina. In *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*, H. Kolb, E. Fernandez, and R. Nelson, eds. (Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center), p.

Kolb, H., Mariani, A., and Gallego, A. (1980). A second type of horizontal cell in the monkey retina. *J. Comp. Neurol.* *189*, 31–44.

Kolb, H., Fernandez, E., Schouten, J., Ahnelt, P., Linberg, K.A., and Fisher, S.K. (1994). Are there three types of horizontal cell in the human retina? *J. Comp. Neurol.* *343*, 370–386.

Konagaya, S., Ando, T., Yamauchi, T., Suemori, H., and Iwata, H. (2015). Long-term maintenance of human induced pluripotent stem cells by automated cell culture system. *Sci. Rep.* *5*, 16647.

Koonin, E.V., Makarova, K.S., and Zhang, F. (2017). Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr. Opin. Microbiol.* *37*, 67–78.

Kroboth, K., Newton, I.P., Kita, K., Dikovskaya, D., Zumbrunn, J., Waterman-Storer, C.M., and Näthke, I.S. (2007). Lack of Adenomatous Polyposis Coli Protein Correlates with a Decrease in Cell Migration and Overall Changes in Microtubule Stability. *Mol. Biol. Cell* *18*, 910–918.

Kruczek, K., Gonzalez-Cordero, A., Goh, D., Naeem, A., Jonikas, M., Blackford, S.J.I., Kloc, M., Duran, Y., Georgiadis, A., Sampson, R.D., et al. (2017). Differentiation and Transplantation of Embryonic Stem Cell-Derived Cone Photoreceptors into a Mouse Model of End-Stage Retinal Degeneration. *Stem Cell Rep.* *8*, 1659–1674.

Kuraguchi, M., Wang, X.-P., Bronson, R.T., Rothenberg, R., Ohene-Baah, N.Y., Lund, J.J., Kucherlapati, M., Maas, R.L., and Kucherlapati, R. (2006). Adenomatous Polyposis Coli (APC) Is Required for Normal Development of Skin and Thymus. *PLOS Genet.* *2*, e146.

Kwong, L.N., Shedlovsky, A., Biehl, B.S., Clipson, L., Pasch, C.A., and Dove, W.F. (2007). Identification of Mom7, a novel modifier of Apc(Min<sup>+/</sup>) on mouse chromosome 18. *Genetics* **176**, 1237–1244.

Lagutin, O.V., Zhu, C.C., Kobayashi, D., Topczewski, J., Shimamura, K., Puelles, L., Russell, H.R.C., McKinnon, P.J., Solnica-Krezel, L., and Oliver, G. (2003). Six3 repression of Wnt signaling in the anterior neuroectoderm is essential for vertebrate forebrain development. *Genes Dev.* **17**, 368–379.

Lakowski, J., Welby, E., Budinger, D., Di Marco, F., Di Foggia, V., Bainbridge, J.W.B., Wallace, K., Gamm, D.M., Ali, R.R., and Sowden, J.C. (2018). Isolation of Human Photoreceptor Precursors via a Cell Surface Marker Panel from Stem Cell-Derived Retinal Organoids and Fetal Retinae. *Stem Cells Dayt. Ohio* **36**, 709–722.

Lamb, T.D., Collin, S.P., and Pugh, E.N. (2007). Evolution of the vertebrate eye: opsins, photoreceptors, retina and eye cup. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 960–976.

Lamba, D.A., Karl, M.O., Ware, C.B., and Reh, T.A. (2006). Efficient generation of retinal progenitor cells from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 12769–12774.

Lamba, D.A., McUsic, A., Hirata, R.K., Wang, P.-R., Russell, D., and Reh, T.A. (2010). Generation, Purification and Transplantation of Photoreceptors Derived from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *PLoS ONE* **5**.

Lane, A., Philip, L.R., Ruban, L., Fynes, K., Smart, M., Carr, A., Mason, C., and Coffey, P. (2014). Engineering efficient retinal pigment epithelium differentiation from human pluripotent stem cells. *Stem Cells Transl. Med.* **3**, 1295–1304.

Leach, L.L., and Clegg, D.O. Concise Review: Making Stem Cells Retinal: Methods for Deriving Retinal Pigment Epithelium and Implications for Patients With Ocular Disease. *STEM CELLS* **33**, 2363–2373.

Leach, L.L., Buchholz, D.E., Nadar, V.P., Lowenstein, S.E., and Clegg, D.O. (2015). Canonical/β-catenin Wnt pathway activation improves retinal pigmented epithelium derivation from human embryonic stem cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **56**, 1002–1013.

Lefort, N., Feyeux, M., Bas, C., Féraud, O., Bennaceur-Griscelli, A., Tachdjian, G., Peschanski, M., and Perrier, A.L. (2008). Human embryonic stem cells reveal recurrent genomic instability at 20q11.21. *Nat. Biotechnol.* **26**, 1364–1366.

Leoz, M.L., Carballal, S., Moreira, L., Ocaña, T., and Balaguer, F. (2015). The genetic basis of familial adenomatous polyposis and its implications for clinical practice and risk management. *Appl. Clin. Genet.* **8**, 95–107.

Leppert, M., Dobbs, M., Scambler, P., O'Connell, P., Nakamura, Y., Stauffer, D., Woodward, S., Burt, R., Hughes, J., and Gardner, E. (1987). The gene for familial polyposis coli maps to the long arm of chromosome 5. *Science* **238**, 1411–1413.

Li, H., Tierney, C., Wen, L., Wu, J.Y., and Rao, Y. (1997). A single morphogenetic field gives rise to two retina primordia under the influence of the prechordal plate. *Dev. Camb. Engl.* **124**, 603–615.

Li, Z., Kroboth, K., Newton, I.P., and Nähk, I.S. (2008). Novel self-association of the APC molecule affects APC clusters and cell migration. *J. Cell Sci.* **121**, 1916–1925.

Lidgerwood, G.E., Lim, S.Y., Crombie, D.E., Ali, R., Gill, K.P., Hernández, D., Kie, J., Conquest, A., Waugh, H.S., Wong, R.C.B., et al. (2016). Defined Medium Conditions for the Induction and Expansion of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium. *Stem Cell Rev.* *12*, 179–188.

Lillien, L. (1995). Changes in retinal cell fate induced by overexpression of EGF receptor. *Nature* *377*, 158–162.

Lillien, L., and Cepko, C. (1992). Control of proliferation in the retina: temporal changes in responsiveness to FGF and TGF alpha. *Dev. Camb. Engl.* *115*, 253–266.

Liou, G.I., Samuel, S., Matragoon, S., Goss, K.H., Santoro, I., Groden, J., Hunt, R.C., Wang, F., Miller, S.S., Caldwell, R.B., et al. (2004). Alternative splicing of the APC gene in the neural retina and retinal pigment epithelium. *Mol. Vis.* *10*, 383–391.

Liu, D.J., Hammer, D., Komlos, D., Chen, K.Y., Firestein, B.L., and Liu, A.Y.-C. (2014). SIRT1 knockdown promotes neural differentiation and attenuates the heat shock response. *J. Cell. Physiol.* *229*, 1224–1235.

Liu, I.S., Chen, J.D., Ploder, L., Vidgen, D., van der Kooy, D., Kalnins, V.I., and McInnes, R.R. (1994). Developmental expression of a novel murine homeobox gene (Chx10): evidence for roles in determination of the neuroretina and inner nuclear layer. *Neuron* *13*, 377–393.

Loosli, F., Winkler, S., and Wittbrodt, J. (1999). Six3 overexpression initiates the formation of ectopic retina. *Genes Dev.* *13*, 649–654.

Lu, P., Chen, J., He, L., Ren, J., Chen, H., Rao, L., Zhuang, Q., Li, H., Li, L., Bao, L., et al. (2013). Generating Hypoimmunogenic Human Embryonic Stem Cells by the Disruption of Beta 2-Microglobulin. *Stem Cell Rev. Rep.* *9*, 806–813.

van der Luijt, R.B., Vasen, H.F., Tops, C.M., Breukel, C., Fodde, R., and Meera Khan, P. (1995). APC mutation in the alternatively spliced region of exon 9 associated with late onset familial adenomatous polyposis. *Hum. Genet.* *96*, 705–710.

Lund, R.J., Nikula, T., Rahkonen, N., Närvä, E., Baker, D., Harrison, N., Andrews, P., Otonkoski, T., and Lahesmaa, R. (2012). High-throughput karyotyping of human pluripotent stem cells. *Stem Cell Res.* *9*, 192–195.

Ly, A., Nivison-Smith, L., Hennessy, M., and Kalloniatis, M. (2015). Pigmented Lesions of the Retinal Pigment Epithelium. *Optom. Vis. Sci.* *92*, 844.

Lynch, H.T., Smyrk, T., McGinn, T., Lanspa, S., Cavalieri, J., Lynch, J., Slominski-Castor, S., Cayouette, M.C., Priluck, I., and Luce, M.C. (1995). Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP). A phenotypically and genotypically distinctive variant of FAP. *Cancer* *76*, 2427–2433.

M Ward, J., Sporn, M., L Wenk, M., M Smith, J., Feeser, D., and J Dean, R. (1978). Dose response to intrarectal administration of N-methyl-N-nitrosourea and histopathologic evaluation of the effect of two retinoids on colon lesions induced in rats. *J. Natl. Cancer Inst.* *60*, 1489–1493.

Ma, X., Kong, L., and Zhu, S. (2017). Reprogramming cell fates by small molecules. *Protein Cell* *8*, 328–348.

MacDonald, B.T., Tamai, K., and He, X. (2009). Wnt/β-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev. Cell* *17*, 9–26.

MacNeil, M.A., and Masland, R.H. (1998). Extreme Diversity among Amacrine Cells: Implications for Function. *Neuron* **20**, 971–982.

MacNeil, M.A., Heussy, J.K., Dacheux, R.F., Raviola, E., and Masland, R.H. (1999). The shapes and numbers of amacrine cells: matching of photofilled with Golgi-stained cells in the rabbit retina and comparison with other mammalian species. *J. Comp. Neurol.* **413**, 305–326.

Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., DiCarlo, J.E., Norville, J.E., and Church, G.M. (2013). RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* **339**, 823–826.

Mandai, M., Watanabe, A., Kurimoto, Y., Hirami, Y., Morinaga, C., Daimon, T., Fujihara, M., Akimaru, H., Sakai, N., Shibata, Y., et al. (2017a). Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N. Engl. J. Med.* **376**, 1038–1046.

Mandai, M., Fujii, M., Hashiguchi, T., Sunagawa, G.A., Ito, S., Sun, J., Kaneko, J., Sho, J., Yamada, C., and Takahashi, M. (2017b). iPSC-Derived Retina Transplants Improve Vision in rd1 End-Stage Retinal-Degeneration Mice. *Stem Cell Rep.* **8**, 69–83.

Marc, R. (2008). Functional Anatomy of the Neural Retina.

Marcus, D.M., Rustgi, A.K., Defoe, D., Brooks, S.E., McCormick, R.S., Thompson, T.P., Edelmann, W., Kucherlapati, R., and Smith, S. (1997). Retinal pigment epithelium abnormalities in mice with adenomatous polyposis coli gene disruption. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill* **115**, 645–650.

Marcus, D.M., Rustgi, A.K., Defoe, D., Kucherlapati, R., Edelmann, W., Hamasaki, D., Liou, G.I., and Smith, S.B. (2000). Ultrastructural and ERG findings in mice with adenomatous polyposis coli gene disruption. *Mol. Vis.* **6**, 169–177.

Marshall, T.W., Lloyd, I.E., Delalande, J.M., Näthke, I., and Rosenblatt, J. (2011). The tumor suppressor adenomatous polyposis coli controls the direction in which a cell extrudes from an epithelium. *Mol. Biol. Cell* **22**, 3962–3970.

Martí, M., Mulero, L., Pardo, C., Morera, C., Carrió, M., Laricchia-Robbio, L., Esteban, C.R., and Izpisua Belmonte, J.C. (2013). Characterization of pluripotent stem cells. *Nat. Protoc.* **8**, 223–253.

Martins, R.A.P., and Pearson, R.A. (2008). Control of cell proliferation by neurotransmitters in the developing vertebrate retina. *Brain Res.* **1192**, 37–60.

Maruotti, J., Sripathi, S.R., Bharti, K., Fuller, J., Wahlin, K.J., Ranganathan, V., Sluch, V.M., Berlinicke, C.A., Davis, J., Kim, C., et al. (2015). Small-molecule-directed, efficient generation of retinal pigment epithelium from human pluripotent stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 10950–10955.

Masland, R.H. (2001). Neuronal diversity in the retina. *Curr. Opin. Neurobiol.* **11**, 431–436.

Masland, R.H. (2012). The neuronal organization of the retina. *Neuron* **76**, 266–280.

Matano, M., Date, S., Shimokawa, M., Takano, A., Fujii, M., Ohta, Y., Watanabe, T., Kanai, T., and Sato, T. (2015). Modeling colorectal cancer using CRISPR-Cas9-mediated engineering of human intestinal organoids. *Nat. Med.* **21**, 256–262.

Matei, I., De Temmerman, N., Ullmann, U., Cauffman, G., Sermon, K., Van de Velde, H., De Rycke, M., Degreef, E., Devroey, P., Liebaers, I., et al. (2006). Derivation of human embryonic stem cell lines

from embryos obtained after IVF and after PGD for monogenic disorders. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **21**, 503–511.

Mathers, P.H., and Jamrich, M. (2000). Regulation of eye formation by the Rx and pax6 homeobox genes. *Cell. Mol. Life Sci. CMSL* **57**, 186–194.

Matsushima, D., Heavner, W., and Pevny, L.H. (2011). Combinatorial regulation of optic cup progenitor cell fate by SOX2 and PAX6. *Dev. Camb. Engl.* **138**, 443–454.

McGill, T.J., Stoddard, J., Renner, L.M., Messaoudi, I., Bharti, K., Mitalipov, S., Lauer, A., Wilson, D.J., and Neuringer, M. (2018). Allogeneic iPSC-Derived RPE Cell Graft Failure Following Transplantation Into the Subretinal Space in Nonhuman Primates. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **59**, 1374–1383.

Mellough, C.B., Sernagor, E., Moreno-Gimeno, I., Steel, D.H.W., and Lako, M. (2012). Efficient stage-specific differentiation of human pluripotent stem cells toward retinal photoreceptor cells. *Stem Cells Dayt. Ohio* **30**, 673–686.

Menzel, D. (1721). *De excrescentiis verrucoso cristosis copiose in intestinis crassis dysenteriam passi observatis. Acta Med Berol* **68**–71.

Meyer, J.S., Howden, S.E., Wallace, K.A., Verhoeven, A.D., Wright, L.S., Capowski, E.E., Pinilla, I., Martin, J.M., Tian, S., Stewart, R., et al. (2011). Optic Vesicle-like Structures Derived from Human Pluripotent Stem Cells Facilitate a Customized Approach to Retinal Disease Treatment. *Stem Cells Dayt. Ohio* **29**, 1206–1218.

Mili, S., Moissoglu, K., and Macara, I.G. (2008). Genome-wide screen reveals APC-associated RNAs enriched in cell protrusions. *Nature* **453**, 115–119.

Miller, J.D., Ganat, Y.M., Kishinevsky, S., Bowman, R.L., Liu, B., Tu, E.Y., Mandal, P., Vera, E., Shim, J., Kriks, S., et al. (2013). Human iPSC-based Modeling of Late-Onset Disease via Progerin-induced Aging. *Cell Stem Cell* **13**, 691–705.

Mirinezhad, S.K., Mousavi, F., Baghri, M., Sepehri, B., Ghavidel, A., Ghojazadeh, M., and Somi, M.H. (2018). Congenital Hypertrophy of Retinal Pigment Epithelium for Diagnosis of Familial Adenomatous Polyposis - the First FAP registry in Iran. *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP* **19**, 167–169.

Mitin, N., Betts, L., Yohe, M.E., Der, C.J., Sondek, J., and Rossman, K.L. (2007). Release of autoinhibition of ASEF by APC leads to CDC42 activation and tumor suppression. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 814–823.

Mogensen, M.M., Tucker, J.B., Mackie, J.B., Prescott, A.R., and Näthke, I.S. (2002). The adenomatous polyposis coli protein unambiguously localizes to microtubule plus ends and is involved in establishing parallel arrays of microtubule bundles in highly polarized epithelial cells. *J. Cell Biol.* **157**, 1041–1048.

Mohn, J.L., Alexander, J., Pirone, A., Palka, C.D., Lee, S.-Y., Mebane, L., Haydon, P.G., and Jacob, M.H. (2014). Adenomatous polyposis coli protein deletion leads to cognitive and autism-like disabilities. *Mol. Psychiatry* **19**, 1133–1142.

Moiseyev, G., Chen, Y., Takahashi, Y., Wu, B.X., and Ma, J.-X. (2005). RPE65 is the isomerohydrolase in the retinoid visual cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 12413–12418.

Mojica, F.J.M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., and Soria, E. (2005). Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *J. Mol. Evol.* **60**, 174–182.

Molday, L.L., Rabin, A.R., and Molday, R.S. (2000). ABCR expression in foveal cone photoreceptors and its role in Stargardt macular dystrophy. *Nat. Genet.* **25**, 257–258.

Molotkov, A., Molotkova, N., and Duester, G. (2006). Retinoic acid guides eye morphogenetic movements via paracrine signaling but is unnecessary for retinal dorsoventral patterning. *Dev. Camb. Engl.* **133**, 1901–1910.

Morin, P.J., Sparks, A.B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1997). Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* **275**, 1787–1790.

Morton, D.G., Gibson, J., Macdonald, F., Brown, R., Haydon, J., Cullen, R., Rindl, M., Hulten, M., Neoptolemos, J.P., and Keighley, M.R. (1992). Role of congenital hypertrophy of the retinal pigment epithelium in the predictive diagnosis of familial adenomatous polyposis. *Br. J. Surg.* **79**, 689–693.

Moseley, J.B., Bartolini, F., Okada, K., Wen, Y., Gundersen, G.G., and Goode, B.L. (2007). Regulated Binding of Adenomatous Polyposis Coli Protein to Actin. *J. Biol. Chem.* **282**, 12661–12668.

Moser, A.R., Pitot, H.C., and Dove, W.F. (1990). A dominant mutation that predisposes to multiple intestinal neoplasia in the mouse. *Science* **247**, 322–324.

Moser, A.R., Mattes, E.M., Dove, W.F., Lindstrom, M.J., Haag, J.D., and Gould, M.N. (1993). ApcMin, a mutation in the murine Apc gene, predisposes to mammary carcinomas and focal alveolar hyperplasias. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 8977–8981.

Moulin, A.P., Zografos, L., and Schalenbourg, A. (2014). RPE adenocarcinoma arising from a congenital hypertrophy of the RPE (CHRPE) treated with proton therapy. *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* **231**, 411–413.

Muñoz-Sanjuán, I., and H.-Brivanlou, A. (2001). Early Posterior/Ventral Fate Specification in the Vertebrate Embryo. *Dev. Biol.* **237**, 1–17.

Mustafi, D., Kevany, B.M., Genoud, C., Bai, X., and Palczewski, K. (2013). Photoreceptor phagocytosis is mediated by phosphoinositide signaling. *FASEB J.* **27**, 4585–4595.

Nadauld, L.D., Sandoval, I.T., Chidester, S., Yost, H.J., and Jones, D.A. (2004). Adenomatous polyposis coli control of retinoic acid biosynthesis is critical for zebrafish intestinal development and differentiation. *J. Biol. Chem.* **279**, 51581–51589.

Nadauld, L.D., Phelps, R., Moore, B.C., Eisinger, A., Sandoval, I.T., Chidester, S., Peterson, P.W., Manos, E.J., Sklow, B., Burt, R.W., et al. (2006a). Adenomatous polyposis coli control of C-terminal binding protein-1 stability regulates expression of intestinal retinol dehydrogenases. *J. Biol. Chem.* **281**, 37828–37835.

Nadauld, L.D., Chidester, S., Shelton, D.N., Rai, K., Broadbent, T., Sandoval, I.T., Peterson, P.W., Manos, E.J., Ireland, C.M., Yost, H.J., et al. (2006b). Dual roles for adenomatous polyposis coli in regulating retinoic acid biosynthesis and Wnt during ocular development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 13409–13414.

- Nakano, T., Ando, S., Takata, N., Kawada, M., Muguruma, K., Sekiguchi, K., Saito, K., Yonemura, S., Eiraku, M., and Sasai, Y. (2012). Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs. *Cell Stem Cell* *10*, 771–785.
- Nandrot, E.F., and Dufour, E.M. (2010). Mertk in daily retinal phagocytosis: a history in the making. *Adv. Exp. Med. Biol.* *664*, 133–140.
- Narayan, S., and Sharma, R. (2015). Molecular mechanism of adenomatous polyposis coli-induced blockade of base excision repair pathway in colorectal carcinogenesis. *Life Sci.* *139*, 145–152.
- Narayan, S., Brun, A.M., and Yorio, T. (2004). Endothelin-1 distribution and basolateral secretion in the retinal pigment epithelium. *Exp. Eye Res.* *79*, 11–19.
- Näthke, I.S. (2004). The adenomatous polyposis coli protein: the Achilles heel of the gut epithelium. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *20*, 337–366.
- Nautiyal, J., Banerjee, S., Kanwar, S.S., Yu, Y., Patel, B.B., Sarkar, F.H., and Majumdar, A.P.N. (2011). Curcumin enhances dasatinib-induced inhibition of growth and transformation of colon cancer cells. *Int. J. Cancer* *128*, 951–961.
- Neufeld, K.L. (2009). Nuclear APC. *Adv. Exp. Med. Biol.* *656*, 13–29.
- Neufeld, K.L., Zhang, F., Cullen, B.R., and White, R.L. (2000). APC-mediated downregulation of beta-catenin activity involves nuclear sequestration and nuclear export. *EMBO Rep.* *1*, 519–523.
- Newman, A.M., and Cooper, J.B. (2010). Lab-specific gene expression signatures in pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* *7*, 258–262.
- Newman, E., and Reichenbach, A. (1996). The Müller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci.* *19*, 307–312.
- Nguyen, M., and Arnheiter, H. (2000). Signaling and transcriptional regulation in early mammalian eye development: a link between FGF and MITF. *Dev. Camb. Engl.* *127*, 3581–3591.
- Nieuwenhuis, M.H., and Vasen, H.F.A. (2007). Correlations between mutation site in APC and phenotype of familial adenomatous polyposis (FAP): A review of the literature. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* *61*, 153–161.
- Niho, N., Takahashi, M., Kitamura, T., Shoji, Y., Itoh, M., Noda, T., Sugimura, T., and Wakabayashi, K. (2003). Concomitant Suppression of Hyperlipidemia and Intestinal Polyp Formation in Apc-deficient Mice by Peroxisome Proliferator-activated Receptor Ligands. *Cancer Res.* *63*, 6090–6095.
- Niknejad, H., Peirovi, H., Jorjani, M., Ahmadiani, A., Ghanavi, J., and Seifalian, A.M. (2008). Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur. Cell. Mater.* *15*, 88–99.
- Nnadi, S.C., Watson, R., Innocent, J., Gonye, G.E., Buchberg, A.M., and Siracusa, L.D. (2012). Identification of five novel modifier loci of Apc(Min) harbored in the BXH14 recombinant inbred strain. *Carcinogenesis* *33*, 1589–1597.
- Norden, C., Young, S., Link, B.A., and Harris, W.A. (2009). Actomyosin Is the Main Driver of Interkinetic Nuclear Migration in the Retina. *Cell* *138*, 1195–1208.

- Ohsawa, R., and Kageyama, R. (2008). Regulation of retinal cell fate specification by multiple transcription factors. *Brain Res.* **1192**, 90–98.
- Okada, K., Bartolini, F., Deaconescu, A.M., Moseley, J.B., Dogic, Z., Grigorieff, N., Gundersen, G.G., and Goode, B.L. (2010). Adenomatous polyposis coli protein nucleates actin assembly and synergizes with the formin mDia1. *J. Cell Biol.* **189**, 1087–1096.
- Olea, J.L., Mateos, J.M., Llompart, A., and Obrador, A. (1996). Frequency of congenital hypertrophy of the retinal pigment epithelium in familial adenomatous polyposis. *Acta Ophthalmol. Scand.* **74**, 48–50.
- Olschwang, S., Tiret, A., Laurent-Puig, P., Muleris, M., Parc, R., and Thomas, G. (1993). Restriction of ocular fundus lesions to a specific subgroup of APC mutations in adenomatous polyposis coli patients. *Cell* **75**, 959–968.
- Osafune, K., Caron, L., Borowiak, M., Martinez, R.J., Fitz-Gerald, C.S., Sato, Y., Cowan, C.A., Chien, K.R., and Melton, D.A. (2008). Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. *Nat. Biotechnol.* **26**, 313–315.
- Osakada, F., Ikeda, H., Mandai, M., Wataya, T., Watanabe, K., Yoshimura, N., Akaike, A., Akaike, A., Sasai, Y., and Takahashi, M. (2008). Toward the generation of rod and cone photoreceptors from mouse, monkey and human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* **26**, 215–224.
- Osakada, F., Jin, Z.-B., Hirami, Y., Ikeda, H., Danjyo, T., Watanabe, K., Sasai, Y., and Takahashi, M. (2009). In vitro differentiation of retinal cells from human pluripotent stem cells by small-molecule induction. *J. Cell Sci.* **122**, 3169–3179.
- OVANDO-ROCHE, P., WEST, E.L., BRANCH, M.J., SAMPSON, R.D., FERNANDO, M., MUNRO, P., GEORGIADIS, A., RIZZI, M., KLOC, M., NAEEM, A., et al. (2018). Use of bioreactors for culturing human retinal organoids improves photoreceptor yields. *Stem Cell Res. Ther.* **9**.
- Padgett, L.C., Lui, G.M., Werb, Z., and LaVail, M.M. (1997). Matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in the retinal pigment epithelium and interphotoreceptor matrix: vectorial secretion and regulation. *Exp. Eye Res.* **64**, 927–938.
- Pang, C.P., Keung, J.W., Tang, N.L., Fan, D.S., Lau, J.W., and Lam, D.S. (2000). Congenital hypertrophy of the retinal pigment epithelium and APC mutations in two Chinese families with familial adenomatous polyposis. *Eye Lond. Engl.* **14 ( Pt 1)**, 18–22.
- Paraoan, L., Hiscott, P., Gosden, C., and Grierson, I. (2010). Cystatin C in macular and neuronal degenerations: Implications for mechanism(s) of age-related macular degeneration. *Vision Res.* **50**, 737–742.
- Parker, R.O., and Crouch, R.K. (2010). Retinol dehydrogenases (RDHs) in the visual cycle. *Exp. Eye Res.* **91**, 788–792.
- Paull, D., Sevilla, A., Zhou, H., Hahn, A.K., Kim, H., Napolitano, C., Tsankov, A., Shang, L., Krumholz, K., Jagadeesan, P., et al. (2015). Automated, high-throughput derivation, characterization and differentiation of induced pluripotent stem cells. *Nat. Methods* **12**, 885.
- Phelps, R.A., Chidester, S., Dehghanizadeh, S., Phelps, J., Sandoval, I.T., Rai, K., Broadbent, T., Sarkar, S., Burt, R.W., and Jones, D.A. (2009). A two step model for colon adenoma initiation and progression caused by APC loss. *Cell* **137**, 623–634.

Philp, N.J., Wang, D., Yoon, H., and Hjelmeland, L.M. (2003). Polarized expression of monocarboxylate transporters in human retinal pigment epithelium and ARPE-19 cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**, 1716–1721.

Piccolo, S., Agius, E., Leyns, L., Bhattacharyya, S., Grunz, H., Bouwmeester, T., and De Robertis, E.M. (1999). The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. *Nature* **397**, 707–710.

Plafker, S.M., O'Mealey, G.B., and Szweda, L.I. (2012). MECHANISMS FOR COUNTERING OXIDATIVE STRESS AND DAMAGE IN RETINAL PIGMENT EPITHELIUM. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **298**, 135–177.

Pollard, P., Deheragoda, M., Segditsas, S., Lewis, A., Rowan, A., Howarth, K., Willis, L., Nye, E., McCart, A., Mandir, N., et al. (2009). The Apc 1322T mouse develops severe polyposis associated with submaximal nuclear beta-catenin expression. *Gastroenterology* **136**, 2204–2213.e1-13.

Polo, J.M., Liu, S., Figueiroa, M.E., Kulalert, W., Eminli, S., Tan, K.Y., Apostolou, E., Stadtfeld, M., Li, Y., Shioda, T., et al. (2010). Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* **28**, 848–855.

Porter, F.D., Drago, J., Xu, Y., Cheema, S.S., Wassif, C., Huang, S.P., Lee, E., Grinberg, A., Massalas, J.S., Bodine, D., et al. (1997). Lhx2, a LIM homeobox gene, is required for eye, forebrain, and definitive erythrocyte development. *Development* **124**, 2935–2944.

Preitner, N., Quan, J., Nowakowski, D.W., Hancock, M.L., Shi, J., Tcherkezian, J., Young-Pearse, T.L., and Flanagan, J.G. (2014). APC Is an RNA-Binding Protein, and Its Interactome Provides a Link to Neural Development and Microtubule Assembly. *Cell* **158**, 368–382.

Qi, J.H., Ebrahem, Q., Moore, N., Murphy, G., Claesson-Welsh, L., Bond, M., Baker, A., and Anand-Apte, B. (2003). A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2. *Nat. Med.* **9**, 407–415.

Qian, J., Sarnaik, A.A., Bonney, T.M., Keirsey, J., Combs, K.A., Steigerwald, K., Acharya, S., Behbehani, G.K., Barton, M.C., Lowy, A.M., et al. (2008). The APC tumor suppressor inhibits DNA replication by directly binding to DNA via its carboxyl-terminus. *Gastroenterology* **135**, 152–162.

Ran, F.A., Hsu, P.D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D.A., and Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* **8**, 2281–2308.

Rebagliati, M.R., Toyama, R., Haffter, P., and Dawid, I.B. (1998). cyclops encodes a nodal-related factor involved in midline signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 9932–9937.

Reed, T.E., and Neel, J.V. (1955). A genetic study of multiple polyposis of the colon with an appendix deriving a method of estimating relative fitness. *Am. J. Hum. Genet.* **7**, 236–263.

Reichman, S., Terray, A., Slembrouck, A., Nanteau, C., Orieux, G., Habeler, W., Nandrot, E.F., Sahel, J.-A., Monville, C., and Goureau, O. (2014). From confluent human iPS cells to self-forming neural retina and retinal pigmented epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 8518–8523.

Reichman, S., Slembrouck, A., Gagliardi, G., Chaffiol, A., Terray, A., Nanteau, C., Potey, A., Belle, M., Rabesandratana, O., Duebel, J., et al. (2017). Generation of Storable Retinal Organoids and Retinal Pigmented Epithelium from Adherent Human iPS Cells in Xeno-Free and Feeder-Free Conditions. *Stem Cells Dayt. Ohio* **35**, 1176–1188.

Rembold, M., Loosli, F., Adams, R.J., and Wittbrodt, J. (2006). Individual cell migration serves as the driving force for optic vesicle evagination. *Science* *313*, 1130–1134.

de Rham, C., and Villard, J. (2014). Potential and Limitation of HLA-Based Banking of Human Pluripotent Stem Cells for Cell Therapy.

Riolobos, L., Hirata, R.K., Turtle, C.J., Wang, P.-R., Gornalusse, G.G., Zavajlevski, M., Riddell, S.R., and Russell, D.W. (2013). HLA Engineering of Human Pluripotent Stem Cells. *Mol. Ther.* *21*, 1232–1241.

Rizzolo, L.J. (2014). Barrier properties of cultured retinal pigment epithelium. *Exp. Eye Res.* *126*, 16–26.

Rizzolo, L.J., Peng, S., Luo, Y., and Xiao, W. (2011). Integration of tight junctions and claudins with the barrier functions of the retinal pigment epithelium. *Prog. Retin. Eye Res.* *30*, 296–323.

Roberts, G.T., Davies, M.L., and Wakeman, J.A. (2003). Interaction between Ku80 protein and a widely used antibody to adenomatous polyposis coli. *Br. J. Cancer* *88*, 202–205.

Rohlin, A., Engwall, Y., Fritzell, K., Göransson, K., Bergsten, A., Einbeigi, Z., Nilbert, M., Karlsson, P., Björk, J., and Nordling, M. (2011). Inactivation of promoter 1B of APC causes partial gene silencing: evidence for a significant role of the promoter in regulation and causative of familial adenomatous polyposis. *Oncogene* *30*, 4977–4989.

Rouhani, F., Kumasaka, N., Brito, M.C. de, Bradley, A., Vallier, L., and Gaffney, D. (2014). Genetic Background Drives Transcriptional Variation in Human Induced Pluripotent Stem Cells. *PLOS Genet.* *10*, e1004432.

Rubinfeld, B., Albert, I., Porfiri, E., Munemitsu, S., and Polakis, P. (1997). Loss of beta-catenin regulation by the APC tumor suppressor protein correlates with loss of structure due to common somatic mutations of the gene. *Cancer Res.* *57*, 4624–4630.

Sampson, J.R., Dolwani, S., Jones, S., Eccles, D., Ellis, A., Evans, D.G., Frayling, I., Jordan, S., Maher, E.R., Mak, T., et al. (2003). Autosomal recessive colorectal adenomatous polyposis due to inherited mutations of MYH. *Lancet Lond. Engl.* *362*, 39–41.

Santoro, I.M., and Groden, J. (1997). Alternative splicing of the APC gene and its association with terminal differentiation. *Cancer Res.* *57*, 488–494.

Sarna, T., Burke, J.M., Korytowski, W., Różanowska, M., Skumatz, C.M.B., Zareba, A., and Zareba, M. (2003). Loss of melanin from human RPE with aging: possible role of melanin photooxidation. *Exp. Eye Res.* *76*, 89–98.

Sato, N., Meijer, L., Skaltounis, L., Greengard, P., and Brivanlou, A.H. (2004). Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat. Med.* *10*, 55–63.

Sato, T., Vries, R.G., Snippert, H.J., van de Wetering, M., Barker, N., Stange, D.E., van Es, J.H., Abo, A., Kujala, P., Peters, P.J., et al. (2009). Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* *459*, 262–265.

Schiaffino, M.V. (2010). SIGNALING PATHWAYS IN MELANOSOME BIOGENESIS AND PATHOLOGY. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *42*, 1094–1104.

Schwartz, S.D., Hubschman, J.-P., Heilwell, G., Franco-Cardenas, V., Pan, C.K., Ostrick, R.M., Mickunas, E., Gay, R., Klimanskaya, I., and Lanza, R. (2012). Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet Lond. Engl.* **379**, 713–720.

Schwartz, S.D., Regillo, C.D., Lam, B.L., Elliott, D., Rosenfeld, P.J., Gregori, N.Z., Hubschman, J.-P., Davis, J.L., Heilwell, G., Spirn, M., et al. (2015). Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *The Lancet* **385**, 509–516.

Schwartz, S.D., Tan, G., Hosseini, H., and Nagiel, A. (2016). Subretinal Transplantation of Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium for the Treatment of Macular Degeneration: An Assessment at 4 Years. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **57**, ORSFc1-9.

Schwarz, M., Cecconi, F., Bernier, G., Andrejewski, N., Kammandel, B., Wagner, M., and Gruss, P. (2000). Spatial specification of mammalian eye territories by reciprocal transcriptional repression of Pax2 and Pax6. *Dev. Camb. Engl.* **127**, 4325–4334.

des Senanayake P, null, Calabro, A., Nishiyama, K., Hu, J.G., Bok, D., and Hollyfield, J.G. (2001). Glycosaminoglycan synthesis and secretion by the retinal pigment epithelium: polarized delivery of hyaluronan from the apical surface. *J. Cell Sci.* **114**, 199–205.

Shields, J.A., Shields, C.L., and Singh, A.D. (2000). Acquired tumors arising from congenital hypertrophy of the retinal pigment epithelium. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill* **1960 118**, 637–641.

Shields, J.A., Shields, C.L., Eagle, R.C., and Singh, A.D. (2001). Adenocarcinoma arising from congenital hypertrophy of retinal pigment epithelium. *Arch. Ophthalmol. Chic. Ill* **1960 119**, 597–602.

Sieber, O.M., Lipton, L., Crabtree, M., Heinemann, K., Fidalgo, P., Phillips, R.K.S., Bisgaard, M.-L., Orntoft, T.F., Aaltonen, L.A., Hodgson, S.V., et al. (2003). Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. *N. Engl. J. Med.* **348**, 791–799.

Sierra, J., Yoshida, T., Joazeiro, C.A., and Jones, K.A. (2006). The APC tumor suppressor counteracts  $\beta$ -catenin activation and H3K4 methylation at Wnt target genes. *Genes Dev.* **20**, 586–600.

Silverman, K.A., Koratkar, R., Siracusa, L.D., and Buchberg, A.M. (2002). Identification of the modifier of Min 2 (Mom2) locus, a new mutation that influences Apc-induced intestinal neoplasia. *Genome Res.* **12**, 88–97.

Simeone, A., Acampora, D., Mallamaci, A., Stornaiuolo, A., D'Apice, M.R., Nigro, V., and Boncinelli, E. (1993). A vertebrate gene related to orthodenticle contains a homeodomain of the bicoid class and demarcates anterior neuroectoderm in the gastrulating mouse embryo. *EMBO J.* **12**, 2735–2747.

Sinn, R., and Wittbrodt, J. (2013). An eye on eye development. *Mech. Dev.* **130**, 347–358.

Skilfasowski, N. (1881). Polyadenoma tractus intestinalis. *VRAC* 55–57.

Sluch, V.M., Davis, C.O., Ranganathan, V., Kerr, J.M., Krick, K., Martin, R., Berlinicke, C.A., Marsh-Armstrong, N., Diamond, J.S., Mao, H.-Q., et al. (2015). Differentiation of human ESCs to retinal ganglion cells using a CRISPR engineered reporter cell line. *Sci. Rep.* **5**, 16595.

Smits, R., van der Houven van Oordt, W., Luz, A., Zurcher, C., Jagmohan-Changur, S., Breukel, C., Khan, P.M., and Fodde, R. (1998). Apc1638N: a mouse model for familial adenomatous polyposis-associated desmoid tumors and cutaneous cysts. *Gastroenterology* **114**, 275–283.

Smits, R., Kielman, M.F., Breukel, C., Zurcher, C., Neufeld, K., Jagmohan-Changur, S., Hofland, N., van Dijk, J., White, R., Edelmann, W., et al. (1999). Apc1638T: a mouse model delineating critical domains of the adenomatous polyposis coli protein involved in tumorigenesis and development. *Genes Dev.* *13*, 1309–1321.

Soares, F.A.C., Chandra, A., Thomas, R.J., Pedersen, R.A., Vallier, L., and Williams, D.J. (2014). Investigating the feasibility of scale up and automation of human induced pluripotent stem cells cultured in aggregates in feeder free conditions. *J. Biotechnol.* *173*, 53–58.

Song, W.K., Park, K.-M., Kim, H.-J., Lee, J.H., Choi, J., Chong, S.Y., Shim, S.H., Del Priore, L.V., and Lanza, R. (2015). Treatment of Macular Degeneration Using Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium: Preliminary Results in Asian Patients. *Stem Cell Rep.* *4*, 860–872.

Spence, J.R., Mayhew, C.N., Rankin, S.A., Kuhar, M.F., Vallance, J.E., Tolle, K., Hoskins, E.E., Kalinichenko, V.V., Wells, S.I., Zorn, A.M., et al. (2011). Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature* *470*, 105–109.

Sreekumar, P.G., Kannan, R., Kitamura, M., Spee, C., Barron, E., Ryan, S.J., and Hinton, D.R. (2010).  $\alpha$ B Crystallin Is Apically Secreted within Exosomes by Polarized Human Retinal Pigment Epithelium and Provides Neuroprotection to Adjacent Cells. *PLoS ONE* *5*.

Stamer, W.D., Bok, D., Hu, J., Jaffe, G.J., and McKay, B.S. (2003). Aquaporin-1 channels in human retinal pigment epithelium: role in transepithelial water movement. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *44*, 2803–2808.

Stamos, J.L., and Weis, W.I. (2013). The  $\beta$ -Catenin Destruction Complex. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *5*.

Stern, J., and Temple, S. (2015). Retinal pigment epithelial cell proliferation. *Exp. Biol. Med.* *240*, 1079–1086.

Strauss, O. (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol. Rev.* *85*, 845–881.

Strauss, O. (2011). The Retinal Pigment Epithelium. In *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*, H. Kolb, E. Fernandez, and R. Nelson, eds. (Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center), p.

Strauß, O. (2016). Pharmacology of the retinal pigment epithelium, the interface between retina and body system. *Eur. J. Pharmacol.* *787*, 84–93.

Streilein, J.W., Ma, N., Wenkel, H., Ng, T.F., and Zamiri, P. (2002). Immunobiology and privilege of neuronal retina and pigment epithelium transplants. *Vision Res.* *42*, 487–495.

Su, L.K., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Preisinger, A.C., Moser, A.R., Luongo, C., Gould, K.A., and Dove, W.F. (1992). Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science* *256*, 668–670.

Su, L.K., Johnson, K.A., Smith, K.J., Hill, D.E., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1993). Association between wild type and mutant APC gene products. *Cancer Res.* *53*, 2728–2731.

Su, Y., Fu, C., Ishikawa, S., Stella, A., Kojima, M., Shitoh, K., Schreiber, E.M., Day, B.W., and Liu, B. (2008). APC Is Essential for Targeting Phosphorylated  $\beta$ -Catenin to the SCF $\beta$ -TrCP Ubiquitin Ligase. *Mol. Cell* *32*, 652–661.

Sugioka, K., Fielmich, L.-E., Mizumoto, K., Bowerman, B., van den Heuvel, S., Kimura, A., and Sawa, H. (2018). Tumor suppressor APC is an attenuator of spindle-pulling forces during *C. elegans* asymmetric cell division. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *115*, E954–E963.

Sugita, S., Horie, S., Nakamura, O., Futagami, Y., Takase, H., Keino, H., Aburatani, H., Katunuma, N., Ishidoh, K., Yamamoto, Y., et al. (2008). Retinal pigment epithelium-derived CTLA-2alpha induces TGFbeta-producing T regulatory cells. *J. Immunol. Baltim. Md* *181*, 7525–7536.

Sugita, S., Usui, Y., Horie, S., Futagami, Y., Aburatani, H., Okazaki, T., Honjo, T., Takeuchi, M., and Mochizuki, M. (2009). T-cell suppression by programmed cell death 1 ligand 1 on retinal pigment epithelium during inflammatory conditions. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* *50*, 2862–2870.

Sugita, S., Iwasaki, Y., Makabe, K., Kamao, H., Mandai, M., Shiina, T., Ogasawara, K., Hirami, Y., Kurimoto, Y., and Takahashi, M. (2016). Successful Transplantation of Retinal Pigment Epithelial Cells from MHC Homozygote iPSCs in MHC-Matched Models. *Stem Cell Rep.* *7*, 635–648.

Sugita, S., Makabe, K., Fujii, S., Iwasaki, Y., Kamao, H., Shiina, T., Ogasawara, K., and Takahashi, M. (2017). Detection of Retinal Pigment Epithelium-Specific Antibody in iPSC-Derived Retinal Pigment Epithelium Transplantation Models. *Stem Cell Rep.* *9*, 1501–1515.

Suleková, Z., and Ballhausen, W.G. (1995). A novel coding exon of the human adenomatous polyposis coli gene. *Hum. Genet.* *96*, 469–471.

Syngal, S., Brand, R.E., Church, J.M., Giardiello, F.M., Hampel, H.L., Burt, R.W., and American College of Gastroenterology (2015). ACG clinical guideline: Genetic testing and management of hereditary gastrointestinal cancer syndromes. *Am. J. Gastroenterol.* *110*, 223–262; quiz 263.

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.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* *131*, 861–872.

Tang, P.H., Kono, M., Koutalos, Y., Ablonczy, Z., and Crouch, R.K. (2013). New insights into retinoid metabolism and cycling within the retina. *Prog. Retin. Eye Res.* *32*, 48–63.

Tannenbaum, S.E., Turetsky, T.T., Singer, O., Aizenman, E., Kirshberg, S., Ilouz, N., Gil, Y., Berman-Zaken, Y., Perlman, T.S., Geva, N., et al. (2012). Derivation of xeno-free and GMP-grade human embryonic stem cells--platforms for future clinical applications. *PLoS One* *7*, e35325.

Terstegge, S., Pochert, J., and Brüstle, O. (2004). Hamilton's new cellhost system for full automation of embryonic stem cell cultures.

Tétreault, N., Champagne, M.-P., and Bernier, G. (2009). The LIM homeobox transcription factor Lhx2 is required to specify the retina field and synergistically cooperates with Pax6 for Six6 trans-activation. *Dev. Biol.* *327*, 541–550.

Thliveris, A., Samowitz, W., Matsunami, N., Groden, J., and White, R. (1994). Demonstration of promoter activity and alternative splicing in the region 5' to exon 1 of the APC gene. *Cancer Res.* *54*, 2991–2995.

Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145–1147.

Tighe, A., Johnson, V.L., and Taylor, S.S. (2004). Truncating APC mutations have dominant effects on proliferation, spindle checkpoint control, survival and chromosome stability. *J. Cell Sci.* **117**, 6339–6353.

Toyoshima, T., Kamijo, R., Takizawa, K., Sumitani, K., Ito, D., and Nagumo, M. (2002). Inhibitor of cyclooxygenase-2 induces cell-cycle arrest in the epithelial cancer cell line via up-regulation of cyclin dependent kinase inhibitor p21. *Br. J. Cancer* **86**, 1150–1156.

Traboulsi, E.I., Krush, A.J., Gardner, E.J., Booker, S.V., Offerhaus, G.J., Yardley, J.H., Hamilton, S.R., Luk, G.D., Giardiello, F.M., and Welsh, S.B. (1987). Prevalence and importance of pigmented ocular fundus lesions in Gardner's syndrome. *N. Engl. J. Med.* **316**, 661–667.

Traboulsi, E.I., Murphy, S.F., de la Cruz, Z.C., Maumenee, I.H., and Green, W.R. (1990). A clinicopathologic study of the eyes in familial adenomatous polyposis with extracolonic manifestations (Gardner's syndrome). *Am. J. Ophthalmol.* **110**, 550–561.

Trichopoulos, N., Augsburger, J.J., and Schneider, S. (2006). Adenocarcinoma arising from congenital hypertrophy of the retinal pigment epithelium. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol. Albrecht Von Graefes Arch. Klin. Exp. Ophthalmol.* **244**, 125–128.

Trimarchi, J.M., Stadler, M.B., and Cepko, C.L. (2008). Individual retinal progenitor cells display extensive heterogeneity of gene expression. *PLoS One* **3**, e1588.

Tsuboi, S. (1987). Measurement of the volume flow and hydraulic conductivity across the isolated dog retinal pigment epithelium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **28**, 1776–1782.

Tucker, P., Laemle, L., Munson, A., Kanekar, S., Oliver, E.R., Brown, N., Schlecht, H., Vetter, M., and Glaser, T. (2001). The eyeless mouse mutation (ey1) removes an alternative start codon from the Rx/rax homeobox gene. *Genes. N. Y.* **N 2000 31**, 43–53.

Varesco, L. (2004). Familial adenomatous polyposis: genetics and epidemiology. *Tech. Coloproctology* **8 Suppl 2**, s305–308.

Varga, Z.M., Wegner, J., and Westerfield, M. (1999). Anterior movement of ventral diencephalic precursors separates the primordial eye field in the neural plate and requires cyclops. *Dev. Camb. Engl.* **126**, 5533–5546.

Vasen, H.F.A., Mösllein, G., Alonso, A., Aretz, S., Bernstein, I., Bertario, L., Blanco, I., Bülow, S., Burn, J., Capella, G., et al. (2008). Guidelines for the clinical management of familial adenomatous polyposis (FAP). *Gut* **57**, 704–713.

Vera, E., Bosco, N., and Studer, L. (2016). Generating Late-Onset Human iPSC-Based Disease Models by Inducing Neuronal Age-Related Phenotypes through Telomerase Manipulation. *Cell Rep.* **17**, 1184–1192.

Voisin, A., Monville, C., Plancheron, A., Balbous, A., Gaillard, A., and Leveziel, N. (2018). hRPE cells derived from induced pluripotent stem cells are more sensitive to oxidative stress than ARPE-19 cells. *Exp. Eye Res.* **177**, 76–86.

Wagner, W., Horn, P., Castoldi, M., Diehlmann, A., Bork, S., Saffrich, R., Benes, V., Blake, J., Pfister, S., Eckstein, V., et al. (2008). Replicative Senescence of Mesenchymal Stem Cells: A Continuous and Organized Process. *PLoS ONE* 3.

Waller, A., Findeis, S., and Lee, M.J. (2016). Familial Adenomatous Polyposis. *J. Pediatr. Genet.* 5, 78–83.

Wang, J.-S., and Kefalov, V.J. (2011). The cone-specific visual cycle. *Prog. Retin. Eye Res.* 30, 115–128.

Wang, D., Quan, Y., Yan, Q., E Morales, J., and Wetsel, R. (2015). Targeted Disruption of the Beta2-Microglobulin Gene Minimizes the Immunogenicity of Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells Transl. Med.* 4.

Wässle, H. (2004). Parallel processing in the mammalian retina. *Nat. Rev. Neurosci.* 5, 747–757.

Watanabe, K., Ueno, M., Kamiya, D., Nishiyama, A., Matsumura, M., Wataya, T., Takahashi, J.B., Nishikawa, S., Nishikawa, S., Muguruma, K., et al. (2007). A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 25, 681–686.

Watanabe, T., Wang, S., Noritake, J., Sato, K., Fukata, M., Takefuji, M., Nakagawa, M., Izumi, N., Akiyama, T., and Kaibuchi, K. (2004). Interaction with IQGAP1 links APC to Rac1, Cdc42, and actin filaments during cell polarization and migration. *Dev. Cell* 7, 871–883.

Weng, J., Mata, N.L., Azarian, S.M., Tzekov, R.T., Birch, D.G., and Travis, G.H. (1999). Insights into the function of Rim protein in photoreceptors and etiology of Stargardt's disease from the phenotype in abcr knockout mice. *Cell* 98, 13–23.

Weng, T.X., Godley, B.F., Jin, G.F., Mangini, N.J., Kennedy, B.G., Yu, A.S.L., and Wills, N.K. (2002). Oxidant and antioxidant modulation of chloride channels expressed in human retinal pigment epithelium. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 283, C839–849.

Wenk, M.L., Ward, J.M., Reznik, G., and Dean, J. (1981). Effects of three retinoids on colon adenocarcinomas, sarcomas and hyperplastic polyps induced by intrarectal N-methyl-N-nitrosourea administration in male F344 rats. *Carcinogenesis* 2, 1161–1166.

West, M.D., Nasonkin, I., Larocca, D., Chapman, K.B., Binette, F., and Sternberg, H. (2016). Adult Versus Pluripotent Stem Cell-Derived Mesenchymal Stem Cells: The Need for More Precise Nomenclature. *Curr. Stem Cell Rep.* 2, 299–303.

Westenskow, P., Piccolo, S., and Fuhrmann, S. (2009). Beta-catenin controls differentiation of the retinal pigment epithelium in the mouse optic cup by regulating Mitf and Otx2 expression. *Dev. Camb. Engl.* 136, 2505–2510.

Winkler, S., Loosli, F., Henrich, T., Wakamatsu, Y., and Wittbrodt, J. (2000). The conditional medaka mutation eyeless uncouples patterning and morphogenesis of the eye. *Dev. Camb. Engl.* 127, 1911–1919.

Wong, W.L., Su, X., Li, X., Cheung, C.M.G., Klein, R., Cheng, C.-Y., and Wong, T.Y. (2014). Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob. Health* 2, e106–e116.

- Wu, C., Amini-Nik, S., Nik-Amini, S., Nadesan, P., Stanford, W.L., and Alman, B.A. (2010). Aggressive fibromatosis (desmoid tumor) is derived from mesenchymal progenitor cells. *Cancer Res.* *70*, 7690–7698.
- Xing, Y., Clements, W.K., Le Trong, I., Hinds, T.R., Stenkamp, R., Kimelman, D., and Xu, W. (2004). Crystal structure of a beta-catenin/APC complex reveals a critical role for APC phosphorylation in APC function. *Mol. Cell* *15*, 523–533.
- Yamaguchi, K., Nagayama, S., Shimizu, E., Komura, M., Yamaguchi, R., Shibuya, T., Arai, M., Hatakeyama, S., Ikenoue, T., Ueno, M., et al. (2016). Reduced expression of APC-1B but not APC-1A by the deletion of promoter 1B is responsible for familial adenomatous polyposis. *Sci. Rep.* *6*.
- Yamashita, Y.M., Jones, D.L., and Fuller, M.T. (2003). Orientation of asymmetric stem cell division by the APC tumor suppressor and centrosome. *Science* *301*, 1547–1550.
- Yang, J., Zhang, W., Evans, P.M., Chen, X., He, X., and Liu, C. (2006). Adenomatous Polyposis Coli (APC) Differentially Regulates  $\beta$ -Catenin Phosphorylation and Ubiquitination in Colon Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* *281*, 17751–17757.
- Yasuda, K., Zhang, H., Loiselle, D., Haystead, T., Macara, I.G., and Mili, S. (2013). The RNA-binding protein Fus directs translation of localized mRNAs in APC-RNP granules. *J. Cell Biol.* *203*, 737–746.
- Yedid, N., Kalma, Y., Malcov, M., Amit, A., Kariv, R., Caspi, M., Rosin-Arbesfeld, R., and Ben-Yosef, D. (2016). The effect of a germline mutation in the APC gene on  $\beta$ -catenin in human embryonic stem cells. *BMC Cancer* *16*.
- Yeste, J., García-Ramírez, M., Illa, X., Guimerà, A., Hernández, C., Simó, R., and Villa, R. (2017). A compartmentalized microfluidic chip with crisscross microgrooves and electrophysiological electrodes for modeling the blood-retinal barrier. *Lab. Chip* *18*, 95–105.
- Yoshimi, K., Tanaka, T., Takizawa, A., Kato, M., Hirabayashi, M., Mashimo, T., Serikawa, T., and Kuramoto, T. (2009). Enhanced colitis-associated colon carcinogenesis in a novel Apc mutant rat. *Cancer Sci.* *100*, 2022–2027.
- Youhnovska, P., Toffoli, D., and Gauthier, D. (2013). Congenital hypertrophy of the retinal pigment epithelium complicated by a choroidal neovascular membrane. *Digit. J. Ophthalmol. DJO* *19*, 24–27.
- Young, R.W. (1985). Cell differentiation in the retina of the mouse. *Anat. Rec.* *212*, 199–205.
- 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.
- Yun, S., Saijoh, Y., Hirokawa, K.E., Kopinke, D., Murtaugh, L.C., Monuki, E.S., and Levine, E.M. (2009). Lhx2 links the intrinsic and extrinsic factors that control optic cup formation. *Dev. Camb. Engl.* *136*, 3895–3906.
- Zagozowski, J.L., Zhang, Q., and Eisenstat, D.D. (2014). Genetic regulation of vertebrate eye development. *Clin. Genet.* *86*, 453–460.

Zeineldin, M., and Neufeld, K.L. (2013). More than two decades of Apc modeling in rodents. *Biochim. Biophys. Acta* **1836**, 80–89.

Zeineldin, M., Cunningham, J., McGuinness, W., Alltizer, P., Cowley, B., Blanchat, B., Xu, W., Pinson, D., and Neufeld, K.L. (2012). A knock-in mouse model reveals roles for nuclear Apc in cell proliferation, Wnt signal inhibition and tumor suppression. *Oncogene* **31**, 2423–2437.

Zhang, X., and Bok, D. (1998). Transplantation of retinal pigment epithelial cells and immune response in the subretinal space. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **39**, 1021–1027.

Zhang, X.M., and Yang, X.J. (2001). Regulation of retinal ganglion cell production by Sonic hedgehog. *Dev. Camb. Engl.* **128**, 943–957.

Zhang, F., White, R.L., and Neufeld, K.L. (2001). Cell Density and Phosphorylation Control the Subcellular Localization of Adenomatous Polyposis Coli Protein. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 8143–8156.

Zhang, L., Mathers, P.H., and Jamrich, M. (2000). Function of Rx, but not Pax6, is essential for the formation of retinal progenitor cells in mice. *Genes. N. Y. N* **2000** **28**, 135–142.

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. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **9**, 230–241.

Zhong, X., Gutierrez, C., Xue, T., Hampton, C., Vergara, M.N., Cao, L.-H., Peters, A., Park, T.-S., Zambidis, E.T., Meyer, J.S., et al. (2014). Generation of three dimensional retinal tissue with functional photoreceptors from human iPSCs. *Nat. Commun.* **5**, 4047.

Zhou, R., and Caspi, R.R. (2010). Ocular immune privilege. *F1000 Biol. Rep.* **2**.

Zhou, S., Flamier, A., Abdouh, M., Tétreault, N., Barabino, A., Wadhwa, S., and Bernier, G. (2015). Differentiation of human embryonic stem cells into cone photoreceptors through simultaneous inhibition of BMP, TGF $\beta$  and Wnt signaling. *Development* **142**, 3294–3306.

Zhou, X.-L., Giacobini, M., Anderlid, B.-M., Anckarsäter, H., Omrani, D., Gillberg, C., Nordenskjöld, M., and Lindblom, A. (2007). Association of adenomatous polyposis coli (APC) gene polymorphisms with autism spectrum disorder (ASD). *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet. Off. Publ. Int. Soc. Psychiatr. Genet.* **144B**, 351–354.

Zhu, Y., Carido, M., Meinhardt, A., Kurth, T., Karl, M.O., Ader, M., and Tanaka, E.M. (2013). Three-dimensional neuroepithelial culture from human embryonic stem cells and its use for quantitative conversion to retinal pigment epithelium. *PLoS One* **8**, e54552.

Zuber, M.E. (2010). Eye field specification in *Xenopus laevis*. *Curr. Top. Dev. Biol.* **93**, 29–60.

Zuber, M.E., Gestri, G., Viczian, A.S., Barsacchi, G., and Harris, W.A. (2003). Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors. *Development* **130**, 5155–5167.

Zumbrunn, J., Kinoshita, K., Hyman, A.A., and Näthke, I.S. (2001). Binding of the adenomatous polyposis coli protein to microtubules increases microtubule stability and is regulated by GSK3 beta phosphorylation. *Curr. Biol.* **11**, 44–49.

(2006). Publication du décret relatif à la recherche sur l'embryon (… - Agence de la biomédecine.

(2018). First serious adverse reaction to iPS-derived retinal cell transplant reported. *Jpn. Times Online.*

**Titre :** Automatisation de la différenciation des cellules souches pluripotentes humaines en cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien et modélisation des symptômes rétiniens associés à la mutation d'APC

**Mots clés :** Cellules souches pluripotentes humaines, épithélium pigmentaire rétinien, thérapie cellulaire, modélisation pathologique, polyposé adénomateuse familiale

**Résumé :** Les premiers essais cliniques visant à greffer des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR) dérivées de cellules souches pluripotentes humaines (CSPhs) chez des patients atteints de dégénérescence maculaire liée à l'âge ou de rétinites pigmentaires se sont révélés à la fois satisfaisants du point de vue de la tolérance et prometteurs du point de vue de l'efficacité. Toutefois, ils ont également pointé du doigt la nécessité d'un protocole de différenciation plus efficace, plus robuste et moins onéreux que ceux employés actuellement avant de pouvoir utiliser ce traitement en routine. Au cours de cette étude, nous avons mis au point un nouveau protocole de différenciation récapitulant les principales étapes de la rétinogenèse via l'utilisation séquentielle de seulement 3 composés (Nicotinamide, Activine A et CHIR99021). Ce protocole a permis d'automatiser la différenciation des cellules de l'EPR et permet donc d'envisager la production de ces cellules à grande échelle pour la mise au point d'un traitement accessible au plus grand nombre.

Dans un second temps, nous avons utilisé ce nouveau protocole de différenciation pour modéliser les atteintes rétiniennes associées à la Polyposé Adénomateuse Familiale (PAF). La PAF est une maladie héréditaire à transmission autosomique dominante causée par la mutation du gène suppresseur de tumeur Adenomatous Polyposis Coli (APC). Cette pathologie se caractérise principalement par l'apparition de quelques centaines à plusieurs milliers d'adénomes dans le colon, mais certains patients présentent également des symptômes extra-intestinaux dont le plus courant est la formation de lésions pigmentées du fond de l'œil. Bien que presque toujours bénignes, la présence de ces lésions suggère un rôle d'APC dans le développement et l'homéostasie de l'EPR. La différenciation de CSPhs porteuses d'une mutation sur APC en cellules de l'EPR nous a ainsi permis de mettre en évidence un rôle nouveau pour cette protéine dans la régulation de mélanogénèse et de la prolifération de ces cellules.

**Title :** Automation of human pluripotent stem cell differentiation toward retinal pigment epithelial cells for large-scale productions and modeling of the retinal manifestations associated with familial adenomatous polyposis

**Keywords :** Pluripotent stem cells, retinal pigment epithelium, cell therapy, disease modeling, familial adenomatous polyposis

**Abstract :** First attempts to transplant retinal pigment epithelial (RPE) cells derived from human pluripotent stem cells (hPSCs) in patients affected by age related macular degeneration or retinitis pigmentosa have shown both satisfactory safety results and promising efficacy results. However, they also highlighted the need for more robust and efficient differentiation protocols to treat large numbers of patients. In our study, we used only three compounds in a sequential manner (Nicotinamide, Activin A and CHIR99021) to develop a novel differentiation protocol that summarizes the main steps of retinogenesis. This protocol enabled us to automate RPE cells differentiation and, thus, should enable the large-scale production of these cells for the development of a treatment accessible to all.

Secondly, we used this new differentiation protocol to model retinal manifestations of Familial Adenomatous Polyposis Coli (FAP). FAP is an autosomal dominant inherited disease due to the mutation of the tumor suppressor gene Adenomatous Polyposis Coli (APC). This disease is mainly characterized by the development of hundreds to thousands of adenomas in the rectum and colon but also by various extra -intestinal manifestations. Among these manifestations, pigmented ocular fundus lesions are the most common. Although these lesions are almost always benign, they suggest a role for APC in the development and the homeostasis of the RPE. In this study, we differentiated hPSCs harboring APC mutations into RPE cells and described a new role for this protein in the regulation of the melanogenesis and the proliferation of these cells.

