UNIVERSITE D'EVRY VAL D'ESSONNE
Ecole doctorale « Des génomes aux organismes »

THESE

Présentée pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE D'EVRY VAL D'ESSONNE

Mention « Biologie Cellulaire et Moléculaire »

par

Xavier NISSAN

Etude des mécanismes moléculaires et cellulaires de l'engagement épidermique des cellules souches pluripotentes humaines

Soutenue le 03 Mai 2010 à 14h à Evry, devant le jury composé de :

Pr Jeanine Tortajada	**Président du jury**
Dr Michèle Martin	**Rapporteur**
Dr Lionel Larue	**Rapporteur**
Dr Ludovic Vallier	**Examinateur**
Dr Christine Baldeschi	**Co-Directeur de thèse**
Dr Marc Peschanski	**Co-Directeur de thèse**

Remerciements :

Je tiens à remercier chaque membre du jury d'avoir accepté de juger ce travail de thèse :

-Le Pr Jeanine Tortajada d'avoir accepté d'être la présidente de ce jury.

-Les Dr Michèle Martin Lionel Larue d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail et le Dr Ludovic Vallier d'avoir accepté d'en être l'examinateur.

-Les Dr Marc Peschanski et Christine Baldeschi d'avoir été mes co-directeurs de thèse.

Je remercie :

Marc Peschanski pour m'avoir accueilli et donné sa confiance dès mon arrivée dans l'équipe, pour ses conseils tout au long de ma thèse et pour la grande liberté qu'il a su me laisser.

Gilles Waksman qui a su croire en moi au moment le plus important de ma carrière et qui m'a donné la chance de travailler sur un sujet aussi passionnant. Je sais qu'il aurait été fier du travail que l'on a accompli en son nom.

Christine Baldeschi, pour avoir encadré mon travail de recherche durant cette thèse, je te remercie pour ton aide et tes conseils qui se sont avérés être précieux du début à la fin de ce projet. Je garderai un très bon souvenir autant personnel que professionnel de ces trois dernières années.

Cécile et Walter….Qu'est ce que je pourrai dire d'autre que MERCI!!!!!!!!!! Ca fait maintenant presque 5 ans que je vous connais et que je partage avec vous les bons comme les mauvais moments…Merci à tous les deux pour votre soutien inconditionnel et vos encouragements. Vous avez toujours cru en moi malgré ce que certains pouvaient en dire. J'ai toujours pu compter sur votre amitié et j'espère la garder encore longtemps…

Alexandra, Sandrine mes chercheuses préférées ! J'ai eu la chance de travailler avec vous deux et en garderai un très bon souvenir. Merci à toutes les deux pour votre écoute et vos conseils avisés.

Manoubia…Ah Manoubia !!! Ca a été un réel plaisir de travailler à tes cotés, tes compétences n'ont d'égales que ta bonne humeur. Je te remercie pour les mille et un services que tu m'as rendus, pour les heures passées au cryostat…et je te promets de couper moi même les prochains épidermes…promis…

Gilles, qui a toujours su trouver les bons mots pour conclure nos discussions scientifiques enflammées…J'espère juste pouvoir un jour arriver à être aussi « sage » que toi…Merci pour tes conseils et ton aide dans la rédaction de ce manuscrit.

Lionel, Jessica et Benoite qui forme une véritable petite « Dream Team »…je suis très heureux d'avoir eu le privilège de travailler avec vous

Jacky, Delphine et Jérôme, merci à tous les trois pour votre bonne humeur permanente. C'est vraiment agréable de travailler avec des gens aussi gentils et souriants que vous…

Michel, Anselme et Marc L, qui m'ont tant appris sur les relations humaines. Merci à tous les trois de m'avoir permis d'illustrer l'aphorisme de Nietzsche « Ce qui ne te tue pas, te rend plus fort ». Grace à vous je suis beaucoup plus fort.

Un grand merci également à toutes les personnes avec qui j'ai eu le plaisir de collaborer durant ces trois dernières années, Yacine Mathilde, Geneviève, TingTing…

Mes voisins du « bureau des thésards » avec qui j'ai partagé quelques délires de laboratoire très sympathiques. J'ai une pensée particulière à Antoine qui a parfaitement joué son rôle de secrétaire...Encore désolé pour ça Antonio !!!! Je pense également à Karine, ma chère « collègue », à Maxou, Sophie, Aurore, Morgane, Jéjé ou encore Delphine qui m'ont supporté ces deux dernieres années !!

Je tiens également à remercier pas mes parents pour tout ce qu'ils ont toujours fait pour moi, pour les valeurs qu'ils ont su m'inculquer et pour ces années passées à tout sacrifier pour leurs enfants… Je sais à quel point vous êtes fier d'avoir un enfant « Dr » … Laissez moi vous dire à quel point je suis fier de vous avoir comme parent… Je n'ai qu'une chose à vous dire…Merci, Merci et encore Merci.

Je termine ces remerciements par les personnes qui me sont les plus chères et dont les sourires me comblent de bonheur chaque jour, mon fils, David et ma femme, Celine...Je vous aime plus que tout

Résumé

Les cellules souches pluripotentes d'origines embryonnaires (cellules hES) ou induites à la pluripotence (cellules iPS) possèdent deux propriétés essentielles, l'autorenouvellement et la pluripotence. Ces deux propriétés font de ces cellules une ressource biologique unique pour l'étude des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans le développement embryonnaire précoce.

L'objectif de mes travaux a, dans un premier temps, été de mettre en place des modèles expérimentaux permettant l'engagement des cellules hES et iPS dans les deux principaux types cellulaires de l'épiderme : Les kératinocytes et les mélanocytes. J'ai ainsi participé à l'élaboration d'un protocole permettant d'orienter la différenciation des cellules hES vers un phénotype épithélial. Ce protocole démontre que les cellules souches pluripotentes se différencient *in vitro* selon un programme génétique similaire à celui qui régit le développement embryonnaire *in vivo*. En effet nous montrons dans cette étude, qu'au cours du processus de différenciation, les cellules souches pluripotentes acquièrent dans un premier temps un phénotype épithélial simple, avant de s'engager dans le lignage kératinocytaire et exprimer les marqueurs caractéristiques des kératinocytes basaux de l'épiderme. Par ailleurs nous montrons également que placées dans les conditions permettant leur différenciation terminale, ces cellules sont capables de générer un épiderme pluristratifié normal à la fois *in vitro* et *in vivo.* La deuxième partie de ma thèse a donc consisté à différencier ces cellules souches pluripotentes en une population pure et homogène de mélanocytes. Ces travaux actuellement en cours de publication démontrent qu'une fois différenciées, ces cellules présentent une morphologie dendritique similaire à celle de mélanocytes adultes, qu'elles expriment l'ensemble des marqueurs de la mélanogénèse et qu'elles sont capables de transférer leurs mélanosomes à des kératinocytes en coculture.

Sur la base de ces résultats, la dernière partie de ma thèse a eu pour but de comprendre le rôle d'une nouvelle classe de régulateurs développementaux récemment mis en évidence : Les microARNs. J'ai ainsi entrepris une analyse comparative des profils de microARNs au cours de l'engagement épithélial de cellules hES et mis en évidence un set de quatre microARNs (miR-200a, miR-203, miR-205 et miR-429) spécifiquement surexprimé au fur et à mesure de ce processus de différenciation. L'analyse fonctionnelle réalisée sur des progéniteurs épithéliaux en cours de différenciation a par la suite démontré que seul miR-203 pouvait contrôler ce processus. Enfin j'ai participé à la mise en évidence du rôle des microARNs dans le contrôle de la spécification neurale des cellules hES sur la base d'un protocole combinant l'inhibition de la voie des BMPs avec celle de la voie Activine/Nodal. A

l'issue de ce projet, nous avons démontré que la prise de décision dans l'engagement neural des cellules hES était comprise entre 2 et 5 jours et qu'un microARN, miR-125a, était directement impliqué dans le contrôle de ce processus

L'ensemble de ces données démontre que les cellules souches pluripotentes représentent un modèle pertinent pour étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le contrôle du développement embryonnaire humain. Nous avons ainsi démontré que la différenciation des cellules souches pluripotentes dans le lignage épidermique respectait la chronobiologie du développement et mis en évidence le rôle régulateur de deux microARNs dont les fonctions n'avaient pas été identifiées, à ce jour, dans le développement embryonnaire humain.

Mots clés : Cellules souches embryonnaires humaines, cellules souches induites à la pluripotence, Différenciation, Keratinocytes, Mélanocytes, microARNs

Abstract

Human embryonic stem cells (hESC) and induced pluripotent stem cells (iPSC) are characterized by their two fundamental properties: pluripotency and self-renewal. Due to these unique capacities, pluripotent stem cells offer a virtually unlimited biological resource capable to differentiate into any cell type of the organism. In parallel to their great potential for regenerative medicine, these cells represent a unique in vitro model of early human development. The aim of this thesis is to investigate the molecular and cellular events occurred during epidermis formation in the Human. The first objective of this work was to set up protocols to differentiate pluripotent stem cells, (hES and iPS) into the two major cell types of epidermis: Keratinocytes and Melanocytes. Thus I have participated to the development and the characterization of a protocol leading to the derivation of a pure, homogeneous and functional population of keratinocytes. We demonstrated in this study that pluripotent stem cells engaged in the epithelial lineage respected a genetic program similar to embryonic development with first the acquisition of a simple epithelium phenotype before to express markers of basal layer keratinocytes. We then reported that these pluripotent stem cells derived keratinocytes were able to generate a functional pluristratified epidermis as well as *in vitro* and *in vivo*. The second part of this thesis was to define the conditions to derivate melanocytes from pluripotent stem cells. This work, currently under publication, demonstrated that pigmented progenitors cells can be obtain either from hES or iPS can be secondarily differentiate into a pure population of cells presenting all the characteristics of melanocytes in term of morphology, expression profile and capacity to produce and secrete melanosomes.

In parallel to this work the last part of my thesis was to study the role of a new call of developmental regulator: MicroRNAs. Thus, I performed High Throughput microRNAs profiling experiments and identified a set of four microRNAs involved in the epithelial commitment of hES cells (miR-200a, miR-203, miR-205 et miR-429). Functional gain and loss of function analysis were performed and confirmed the crucial role of miR-203 during human embryonic epidermis development. Finally, I participate to the identification of miR-125a in early neural development induced by the dual inhibition of BMPs and Activin/Nodal pathways.

Taken together, all these data demonstrate that human pluripotent stem cells represent a unique model to study molecular and cellular mechanisms involved in early embryonic development in the Human. By defining experimental procedure to differentiate these cells into pure populations of keratinocytes, melanocytes and neural progenitors we have been able to demonstrate that pluripotent stem cells follow the entire chronobiology of embryonic

development and highlighted the regulatory functions of two microRNAs previously described in the mouse but never identified in the Human.

Key words: Embryonic stem cells, Induced pluripotent stem cells, Differentiation, Keratinocytes, Melanocytes, MicroRNAs

Liste des abréviations

ACE : Antigène carcino embryonnaire

ACTH : Adrenocorticotropic hormone

Adh+++ : Cellules à forte capacité d'adhérence

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADULT: Acro-dermato-ungual-lacrymal-tooth

AEC: Ankyloblepharon-ectodermal dysplasia-clefting

AEM: Antigène epithélial membranaire

Ago: Argonaute

AMP: Assistance médicale à la procréation

AMPc: Cyclic adenosine mono- phosphate

AP-1: Activator protein-1

ARNm: A*cide ribonucléique* messager

ASP: Agouti signaling protein

ATP: Adénosine triphosphate

bFGF: Fibroblast growth factor basique

BMP4: Bone morphogenetic protein 4

BMPs; Bone morphogenetic proteins

BPAG-1 et 2 : Antigène majeur de la pemphigoide bulleuse 1 et 2

BrdU: Bromodeoxyuridine

CAD11: Cadherin 11

CamKII: Ca 2+ /Calmodulin-dependent protein kinase II

CD71: Cluster of differentiation 71 ou récepteur de la transferrine

Cdk4: Cyclin-dependent kinase 4

CFE: Colony-forming efficiency

CMH: complexe majeur d'histocompatibilité

Co-Smads: Common mediator Smads

CREB: cAMP response element binding protein

CSE: Cellules souches épidermiques

DDI et II: Dendrocytes dermiques de types I et II

DGCR8: DiGeorge syndrome critical region 8

DHICA: 5,6 dihydroxyindole-2 carboxylique

DOPA: 3,4-dihydroxyphénylalanine

DRO: Dérivés Réactifs de l'Oxygène

EB: Embryoid body

EB: Epidermolyse bulleuse

EBD: EB dermolytiques ou dystrophiques

EBH: Epidermolyse bulleuses héréditaires

EBJ: EB jonctionnelles

EBS: EB épidermolytiques ou simples

EC: Embryonal carcinoma

ECVAM: European center for the validation of alternative methods

Edn3: Endothelin 3

Ednrb: Endothelin receptor type B

EEC: Ectrodactyly-ectodermal dysplasia-clefting

EGF: Epidermal growth factor

EGFR: Recepteur à l'EGF

EpiSC: Epidermal Stem Cells

EPU: Epidermal proliferative units

ES: Embryonic stem cells

FACS: Fluorescent-activated cell sorting

FDA: Food and Drug Administration

FGFs: Fibroblast growth factors

FIV Fécondation In Vitro

FMR1: Fragile X mental retardation 1

FZD3: Frizzled-3

GMP: Good manufacturing practice

GMPc: Cyclic guanosine monophosphate

HD: Hemidesmosomes

hES: Human embryonic stem cells

HK: Kératinocytes adultes humains

HLA: Human Leucocyte Antigen

HMG: High Mobility Group

HNK1: Human natural killer-1

HTS: High-throughput screening

Id: Inhibitor of differentiation

IGF2: Insulin-like growth factor 2

IGFBP3: Insulin-like growth factor binding protein 3

iPS: Induced pluripotent stem cells cellules

I-Smads: Inhibitory Smads

K-hESC: Kératinocytes dérivés de cellules hES

Kit: Cytokine receptor

KO: Knock out

KSR: Knock-out serum replacement

LEKT1: Lympho-Epithelial Kazal-Type I

LMS: Limb-Mammary Syndrome

LRC: Label retaining cells

MAPK: Mitogen-activated protein kinase

MAPKKK: MAP kinase kinase kinase

Mart-1: Melanoma-associated antigen recognized

MC1R: Melanocortin-1 receptor

MCI: Masse cellulaire interne

MDR: Multidrug resistance

MEFs: Mouse embryo fibroblasts

Mel-hESC: Mélanocytes dérivés de cellules hES

Mel-iPSC: Mélanocytes dérivés de cellules iPS

mES: Mouse embryonic stem cells

MGF: Mast cell growth factor

MITF: Microphthalmia-associated transcription factor

MO: Morpholino oligonucleotides

MSC-hESC: Cellules souches mésenchymateuses dérivées de cellules hES

NC: Crête neurale

NCAM: Neural cell mdhesion molecule

NEP: Cellules neuro-epithéliale

NO: Monoxyde d'Azote

NPC-hESC: Progéniteurs neuraux dérivés de cellules hES

Oct4: Octamer-4

OM-1: Antigène de cystadénocarcinome ovarien

PAX: Paired box

PcG: Polycomb group

PCR: Polymerase Chain ceaction

PKA: Protein kinase A,

PKC: Protein kinase C

PKG: Protein kinase G

Pmel17: Melanocyte-specific glycoprotein 17

POU5F1: POU class 5 homeobox 1

Rab27a: Ras-related protein 27a

REACH: Registration, evaluation and authorization of chemicals

REST: RE-1-silencing transcription factor

RISC: RNA induced silencing complex

RPE: Retinal pigmentary epithelium

R-Smads: Receptor regulated Smads

SCF: Stem cell factor

SCID: severe combined immune deficient

SDIA: Stromal cell-Derived Inducing Activity

SFRP2: Secreted Frizzled Related Protein 2

SHFM: Human Split-Hand/Foot Malformation

Shh: Sonic hedgehog

siARNs: Small inteferring RNAs

Smads: Mothers against decapentaplegic homolog

SNC: système nerveux central

SOX: sex determining region Y box

SP: Side Population

SRF: serum response factor

SRY: Sex determining factor

SSEA: Stage Specific Embryonic Antigen

SVF: Sérum de veau foetal

TA: Transient Amplifying

TERT: Telomerase reverse transcriptase

TGFβ: Transforming growth factor β

TP63: Tumor Protein 63

TRA-1-60: Tumour Rejection Antigen

TRP1: Tyrosinase related protein 1

TRP2: Tyrosinase related protein 2

TrxG: Trithorax group

TYR: tyrosinase

UE: Union Européenne

UTR: UnTranslated Region

UV: Ultraviolets

Wnt: Wingless integration site

αMSH : α melanocyte stimulating hormone

Plan

INTRODUCTION 15
I. Structure et fonctions de la peau humaine 16
A. L'épiderme 17
1. Structure de l'épiderme 17
2. Les différents types cellulaires de l'épiderme 18
2.1. Les keratinocytes 18
2.1.1. Le processus de kératinisation 19
2.1.2. Les cellules souches épidermiques 19
2.1.3. Régulation de la capacité proliférative des kératinocytes par p63 25
2.1.4. Régulation de la différenciation des kératinocytes 26
2.2. Les mélanocytes 27
2.2.1. Le mélanosome: Siège de la production de mélanine 28
2.2.3. Mécanismes de régulation de la mélanogénèse 30
2.3. Les autres types cellulaires de l'épiderme 33
2.3.1. Les cellules de Langerhans 33
2.3.2. Les cellules de Merkel 33
B. La jonction dermo-épidermique 33
C. Le derme 35
1. Les annexes cutanées 35
2. Les cellules résidentes du derme 37
D. L'hypoderme 37
II. Cellules souches pluripotentes et développement ectodermique 38
A. Régulation des premières étapes de l'ontogenèse 38
1. De la segmentation à la gastrulation 39
2. La neurulation : Spécification du feuillet neurectodermique 41
3. Mécanismes moléculaires régulant l'ontogenèse 44
3.1. De l'épiblaste à l'épiderme 44
3.2. Rôle centrale de la BMP4 dans l'engagement épidermique 45
3.3. Rôle de p63 dans le développement épidermique 49
4. Morphogénèse du système nerveux central à partir du tube neural 51
5. De la crête neurale aux mélanocytes : 52
5.1. Généralités 52
5.2. Induction du lignage mélanocytaire 53
5.3. Les facteurs clés de la différenciation mélanocytaire 54
B. Les cellules souches pluripotentes 58
1. Cellules souches embryonnaires humaines 58
1.1 Origine, dérivation et propriétés des cellules hES 58
1.2 Potentiel thérapeutique des cellules hES 60
2. Les cellules souches pluripotentes induites (iPS) 61
2.1 Mécanismes de reprogrammation des cellules iPS 61
2.2 Intérêt des cellules iPS en thérapie cellulaire 63
3. Caractéristiques des cellules souches pluripotentes 64
3.1. Les facteurs clés de la pluripotence et de l'autorenouvellement 65
3.2. Les voies de signalisation 65
4. Loi de bioéthique et recherche sur les cellules hES en France 67
C. Différenciation des cellules souches pluripotentes dans le lignage ectodermique 68
1. Différenciation des cellules souches pluripotentes en kératinocytes 68
1.1. Induction ectodermique des cellules ES par la BMP4 et son inhibiteur Noggin 68
1.2. ΔNp63 et différentiation kératinocytaire des cellules ES 70

1.3. Différenciation des cellules souches embryonnaires de souris (cellules mES) en kératinocytes....71
1.4. Différenciation des cellules souches embryonnaires humaines (cellules hES) en kératinocytes....72
2. Induction des cellules hES dans le lignage neural....75
3. Différenciation des cellules souches pluripotentes dans le lignage mélanocytaire....77
3.1. Dérivation de cellules souches pluripotentes en cellules de la crête neurale....77
3.2. Implication du Wnt3A, de SCF et de l'EDN3 dans l'engagement de la différenciation mélanocytaire des cellules ES....78
3.3. Dérivation de mélanocytes à partir de cellules mES et hES....80
III Régulation des premières étapes du développement par les microARNs.... 84
A. Les microARNs : Une nouvelle classe de régulateurs 84
1. Biogénèse des microARNs....84
2. Mécanismes de régulation de l'expression des microARNs....84
B. Fonctions régulatrices des microARNs au cours du développement embryonnaire.... 86
1. Rôle des microARNs dans le développement neural....86
2. MicroARNs et développement épidermique....87
C. Rôle des microARNs dans les cellules souches pluripotentes.... 89
1. MicroARNs et cellules ES....89
2. Régulation de la différenciation des cellules hES par les microARNs....90
3. Rôle des microARNs dans la régulation de la pluripotence....92
IV Problématique 93

RESULTATS.... 94
I. Dérivation d'une population pure et homogène de kératinocytes à partir de cellules souches embryonnaires humaines.... 95
A. Etude du potentiel de différenciation des cellules hES in vitro dans le lignage kératinocytaire.... 95
B. Caractérisation phénotypique de la population de kératinocytes dérivés de cellules hES (K-hESC).... 96
C. Reconstruction d'épiderme in vitro et in vivo à partir de kératinocytes dérivés de hES (K-hESC).... 96
D. Conclusion 97
II. Différenciation de cellules souches pluripotentes humaines en mélanocytes 116
A. Engagement des cellules hES dans le lignage mélanocytaire 116
B. Caractérisation moléculaires des mélanocytes dérivés de hES (mel-hESC) et de cellules iPS (mel-iPSC).... 117
C. Caractérisation fonctionnelle des mélanocytes dérivés de hES (mel-hESC) et de cellules iPS (mel-iPSC).... 118
D. Conclusion 118
III. Mise en évidence du rôle de miR-203 dans la différenciation de cellules hES en kératinocytes.... 120
A. Evolution du miRnome au fur et à mesure de l'engagement des cellules hES dans le lignage épithélial 139
B. Rôle de miR-203 dans l'engagement épithélial.... 140
C. Rôle de miR-203 dans la différenciation terminale des kératinocytes 141
D. Conclusion 141
IV. Régulation de l'engagement neural des cellules hES par miR-125a 166
A. Induction neurale des cellules hES en milieu « N2B27 » *in vitro*.... 166
B. Effets des inhibiteurs Noggin et SB431254 sur l'induction neurale des hES *in vitro*. .. 167

C. Etude du rôle des microARNs dans l'induction neurale des hES *in vitro*. 168
D. Conclusion. 169

DISCUSSION et PERSPECTIVES 197
I. Etude des mécanismes moléculaires et cellulaires du développement embryonnaire humain 198
A. Implication des voies de signalisation BMPs, Wnt et Activin/Nodal dans la différenciation des cellules hES 198
B. Régulation du processus de différenciation par les facteurs de transcription clés de la pluripotence (NANOG) et des différents lignages (p63, PAX6 et MITF) 200
C. Mise en évidence du rôle des microARNs dans la différenciation des cellules hES : ... 201
II. Cellules souches pluripotentes et modélisation pathologique 203
A. Modélisation pathologique des maladies monogéniques 203
B. Modélisation pathologique et cellules iPS 203
C. Kératinocytes dérivés de cellules souches pluripotentes et étude des génodermatoses . 204
D. Melanocytes dérivés de cellules souches pluripotentes et modélisation des génodermatoses pigmentaires 205
E. Développement mélanocytaires humains et mélanomes 206
III. Thérapie cellulaire de l'épiderme 208
A. Cellules souches pluripotentes et thérapie cellulaire 208
B. Utilisation des kératinocytes dérivés de cellules souches pluripotentes pour la thérapie cellulaire des grands brulés 208
IV. Utilisation des cellules souches pluripotentes pour le criblage à haut débit et les études de toxicologie prédictive 210
A. Epidermes dérivés de cellules pluripotentes : Un challenge pour les industries pharmaceutiques, chimiques et cosmétiques 211
B. Les études de toxicologies prédictives et de criblage à haut débit sur des dérivés de cellules souches pluripotentes 211
V. Conclusions 212

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 214

ANNEXES 238
I. Annexe 1: Brevet déposé auprès de l'organisme « U.S. Patent and Trademark Office », intitulé: « Methods for Preparing Human Melanocytes from Human Pluripotent Stem Cells ». 239
II. Annexe 2 Revue publiée dans la revue Medecine/Science intitulée « Les cellules souches pluripotentes font peau neuve ». 240
III. Annexe 3: Revue publiée dans la revue Regenrative Medicine intulée « Epidermis grafting : From adult to embryonic stem cells ». 241
IV. Annexe 4: Article publié dans la revue Tissue engineering intitulée « Improvement of Culture Conditions of Human Embryoid Bodies Using a Controlled Perfused and Dialyzed Bioreactor System » 242

INTRODUCTION

I. Structure et fonctions de la peau humaine

Plus qu'une simple enveloppe, la peau est un organe à part entière. Elle protège les autres organes des agressions extérieures en formant une solide barrière continue. L'une des principales fonctions de la peau est de protéger l'individu de la déshydratation en limitant la perte d'eau mais également des agressions chimiques, des rayons UVs (Ultraviolets), des infections et assure le maintien de la température corporelle. En plus de ses fonctions protectrices la peau est également un organe sensitif doué d'une extrême sensibilité, en partie due à sa richesse en fibres sensitives. Avec une surface d'environ 2 m² et un poids moyen représentant 15 % de celui d'un adulte, la peau est l'organe le plus important du corps humain. Elle est composée de deux principaux tissus, l'épiderme, qui siège à l'extérieur, et un tissu conjonctif qui comporte le derme et l'hypoderme (Figure 1). Sa destruction ou son altération a des conséquences extrêmement graves pour l'organisme, pouvant rapidement entrainer la mort. Ces deux dernières décennies, les avancées technologiques effectuées dans le domaine de la médecine régénérative ont permis d'améliorer considérablement le pronostic vital des patients. Nous décrirons dans le présent manuscrit le potentiel des cellules souches pluripotentes comme ressource biologique dans le cadre de protocoles de thérapie cellulaire cutanée mais également comme outil pour étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans la formation de l'épiderme chez l'humain.

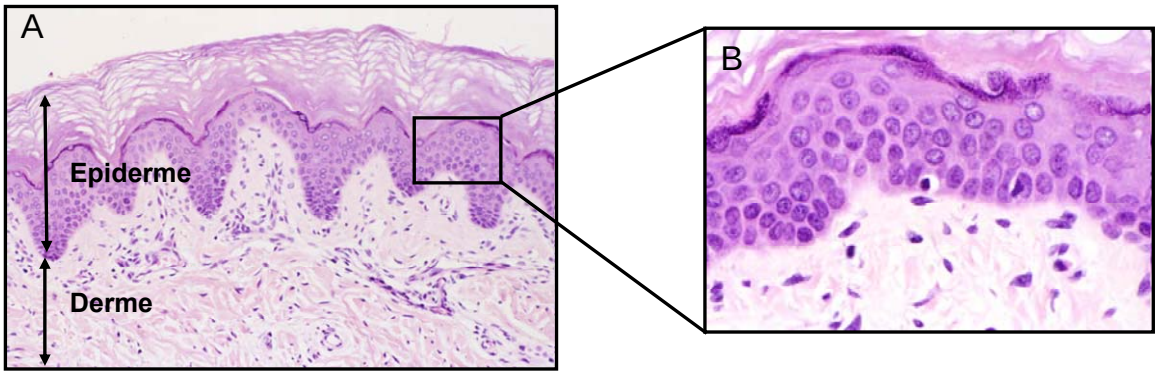


Figure 1: Coupe histologique de peau humaine.
Coloration à l'Eosine Hématoxiline d'une coupe de peau (A) et d'épiderme (B).

A. L'épiderme

1. Structure de l'épiderme

L'épiderme (du grec epi, dessus et derma, la peau) constitue la couche la plus superficielle de la peau (Figure 2). C'est un épithélium pluristratifié, majoritairement composé de kératinocytes, dont la face profonde est déprimée par des digitations (papilles dermiques). Sa face superficielle est plane et criblée de nombreux orifices correspondants aux ostiums pilaires et aux pores sudoraux. Chez l'homme, cette structure est continuellement renouvelée tous les 28 jours. La desquamation des cellules à la surface de la peau est ainsi naturellement compensée par le renouvellement de l'épiderme qui est assuré par les kératinocytes. Bien que les kératinocytes soient le type cellulaire majoritaire de l'épiderme (85% des cellules de l'épiderme), d'autres cellules y cohabitent et y jouent un rôle non moins indispensable, c'est notamment le cas des mélanocytes, des cellules de Langerhans ainsi que des cellules de Merkel.

Il est ainsi possible de distinguer 4 couches cellulaires distinctes dans l'épiderme (Figure 2) :

- La couche basale : Constituée d'une rangée unique de kératinocytes, elle joue un rôle important dans la régénération épidermique. C'est dans la couche basale que l'on trouve les cellules souches de l'épiderme autrement appelées CSE (cellules souches épidermique ou EpiSC pour Epidermal Stem Cells) ainsi que les mélanocytes et les cellules de Merkel
- La couche épineuse (autrement appelée couche malpighienne ou stratum spinosum) : Constituée de 5 à 10 couches de kératinocytes superposés qui s'aplatissent au fur et à mesure de leur ascension et de leur différenciation (voir chapitre « Kératinisation ». Cette couche cellulaire est également le siège des cellules de Langerhans.
- La couche granuleuse (ou stratum granulosum) : Elle est formée de 1 à 3 couches de kératinocytes disposées parallèlement à la surface cutanée. Le caractère essentiel des cellules de cette couche est la présence des grains de kératohyaline, principalement composés d'une protéine riche en histidine : la profilaggrine. Les dernières couches possèdent des kératinosomes qui interviennent dans la desquamation et la formation d'un manteau lipidique pericellulaire.
- La couche cornée (ou stratum corneum) : Constituée de 5 à 10 assises de cornéocytes (cellules énucléées), cette couche assure un rôle de barrière hermétique de l'organisme.

Les cellules qui composent l'épiderme jouent donc des rôles de première importance dans la protection de l'organisme et contre les agressions extérieures autant d'un point de vue structural (kératinocytes et mélanocytes) qu'immunitaire (Cellules de Langerhans) ou nerveux (cellules de Merkel).

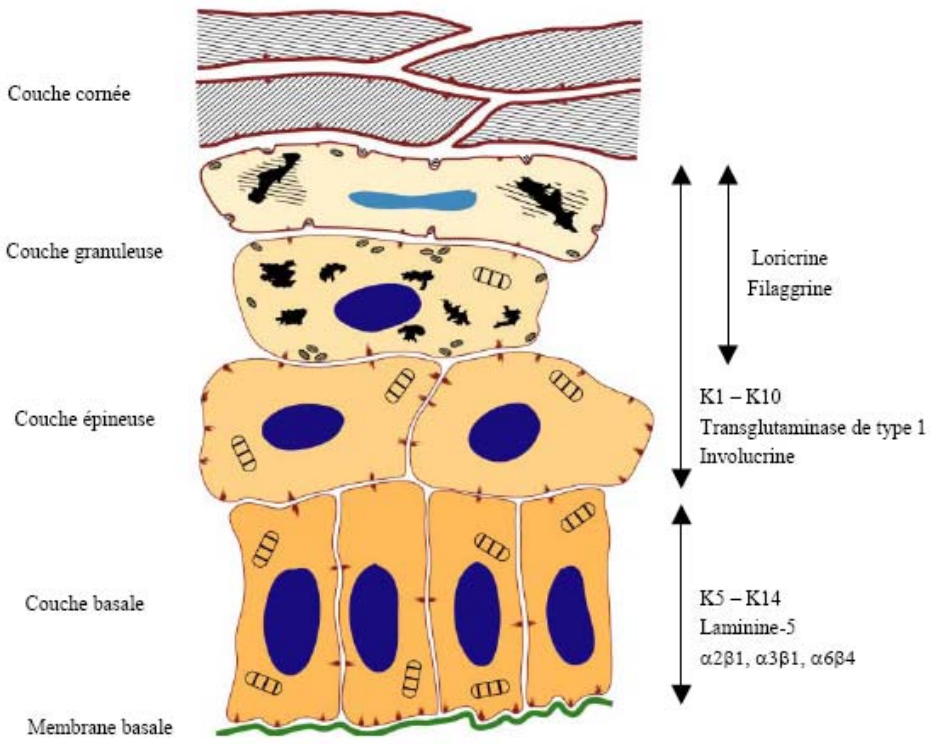


Figure 2: Représentation schématique des différentes couches de l'épiderme humain.

2. Les différents types cellulaires de l'épiderme

2.1. Les keratinocytes

Les kératinocytes sont des cellules épithéliales, synthétisant principalement des kératines (environ 95% des protéines totales de l'épiderme). Ces kératines sont des protéines fibreuses organisées en tonofilaments qui forment avec les microfilaments d'actine et les microtubules le cytosquelette des kératinocytes. La différenciation des kératinocytes, durant le processus de kératinisation, s'accompagne d'un ensemble de transformations morphologiques et biochimiques qui aboutit à la formation de cornéocytes qui desquament à la surface de la peau, les cornéocytes (Figure 2).

Les kératinocytes ont trois fonctions principales :

- Ils assurent la cohésion de l'épiderme par leur cytosquelette et les systèmes de jonction d'adhésion qu'ils établissent entre eux (desmosomes) et avec la matrice extracellulaire (hemidesmosomes).
- Ils forment une barrière entre le milieu extérieur et le milieu intérieur au niveau de la couche cornée.
- Ils protègent l'organisme des radiations lumineuses grâce aux mélanosomes de stade IV qu'ils ont phagocyté à partir des mélanocytes.

2.1.1. Le processus de kératinisation

Durant le phénomène de kératinisation (renouvellement de l'épiderme) les kératinocytes mettent successivement en œuvre leurs deux propriétés principales: celle de se diviser activement et de se différencier. En se différenciant, les keratinocytes migrent vers les couches supérieures, s'aplatissent, et finalement perdent leur noyau. Ils déversent dans l'espace extracellulaire des lipides, cholestérol, acides gras libres saturés et céramides, qui assurent la cohésion entre les cellules et contribuent ainsi au rôle de barrière de l'épiderme. Parvenus à la partie la plus superficielle de l'épiderme, les kératinocytes deviennent des cornéocytes, cellules anucléées et aplaties, remplies de kératine, protéine insoluble dans l'eau conférant à l'épiderme, donc à la peau, sa fonction de protection.

Ces différentes couches épidermiques sont intimement liées entre elles. La cohésion intercellulaire est renforcée par la présence de desmosomes dont le nombre augmente au cours de la différenciation. Le processus de kératinisation s'accompagne d'importantes modifications biochimiques telles que l'expression de nouvelles kératines acides et basiques, notamment les kératines K1 et K10 dans les couches suprabasales et de nouvelles protéines de l'enveloppe des cornéocytes comme l'involucrine (pour revue Alibardi L et al., 2006). Il est ainsi possible de caractériser l'état de différenciation des kératinocytes de l'épiderme en fonction de l'expression de certains marqueurs représentés sur la figure 2.

2.1.2. Les cellules souches épidermiques

-Fonction et localisation des cellules souches épidermiques

Trois types de kératinocytes ont été identifiés au niveau de la couche basale de l'épiderme, les CSE, les cellules d'amplification transitoires (TA pour Transient Amplifying) et les cellules différenciées. Les CSE sont définies comme des cellules dotées d'un fort potentiel de prolifération et d'une capacité à régénérer l'ensemble des couches de l'épiderme. Elles s'identifient grâce à leur faible cycle cellulaire (bloqué en phase G0/G1 du cycle cellulaire). Ces dernières années certaines preuves de l'existence des CSE ont été apportées dans la région appelée bulge (situé au niveau du follicule pileux) ainsi que dans l'épiderme interfolliculaire où elles représenteraient environ moins de 1% des kératinocytes basaux.

- Le bulge est une région située au niveau de la couche radiculaire externe du follicule pileux, en dessous de la glande sébacée. Au niveau du bulge, les CSE résident dans un compartiment spécialisé que l'on appelle la niche, région capable de générer un microenvironnement permettant aux CSE de se diviser lentement et de rester indifférenciée. Lorsque l'épiderme est endommagé, les CSE du bulge sont recrutées et migrent vers la couche basale de l'épiderme (Alonso L et al., 2003) et vers la base

du follicule pileux pour se différencier (Oshima H et al., 2001) et participer à sa régénération.

- Au niveau de l'épiderme interfolliculaire la localisation des CSE est très controversée mais certaines études les ont identifiées au sommet des papilles dermiques (prépuce et peau mammaire) ou en profondeur au niveau des crêtes épidermiques (épiderme palmo plantaire) (Cotsarelis G et al.,1999 ; Watt FM et al., 2009)

Comme toutes les cellules souches adultes somatiques, les CSE ont pour caractéristique de générer à chaque division soit deux cellules souches filles identiques (division symétrique) soit une cellule souche fille qui s'engagera dans le processus de différenciation (division asymétrique). Cette dernière qui initie le programme de différenciation est appelé cellule TA (Mackenzie, IC 1970). Les cellules TA sont également localisées dans la couche basale de l'épiderme et vont subir un nombre limité de divisions avant de s'engager dans la différenciation terminale (Fuchs E et al., 2002, Mackenzie IC, 1997). Des études réalisées chez la souris ont démontré que ces cellules souches se situaient à la base des EPU (unités prolifératives épidermiques) et s'organisent en clusters comprenant à la fois les cellules souches, les cellules TA et leurs descendantes différenciées dans les couches supérieures (Potten CS et al., 1974) (Figure 3). L'étape suivante de différenciation des cellules TA est leur différenciation en kératinocytes basaux post-mitotiques qui demeurent en contact avec la membrane basale, mais ne se divisent plus. Ces cellules commencent par ailleurs leur processus de différenciation et de migration en se détachant de la membrane basale.

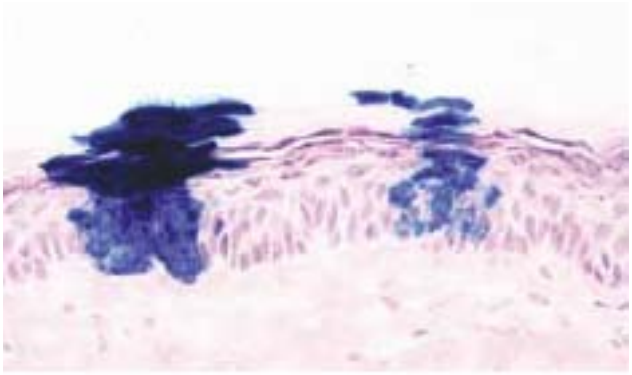


Figure 3: Les unités prolifératives épidermiques (EPU).
Reconstruction de tissus illustrant des unités de proliferation épidermiques selon le modèle de Potten. La photo représente un épiderme de souris 37 semaines après une dermabrasion et une infection avec un rétrovirus encodant la β galactosidase. Le marquage bleu est effectué par l'ajout de Xgal.
Source : Kaur Pet al., 2006. Interfollicular epidermal stem cells: identification, challenges, potential.

-Identification des cellules souches épidermiques

Bien qu'essentielles dans l'homéostasie de la peau et dans la réparation cutanée, les CSE restent encore mal caractérisées. Initialement ce sont les travaux de Yann Barrandon et Howard Green qui définirent les conditions de culture permettant d'évaluer la capacité proliférative d'une population de keratinocytes afin d'en déduire son potentiel « souche »,

(Barrandon Y and Green H, 1987). Ainsi la réalisation d'un test de clonogénicité consiste à ensemencer les kératinocytes dans des conditions clonales permettant de distinguer trois types de clones : Les holoclones (cellules à fort potentiel prolifératif), les paraclones (cellules partiellement différenciées à très faible potentiel prolifératif) et les méroclones (cellules présentant un potentiel prolifératif intermédiaire) (Figure 4). La taille et la morphologie des colonies obtenues dans ce type de test sont directement reliées au stade de différenciation ou d'immaturité des cellules étudiées. Ainsi, une population de kératinocytes riche en cellules souches ou progéniteurs très immatures produira un nombre de colonies plus important et de plus grande taille qu'une population majoritairement constituée de kératinocytes engagés dans la différenciation.

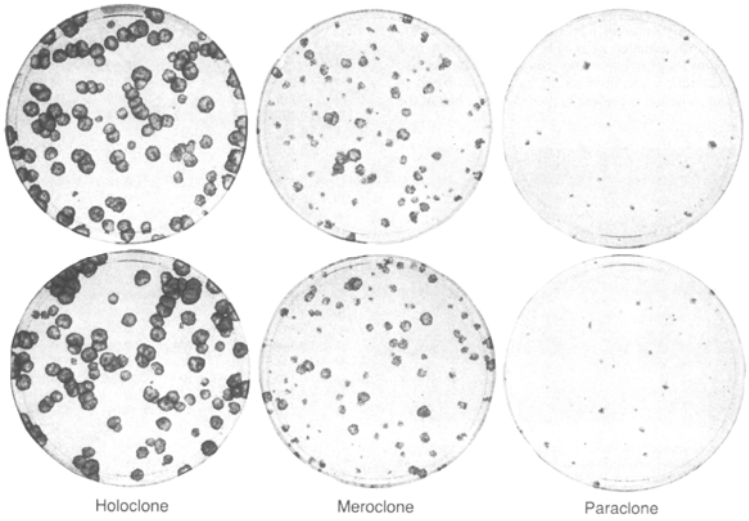


Figure 4: Evaluation de l'efficacité clonogénique d'une population de kératinocytes.
Le potentiel souche d'une population cellulaire est mesuré par la réalisation d'un test de clonogénicité Pour cela les cellules sont ensemencées `à faible densité permettant de distinguer le nombre et la taille des clones générés après 14 jours de culture.. Ce type d'observation conduit `a désigner comme "holoclones" les clones issus de cellules souches épidermiques, comme "méroclones" les clones issus de progéniteurs précoces, et comme "paraclones", les clones issus de progéniteurs tardifs.
Source : Barrandon Y & Green H, 1987. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication.

Sur la base de ces travaux, différentes stratégies ont tenté de déterminer une signature moléculaire de ces cellules souches. L'identification d'un marqueur membranaire de ces cellules à fort potentiel prolifératif permettrait de les identifier de manière prospective, de les trier et ainsi d'obtenir des populations de cellules suffisamment prolifératives pour révolutionner la médecine régénérative cutanée. A ce jour aucun gène spécifique des CSE n'a clairement été identifié même si quelques marqueurs ont été proposés principalement par la réalisation d'études transcriptomiques différentielles (Fortunel NO et al., 2003). Les premières études décrivant des marqueurs des CSE ont ainsi démontré que celles ci exprimaient un fort niveau d'intégrine β1 et d'intégrine α6 (Jones PH and Watt FM,1993 ; Tumbar T et al., 2004). En effet, les kératinocytes humains expriment plusieurs récepteurs de

la famille de l'Intégrine, leur quantité et leur degré d'activation jouent un rôle important dans le contrôle de divers aspects de la différenciation épidermique et de la morphogenèse. Ainsi il a été montré que son niveau d'expression était deux à trois fois plus élevé dans les cellules TA que dans les kératinocytes post-mitotiques. Le récepteur de la transferrine (CD71) est un autre marqueur de surface qui diverge dans son expression entre les CSE et leur descendance. Ainsi il a été montré que les CSE exprimaient faiblement la protéine de surface CD71 mais une expression élevée d'intégrine α6 alors que le profil d'expression des cellules en division active, les cellules TA était inverse (Li A et al., 1998 ; Terunuma A et al., 2007). Sur la base de ces travaux, il a ainsi été proposé par le groupe de P. Kaur d'enrichir les cultures de kératinocytes en progéniteurs sur la base d'une combinaison de tri cellulaire intégrine $\alpha6^{+}/CD71^{-}$ (Figure 5) (Li A et al., 1998 ; Tani H et al., 2000 ; Rachidi W et al., 2007).

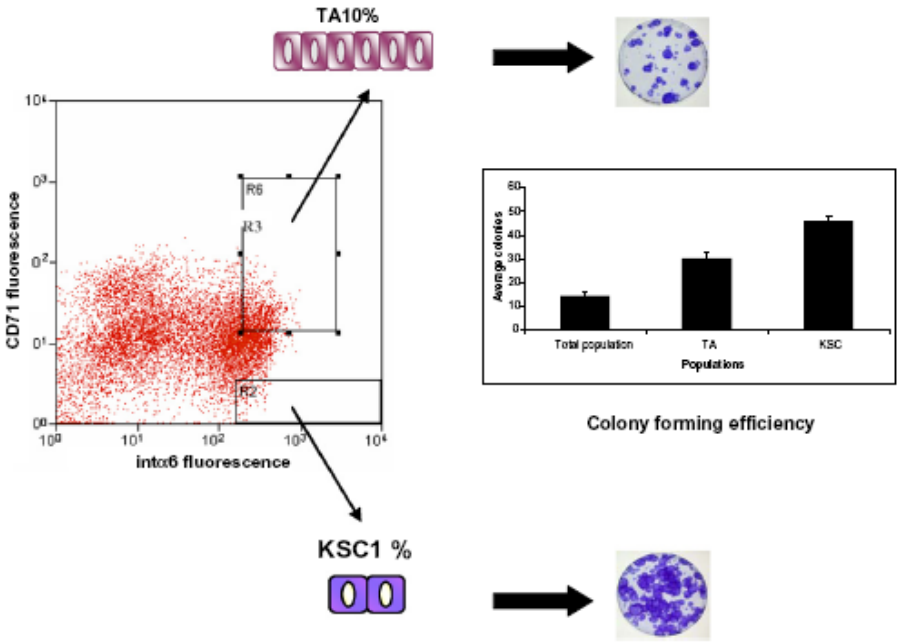


Figure 5: Isolation des CSE sur la base d'un tri Intégrine α6 +/ CD71-.
Dans cette expérience, des kératinocytes basaux ont été isolés à partir d'épidermes de prépuces néonataux et triés sur la base de leur niveau d'expression de l'intégrine α6 et du recepteur à la transferrine CD71. La population exprimant un fort niveau d'expression d'intégrine α6 associé à un faible niveau d'expression de CD71 (R2) représente 1 à 1,5% de la population totale et démontre être 4 fois plus clonogénique que la population totale et 2 fois plus que la population de cellules TA exprimant fortement CD71 (8 à 10% des cellules) (R3). Les résultats sont exprimés en moyenne de CFE (Colony Forming Efficiency) ± SD.
Source ;Walid Rachidi et al 2007. Sensing radiosensitivity of human epidermal stem cells.

En 2003, une étude intéressante a mis en évidence que les kératinocytes présentant une forte capacité d'adhérence sur un support plastique coaté au collagène de type I (Adh+++) et un faible niveau d'expression d'EGFR (recepteur à l'EGF (Epidermal growth factor) présentaient une capacité de prolifération accrue. Les auteurs de cette étude ont également démontré qu'ainsi isolée et amplifiée en culture (durant 7 passages), cette population de kératinocytes

« souches » présentait encore la capacité à reconstruire un épiderme in vitro suggérant son enrichissement en CSE (Figure 6) (Fortunel NO et al., 2003).

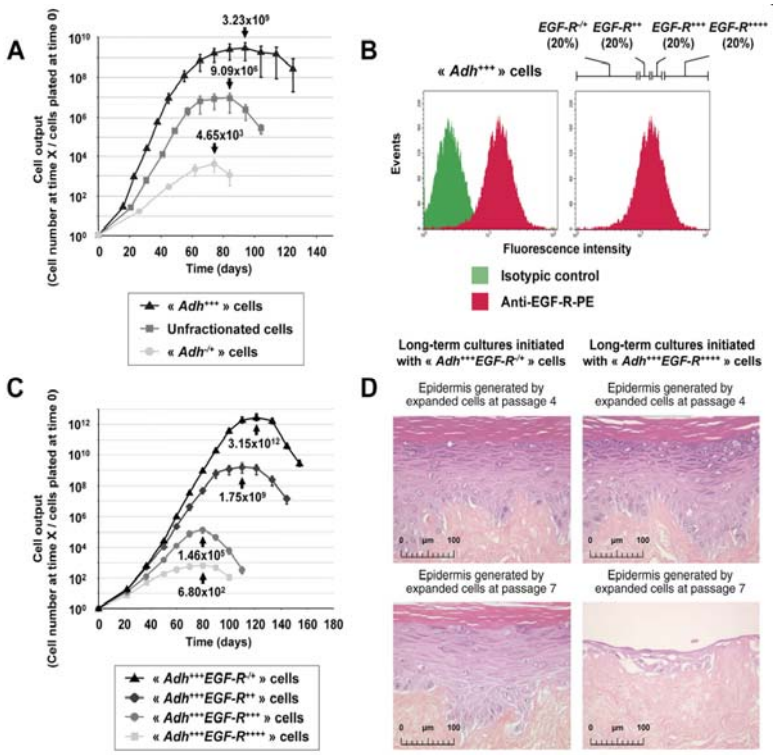


Figure 6: Caractérisation de la population de CSE triée sur la base de leur forte capacité d'adhérence et de leur faible expression du recepteur à l'EGF.
(A) Dans cette expérience, les kératinocytes basaux ont été subdivisés en deux population en fonction de leurs capacités à adhérer. Ainsi les cellues désignées Adh–/+ sont composées de cellules à faible capacité d'adhérence alors que les cellules Adh+++ sont composées de cellules à forte capacité d'adhérence.
(B) Les cellules Adh+++ ont dans un deuxième temps été subdivisées en quatre sous population en fonction de leur expression du recepteur à l'EGF (EGF-R) .
(C) L'étude du potentiel prolifération des cellules Adh+++EGF-R–/+ démontre qu'elles prolifèrent plus que les populations Adh+++EGFR++, Adh+++EGF-R+++ et Adh+++EGF-R++++.
(D) Finalement les auteurs de cette étude ont démontré que les cellules Adh+++EGF-R–/+ pouvaient encore générer un épiderme pluristratifié normal après des passages élevés (7 passages).
Source: Fortunel NO et al., 2003.Long-term expansion of human functional epidermal precursor cells: promotion of extensive amplification by low TGF-b1 concentrations.

Certaines équipes ont cherché à utiliser les propriétés physiques des cellules souches afin d'isoler des cellules progénitrices de l'épiderme. C'est ainsi que des cellules souches épidermiques ont été purifiées en adaptant la technique d'exclusion du Hœchst 33342 (Terunuma A et al., 2003 ; Larderet G et al., 2006) (Figure 7). En effet grâce à leurs capacités de détoxification importante, les cellules souches adultes ont la propriété d'exclure le colorant vital Hoechst 33342, via les transporteurs de la famille ABC (ATP-binding cassette transporter) ou MDR (multidrug resistance). Cette méthode permet d'identifier et trier une sous population cellulaire appelée population SP (Side Population) présentant des propriétés « souches ». Différentes études ont ainsi permis d'isoler des cellules souches de différents

lignages cellulaires tels que des cellules neurales (Mouthon MA et al., 2006), hématopoïétiques (Bertoncello I et al., 2004) ou mésenchymateuses (Summer R et al., 2007). Au niveau épidermique, l'analyse par FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) permet ainsi d'identifier et trier une sous population cellulaire (0,16% des cellules) exprimant fortement les marqueurs Intégrines α6, faiblement le recepteur CD71 à un potentiel prolifératif très élevé (Terunuma A et al., 2003). Des études plus récentes mais controversées ont par ailleurs démontré que cette population SP présentait encore la capacité de générer un épiderme pluristratifié normal à hauts passages (Larderet G et al., 2006).

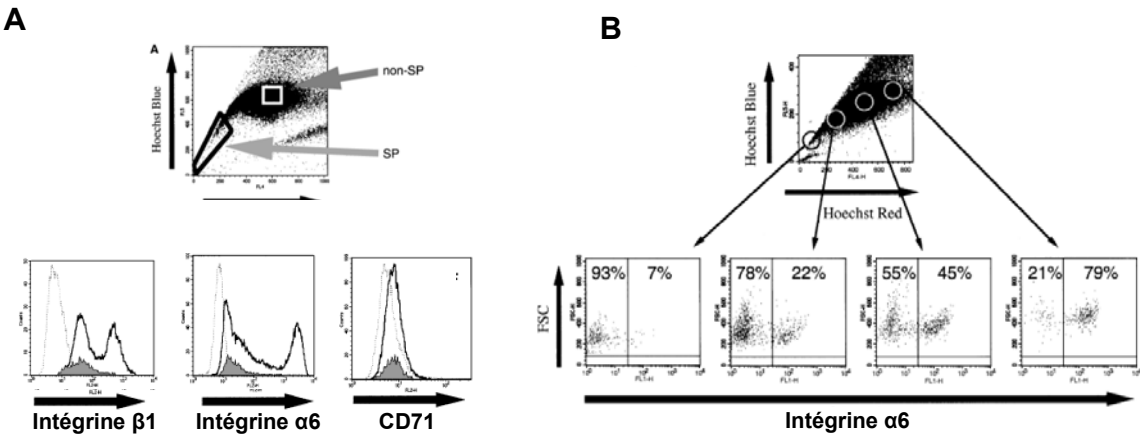


Figure 7: Détection de populations cellulaires souches par la méthode d'exclusion au Hoechst 33342.
(A) Ce schéma est représentatif de la méthode permettant de suivre l'exclusion du Hoechts 33342. Les cellules sont traitées 90 minutes au Hoechst 33342 (1 à 10µg/ml) puis passées au cymomètre de flux. La sous population SP (Side population), capable de l'exclure, est caractérisée par une expression forte des intégrines α6 et β1 et un niveau faible de CD71.
(B) A l'intérieur de la population SP, il apparait également que plus les cellules sont capables d'exclure le Hoechst, plus elles expriment l'intégrine α6.
Source: Terunuma A, et al 2003. Side population keratinocytes resembling bone marrow side population stem cells are distinct from label-retaining keratinocyte stem cells.

Enfin, la quiescence des cellules souches, identifiables par leur capacité de rétention d'intercalant de l'ADN (acide désoxyribonucléique) comme le BrdU (Bromodeoxyuridine) (administré à l'animal ou aux cultures), est souvent utilisée pour les reconnaître sur coupes histologiques. Les cellules retenant le BrdU sont alors appelées LRC (label retaining cells), Les cellules LRC ont été identifiées au niveau de la couche basale de l'épiderme plus de 8 semaines après leur marquage (Figure 8) et sont caractérisées par un fort niveau d'expression de l'Intégrine α6, un faible niveau de récepteur CD71 associé à un fort potentiel prolifératif (Terunuma A et al., 2003).

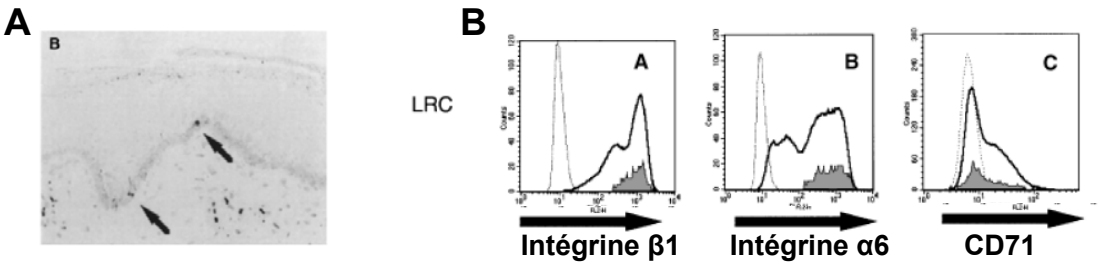


Figure 8: Cellules souches et capacité à retenir le BrdU. Identification de la population LRC (Bromodeoxyuridine (BrdU) label retaining cells).
(A) Cette expérience démontre que 8 semaines après la greffe d'épidermes générés à partir de kératinocytes pré-traités au BrdU (0,3M), une sous population de la couche basale (appelée LRC pour label retaining cells) est encore marquée (flèches noires).
(B) L'analyse par cryométrie de flux démontre que ces cellules expriment davantage les marqueurs des CSE (intégrines α6 et β1) et comme les CSE présentent une faible expression de CD71.
Source: Terunuma A et al., 2003. Side population keratinocytes resembling bone marrow side population stem cells are distinct from label-retaining keratinocyte stem cells.

2.1.3. Régulation de la capacité proliférative des kératinocytes par p63

Découvert en 1998, p63, qui est codé par le gène TP63 (Tumor Protein 63), fait partie de la famille des facteurs de transcription tels que p53 et p73. Il est localisé sur le bras long du chromosome 3 en position 3q27-28 et s'étend sur environ 60 kilobases (kb). Ce gène est composé de 15 exons et possède deux promoteurs, P1 localisé en amont de l'exon 1 et P2 situé à l'intérieur de l'intron 3. En fonction de l'un ou l'autre de ces deux promoteurs deux types d'isoformes peuvent être produits selon qu'ils contiennent un domaine de transactivation complet (TAp63) ou tronqué dans leur région N-terminale (ΔNp63). Associé à des mécanismes d'épissages alternatifs de la région 3'du pré-ARNm, six isoformes présentant des profils d'expression et des fonctions très différentes peuvent être produites en fonction de leur région C terminale: TAp63α, β et γ et ΔNp63 α, β et γ. Au niveau de la peau, Bamberger et ses collaborateurs ont montré que les isoformes ΔNp63 étaient fortement exprimés dans les couches basales de l'épiderme alors qu'à l'inverse, les isoformes TAp63 l'étaient dans les couches supérieures en formant un gradient d'expression (Bamberger C et al., 2002; King KE et al., 2007). Les différents isoformes de p63 présentent également des fonctions différentes au niveau de la physiologie épidermique. Il a ainsi été démontré que les isoformes ΔNp63 semblent essentiellement jouer un rôle dans le contrôle du potentiel prolifératif des cellules basales en modifiant l'expression de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire alors que les isoformes TAp63 semblerait être à l'origine de leur différenciation. En effet, différentes études ont démontré que ΔNp63 était capable de se fixer et de réprimer les promoteurs de WAF1 et 14-3-3σ (Westfall MD et al., 2003), deux gènes impliqués dans la différenciation des kératinocytes (Dellambra E et al., 2000). Par ailleurs, alors que la surexpression de TAp63 dans des kératinocytes est suffisante pour en induire la

différenciation, celle de ΔNp63 ne permet pas de l'empêcher lorsqu'elle est induite par le calcium (Carroll DK et al., 2006).

2.1.4. Régulation de la différenciation des kératinocytes

La régulation de ce mécanisme est complexe et multifactorielle. Les facteurs qui affectent l'épiderme dans sa prolifération et régénération incluent des régulateurs transcriptionnels (tels que AP-1, KGF, IL-1, GM-CSF), des molécules de la matrice extracellulaire et leurs récepteurs (tels que les laminines et les intégrines), ainsi que des régulateurs moléculaires (tels que Shh, Wnt/β-caténines, NFKB, c-Myc, p63 et Rac-1). En tenant compte du fait que la fonction proposée ait été proposée sur la base d'études de surexpression ou de diminution d'expression dans des modèles animaux tels que des souris, l'extrapolation aux tissus humains doit être évoquée avec précaution.

Le facteur de transcription AP-1 (pour Activator protein-1) est constitué de dimères formés de protéines des familles de protooncogenes Jun (c-jun, JunB, JunD) et Fos (c-fos, FosB, Fra-1, Fra-2) (Ransone LJ et al., 1990). Ces protéines, une fois dimérisées peuvent réguler de nombreux gènes cibles impliqués dans la différenciation kératinocytaire. Il a ainsi été démontré que c-jun, c-fos et Fra-1 étaient uniquement exprimés dans les cellules présentes au niveau des couches suprabasales de l'épiderme alors que JunD, JunB, Fra-2 et FosB étaient exprimés à la fois dans les couches basales et suprabasales (Basset-Séguin N et al., 1991, Welter JF et al., 1995). Ainsi en fonction des combinaisons de facteur Jun et Fos, le complexe AP-1 aura un effet régulateur sur l'expression de certaines kératines clés de la différenciation des kératinocytes tels que les kératines K5 et K14 dans les couches basales et les kératines K1 et K10 dans les couches suprabasales.

Plus récemment, il a été supposé que c-Myc pouvait également jouer un rôle dans la régulation du processus de différenciation épidermique (Gebhardt A et al., 2006 ; Berta MA et al., 2010). En effet cet oncogène a démontré dans d'autres modèles pouvoir réguler des fonctions cellulaires majeures telles que la prolifération, la différenciation ou l'apoptose. Au niveau épidermique il a été observé que la surexpression de c-Myc ne stimulait ni l'apoptose ni la prolifération, mais la différenciation des cellules TA en réprimant l'expression des intégrines α6 et β1 (Gebhardt A et al., 2006). Il a par ailleurs été montré que la dérégulation de l'expression de c-Myc dans le follicule pileux et l'épiderme interfolliculaire engendrait la perte des follicules et la déplétion de la population de cellules souches de l'épiderme interfolliculaire (Lo Celso C et al., 2008).

La voie des Wnt/β-caténine est également une piste intéressante puisqu'il a été montré, chez la souris, qu'elle régulait la prolifération et la différenciation des CSE du bulge (DasGupta R, Fuchs E, 1999 ; Tumbar T et al., 2004). Par ailleurs, il a été montré qu'au cours du

développement embryonnaire un niveau élevé de β-caténine favorisait la différenciation des progéniteurs épithéliaux en cellules du follicule pileux, tandis que son inhibition favorisait leur différenciation en cellules de l'épiderme interfolliculaire (Zhang Y et al., 2008). Bien que les β-caténines constituent la clé effectrice de la voie Wnt dans l'épiderme, une autre protéine fortement liée à ces premières possède des propriétés similaires : la plakoglobine...

La voie Delta-Notch est une voie de signalisation cruciale dans le contrôle de la différenciation des kératinocytes. Le couple Delta-Notch régule la transmission de nombreux processus développementaux via la formation d'interactions intercellulaires (Ehebauer M et al., 2006). Des études récentes ont suggéré l'implication de cette voie de signalisation dans le processus de différenciation épidermique. En effet il a été montré que la surexpression de Delta au niveau de kératinocytes entrainait l'induction de la différenciation de cellules avoisinantes (pour revue Estrach S et al., 2008).

La vitamine D est également un facteur impliqué dans la régulation de ce processus. Il a ainsi été montré que la perte ou la mutation du récepteur de la vitamine D était associée à la perte de poils chez les souris et les êtres humains, laissant envisager son rôle régulateur dans la physiologie de l'épiderme (Cianferotti L et al.,2007). D'autres gènes ont également été mis en évidence pour réguler la différenciation épidermique lorsque leur expression est altérée chez la souris, c'est notamment le cas de Sox9 dépendant de la Shh (Sonic hedgehog), c-jun et de jun-b (Zenz R et al., 2006)

2.2. Les mélanocytes

Dans la peau, les mélanocytes représentent 5 % des cellules de l'épiderme. Ces derniers ont une double fonction, d'une part, protéger les kératinocytes des effets mutagènes provoqués par les rayons UVs du spectre solaire et d'autre part de pigmenter l'épiderme de manière uniforme via la synthèse de mélanine. La mélanine est le pigment synthétisé par les mélanocytes au niveau d'organites spécialisés intracytoplasmique de la famille des lysosomes sécrétoires, appelés mélanosomes. Il existe deux types de mélanines, les eumélanines de couleurs brunes ou noires et les phaéomélanines de couleurs jaunes ou rouge-orangé dont les proportions respectives assureront la diversité pigmentaire de la peau chez l'homme. Deux types de mélanocytes ayant des fonctions différentes se retrouvent au niveau de l'épiderme, le premier se localise au niveau de la couche basale et prolonge ses dendrites au niveau de couches supérieures, le second se situant au niveau du follicule pileux (Figure 9). Bien que les mélanocytes épidermiques et folliculaires dérivent de précurseurs communs et possèdent les mêmes gènes spécifiques de pigmentation, ils se distinguent par une physiologie et une homéostasie différentes probablement en raison de l'influence de leurs environnements respectifs (pour revue Plonka PM et al., 2009)

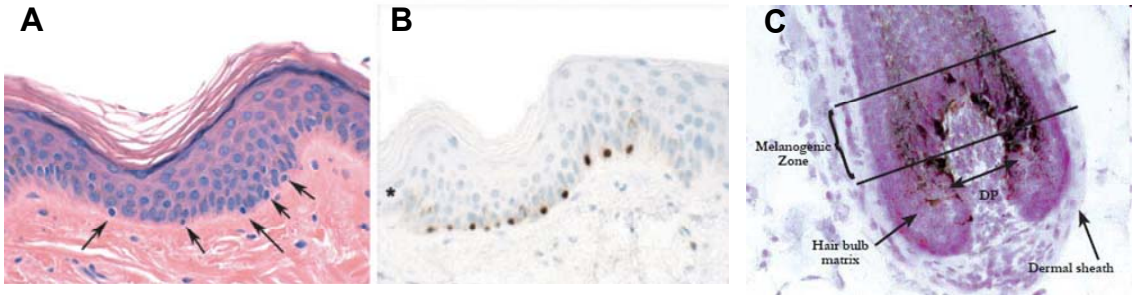


Figure 9: Localisation des mélanocytes dans l'épiderme interfolliculaire et du follicule pileux.
(A) Coupe histologique d'épiderme humain coloré à l'Haematoxylin Eosin dans laquelle sont marquées d'une flèche noire les mélanocytes.
(B) Détection des mélanocytes au niveau de la couche basale de l'épiderme par l'observation du marquage du facteur de transcription MITF.
(C) Coupe histologique réalisée au niveau du bulbe d'un follicule pileux. Le marquage noir correspond aux granules de mélanine. Copyright Dr. Desmond J. Tobin, University of Bradford, UK.
Sources: Lin J Y et al., 2007. Melanocyte biology and skin pigmentation.

2.2.1. Le mélanosome: Siège de la production de mélanine

Le mélanosome est l'organite du mélanocyte dans lequel a lieu la biosynthèse des pigments durant le processus de mélanogénèse (Orlow SJ, 1995) (Figure 10). Ces structures présentent un environnement acide proche des lysosomes. La synthèse de mélanine se fait à partir de tyrosine principalement par l'action de trois enzymes, la tyrosinase, dont la mutation chez la souris *Albino* empêche toute synthèse de pigments (Jackson IJ, Bennett DC, 1990); TRP1 (Tyrosinase related protein 1), dont la mutation provoque l'absence de pigments noirs chez les souris brown (Jackson IJ et al., 1990) ; et Dct/TRP2 (Dopachrome tautomérase/Tyrosinase related protein 2) qui lorsqu'il est muté entraine la formation d'un pelage dilué chez la souris *slaty* (Jackson IJ et al., 1992). Ces trois enzymes possèdent environ 40% d'homologie dans leur séquences (Hearing VJ et al., 1991), Bien que codées par des gènes distincts ces enzymes possèdent des caractéristiques communes mais des activités catalytiques très différentes. La tyrosinase est l'enzyme limitante de la mélanogénèse, elle catalyse les deux premières réactions de ce processus, l'hydroxylation de la tyrosine en 3,4-dihydroxyphénylalanine (DOPA) et l'oxydation de la DOPA en DOPAquinone (Hearing VJ et al., 1987). Une fois cette réaction effectuée les protéines TRP1 et TRP2 vont permettre la production des eumélanines, dans un premier temps via l'isomérisation de la DOPAchrome en acide 5,6 dihydroxyindole-2 carboxylique (DHICA) et ensuite son oxydation en acide 5,6-quinon-2 carboxylique. Les premiers stades de la mélanogénèse étant communs aux deux familles de pigments, la biosynthèse des phaéomélanines se produit par addition de dérivés soufrés (cystéine, glutathion) à la DOPAquinone, pour former des cystéinyldopas, qui se polymériseront ultérieurement. Cette cascade de réactions biochimiques se déroule parallèlement à un processus de maturation des mélanosomes. Cette maturation se déroule en

quatre étapes séquentielles. Au stade I, ces organites intracellulaires sont ronds et localisés à la périphérie du noyau. Apres un processus de maturation dépendant de la protéine Pmel17 (melanocyte-specific glycoprotein 17 ou SILV), les mélanosomes développent des structures fibrillaires qui provoquent un allongement de sa structure, ils sont alors dit de stade II (Yasumoto K et al., 2004). Une fois la mélanine produite, celle-ci se dépose sur ces fibres constituant les mélanosomes de type III, puis après accumulation mélanosomes de type IV.

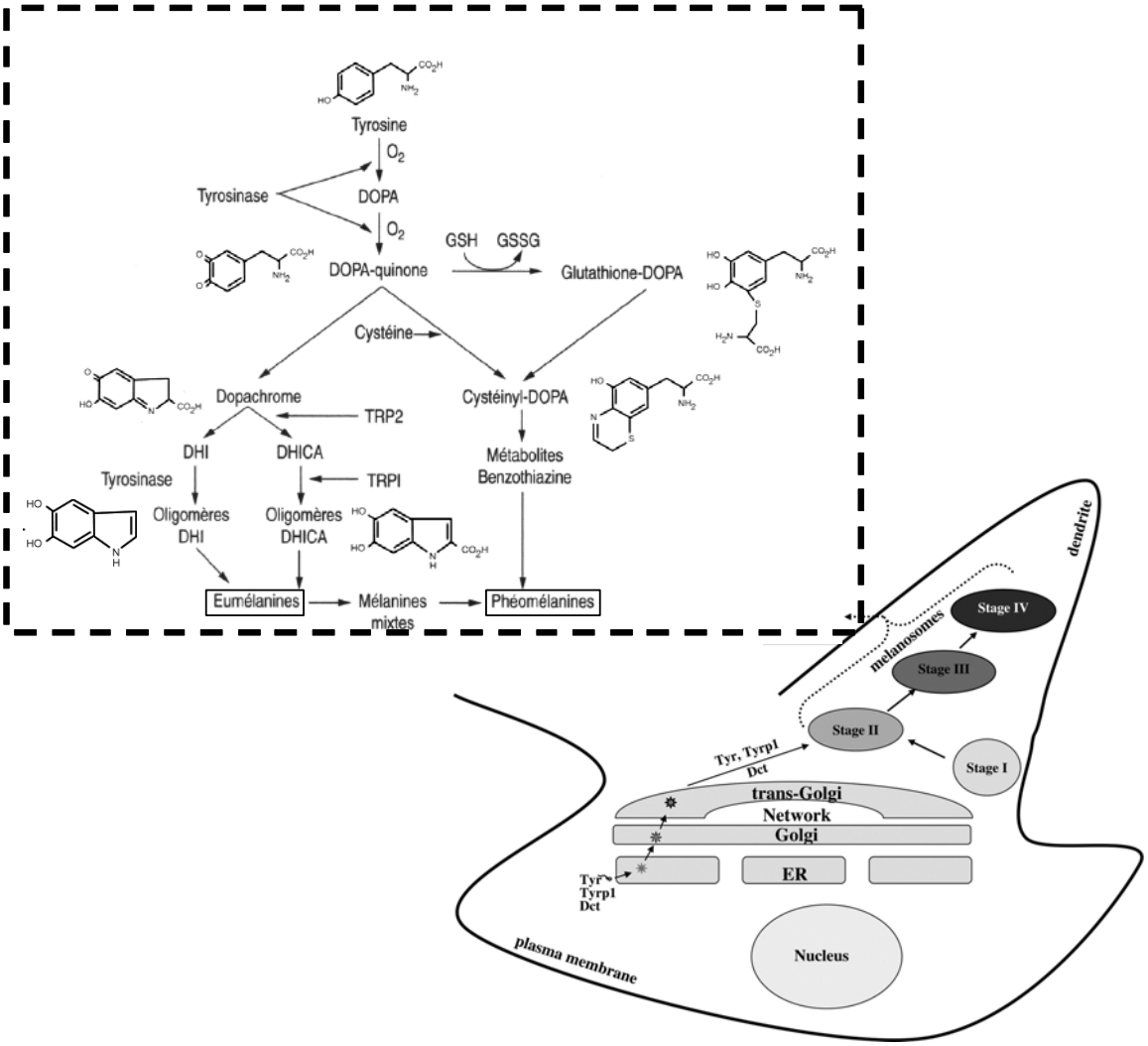


Figure 10: Les différentes étapes de la mélanogénèse.

2.2.2. Le transport des mélanosomes

Pendant le processus de maturation des mélanosomes, ces derniers se chargent en mélanine et sont transportés vers les extrémités dendritiques des mélanocytes pour y être transférés aux cellules avoisinantes (Figure 11). Les dendrites du mélanocyte sont constituées d'un cœur central de microtubules et d'un réseau périphérique d'actine subcorticale (Lacour JP et al., 1992). La myosine Va joue un rôle majeur dans le transport des mélanosomes. Il a ainsi été

démontré que la mutation du gène qui code pour la myosine Va (mutant *dilute*) entrainait une dilution de la coloration en raison de l'accumulation des mélanosomes à la périphérie du noyau (Hume AN et al., 2007). En association à la myosine Va, la protéine Rab27a (Ras-related protein 27a) et la Mélanophilin sont impliquées dans liaison des mélanosomes au réseau d'actine (Hume AN et al., 2002). La mutation de ces deux derniers gènes provoque des phénotypes similaires aux mutant *dilute* avec une dilution de la pigmentation des souris *leaden* (Melanophilin) et *ashen* (Rab27a) (Hume AN et al., 2002). Une fois localisés à l'extrémité des dendrites, les mélanosomes sont transférés aux kératinocytes avoisinants soit par une phagocytose des extrémités dendritiques du mélanocyte par les kératinocytes soit par une exocytose des mélanines suivie d'une endocytose par les kératinocytes (pour revue : Aspengren S et al., 2009).

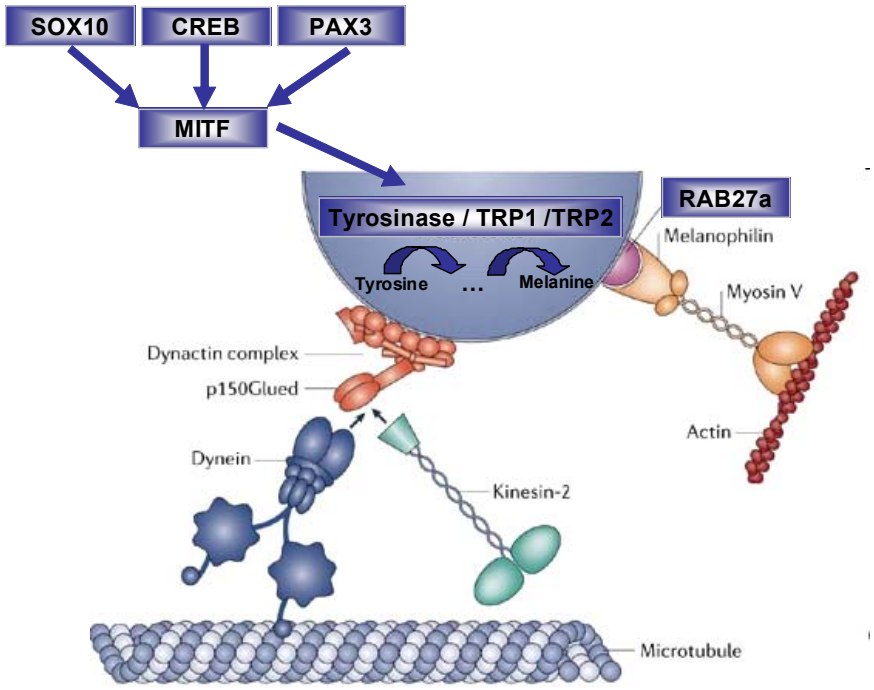


Figure 11: Représentation schématique des régulateurs de la mélanogénèse et du transport du mélanosome.

2.2.3. Mécanismes de régulation de la mélanogénèse

La pigmentation cutanée est un mécanisme contrôlé par un ensemble de gènes (environ 130), dont les fonctions ne sont pas encore totalement déterminées. Ces gènes peuvent aussi bien contrôler l'embryogenèse des mélanocytes via le contrôle de la survie et de la différenciation de progéniteurs, que la synthèse des différentes mélanines ou encore la maturation et le transfert des mélanosomes Un grand nombre de ces gènes ont été impliqués dans la pathogénie de dermatoses pigmentaires. Le principal gène régulant l'ensemble de ce processus est MITF (Microphthalmia-associated transcription factor) dont une des fonctions

est de réguler l'expression des principaux acteurs de la mélanogénèse tels que TYR, TRP1, TRP2, Mart-1 (Melanoma-associated antigen recognized) (Goding CR et al., 2000) et Pmel17 (Du J et al., 2003). *In vivo*, la mélanogénèse est également stimulée par les rayons UVA (Ultraviolet A) et UVB (Ultraviolet B) du spectre solaire. Ainsi, en réponse au stress cellulaire engendré par les rayons UVs, les mélanocytes répondent en augmentant leur prolifération mais également en stimulant leur dendritogénèse afin de transférer d'avantage de mélanine aux keratinocytes avoisinants et ainsi les protéger. Les rayons UVs peuvent agir sur les mélanocytes de manière directe ou indirecte en induisant la sécrétion de facteurs paracrines et autocrines soit par les kératinocytes soit par les mélanocytes eux-mêmes.

In vitro, l'irradiation de cellules de mélanomes murins S91 par des UVB a démontré que la stimulation de la mélanogénèse induite par les rayons UVs passait par une augmentation de l'activité de la tyrosinase et de son expression (Hill HZ et al., 2000). Un certain nombre de voies de signalisation ont été mises en évidence dans la transmission des effets mélanogeniques des rayons UVs : La première étant la réparation des altérations de l'ADN principalement due à la formation de dimères de thymidine dans l'ADN des mélanocytes ; la seconde, à la production de NO (Monoxyde d'Azote) et de DRO (Dérivés Réactifs de l'Oxygène). Parallèlement à cet effet direct sur la mélanogénèse, il a également été montré que de nombreux facteurs activateurs de la mélanogénèse pouvaient stimuler la croissance et la synthèse des mélanines en réponse aux rayons UVs. Il s'agit entre autres de l' αMSH (α melanocyte stimulating hormone ou mélanocortine), de l'ACTH (AdrenoCorticoTropic Hormone), du NO ou encore de l'ASP (agouti signaling protein) (Figure 12).

-L'ACTH et l'αMSH sont des hormones polypeptiques générées par le clivage d'un précurseur commun la POMC (pro-opiomelanocortine), lui-même secrété par la glande surrénale. Parmi tous les agents propigmentant dont la sécrétion est augmentée par les rayons UVs l'αMSH et l'ACTH sont, aussi bien *in vitro* que *in vivo*, les plus puissants activateurs de la mélanogénèse. Ainsi l'injection d'un analogue synthétique de l'αMSH chez l'homme induit une pigmentation cutanée sans exposition au soleil. Les effets mélanogeniques de l'αMSH et de l'ACTH sont déclenchés par la liaison de ces peptides sur le récepteur couplé à une protéine G, MC1R (melanocortin-1 receptor), dont l'expression est également régulée par les rayons UVs. La stimulation du récepteur MC1R active l'adénylate cyclase et augmente le taux intracellulaire en AMPc (cyclic Adenosine Mono- Phosphate) (Suzuki I et al., 1996). Cette stimulation de la voie de l'AMPc aboutissant *in fine* à la phosphorylation du facteur de transcription CREB (cAMP Response Element Binding protein) a pour conséquence une augmentation d'expression du facteur MITF dans les mélanocytes (Huber WE et al., 2003). Kuzumaki et coll ont par ailleurs démontré que l'augmentation du niveau d'AMPc intracellulaire provoquait une augmentation simultanée de la quantité d'ARNm (*A*cide

RiboNucléique messager) codant pour la Tyrosinase et TRP1 ainsi que de leur activité (Kuzumaki T et al., 1993).

-Le monoxyde d'azote ou NO est un gaz diffusible dont la production est assurée par les NO synthases à partir d'un acide aminé, l'arginine. Il a été montré *in vitro* qu'en réponse aux rayons UVs les kératinocytes et les mélanocytes produisaient du NO ayant pour conséquence une stimulation de la mélanogénèse via la stimulation de la production de GMPc (Cyclic guanosine monophosphate) et une activation de la PKG (protéine kinase G). (Sasaki M et al., 2000).

-La protéine agouti (ou agouti signaling protein) est un antagoniste de l'αMSH dont la surexpression est l'origine des mutations *lethal yellow* et *viable yellow*. Cette protéine inhibe de manière compétitive le récepteur MC1R et induit préférentiellement une synthèse de phaeomélanines au détriment des eumélanines. Il a également été montré que, *in vitro*, cette protéine bloque la différenciation mélanocytaire ainsi que l'eumélanogenèse induites par l'αMSH. (Graham A et al., 1997).

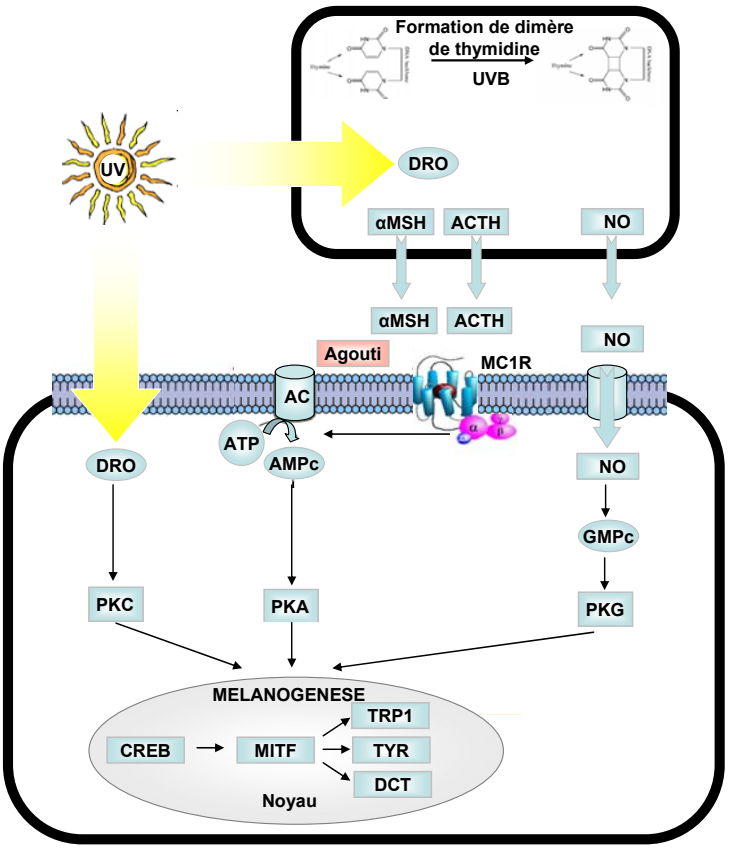


Figure 12: Voie de signalisation impliquée dans la régulation de la mélanogénèse induite par les rayons UVs.

Les effets des rayons UVs activent les voies de la PKA, de la PKC et de la PKG pour stimuler l'expression des facteurs clés de la mélanogénèse MITF, TRP1, TYR et DCT via la phosphorylation de CREB. L'activation de la PKC est induite par la production de radicaux libres (DR0); L'activation de la PKA est induite par la stimulation de la production d'αMSH et d'ACTH par les kératinocytes via l'activation du recepteur MC1R; Et la voie des PKG est induite par la production de N0.

2.3. Les autres types cellulaires de l'épiderme

2.3.1. Les cellules de Langerhans

Découvertes en 1868 par Paul Langerhans, les cellules de Langerhans représentent 2 à 5% des cellules de l'épiderme. Ce sont des cellules dendritiques localisées dans la couche de Malpighi Dérivées des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse, ces cellules forment un réseau de cellules "sentinelles" chargées de présenter les antigènes exogènes déposés sur la peau aux lymphocytes présents dans les ganglions lymphatiques du derme pour induire une réponse immunitaire de type cellulaire.

2.3.2. Les cellules de Merkel

Les cellules de Merkel représentent 6 à 10% des cellules de l'épiderme. Localisées dans la couche basale de l'épiderme, ces cellules peuvent être regroupées en amas appelés corpuscules de Merkel. Elles appartiennent au système neuroendocrinien diffus et jouent un rôle de mécanorécepteurs et sont impliquées dans la fonction du toucher en formant des contacts avec des fibres nerveuses. Leur présence, longtemps discutée au sein de l'épiderme, a été observée au contact des cellules de Langerhans dont elles pourraient moduler la fonction de présentation antigénique (Taira K et al., 2002).

B. La jonction dermo-épidermique

La jonction dermo-épidermique est une structure complexe permettant d'assurer la cohésion entre l'épiderme et le derme (Figure 13) (Briggaman RA, 1982). Elle possède un rôle de support mécanique pour l'adhésion de l'épiderme au derme et un rôle de barrière sélective permettant le contrôle des échanges moléculaires et cellulaires entre les deux compartiments. Elle est également, à travers les glycoprotéines qui la constituent- en particulier les laminines, le support de l'adhésion et de la migration des kératinocytes lors de la restauration de l'intégrité épidermique (Zhang K et al., 1996). Les défauts génétiques altérant un ou plusieurs acteurs de cette jonction sont à l'orgine de maladie extrêmement sévères telles que les épidermolyses bulleuses, caractérisées par l'apparition de clivages cutanés (bulles) au niveau de la jonction dermo-épidermique. D'un point de vue ultrastrucural, la microscopie électronique permet de distinguer quatre zones distinctes au niveau de la jonction dermo épidermique (De la surface vers la profondeur) : Les hemidesmosomes situés au pole basal des kératinocytes basaux, une membrane basale, d'une épaisseur de 100 nm environ, composée d'une lamina densa et d'une lamina lucida, et enfin d'une zone dense sous basale située dans le derme superficiel.

-Les hemidesmosomes : Parmi les principaux constituants des hemidesmosomes, différentes études ont mis en évidence la présence de l'antigène majeur de la pemphigoide bulleuse (BPAG-1), de l'antigene HD1/plectin et des Intégrines α6 et β4. Ces dernieres médiant l'attachement des hemidesmosomes à la membrane basale (Sonnenberg A et al., 1991).

-La lamina lucida est quant à elle composé de filaments d'ancrage, principalement constitués de l'antigène mineur de la pemphigoide bulleuse (BPAG-2) (autrement appelé collagène XVII) et des laminines 1, 5 et 6. Ces filaments d'ancrage s'enchevêtrent à leurs extrémités formant ainsi des boucles allant d'une partie à l'autre de la lamina densa. Ainsi organisées elles forment un complexe d'adhésion continu se liant à la portion extracellulaire des intégrines α6 et β4 des hemidesmosomes.

-La lamina densa forme la zone d'ancrage des filaments et des fibres issus de l'épiderme et de la zone fibrillaire. Elle est majoritairement constituée de collagène de type IV, de laminine-1, de nidogène et de protéoglycannes.

-Les fibres d'ancrage : Les fibres d'ancrages sont principalement composés de collagènes de type VII. Elles ont pour principale fonction d'interagir avec la membrane basale pour former un réseau de fibres capable de maintenir la stabilité de la jonction dermo épidermique (Uitto J et al., 1996 ; Burgeson RE, 1993).

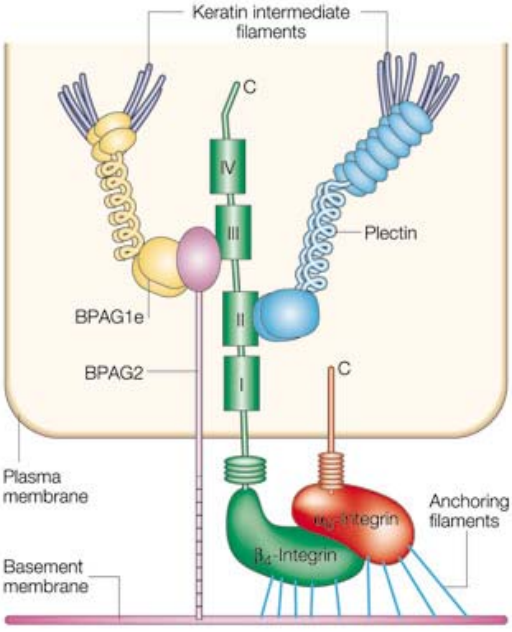


Figure 13: Représentation schématique de la jonction Dermo-Epidermique.
Source : Elaine Fuchs et al., 2002. Getting under the skin of epidermal morphogenesis.

C. Le derme

Le derme est un tissu conjonctif fibro-élastique composé de cellules résidentes et d'une matrice extracellulaire constituée de protéines fibreuses, (collagène, élastine) et non fibreuses (protéoglycanes, glycoprotéines). Constitué à 80% d'eau, de fibres d'élastine, de collagène, noyé dans un gel de glycoprotéines, le derme a pour principale fonction de servir de tissu de soutien de la peau en lui apportant extensibilité, élasticité et résistance. Le derme est le également le siège des annexes épidermiques (follicule pileux, glande sébacées et glandes sudorales), des vaisseaux sanguins permettant l'irrigation sanguine de la peau et des fibres nerveuses et musculaires. Riche en vaisseaux sanguins, les fibroblastes et les cellules mésenchymateuses sont les principaux types cellulaires le composant en ayant pour fonction de synthétiser les protéines composants la matrice extracellulaire. Histologiquement, le derme est divisé en deux couches : une couche superficielle dite papillaire et une couche profonde dite réticulaire. Le derme papillaire est un tissu conjonctif lâche qui s'insinue entre les crêtes de l'épiderme pour former les papilles dermiques. La matrice extracellulaire du derme papillaire est majoritairement composée d'un réseau de faisceaux de collagènes entourés de protéoglycannes, de glycosaminoglycannes et de fibres élastiques. Le derme réticulaire profond se différencie du derme papillaire par un tissu conjonctif dense constitué de faisceaux de fibres de collagène entremêlées à des fibres élastiques

1. Les annexes cutanées

Dans le derme se trouvent donc les annexes cutanées principalement des follicules pileux ainsi que les glandes sébacées et sudorales (Figure 14). Ces structures sont constituées de kératinocytes très spécialisés.

-Le follicule pileux : Les kératinocytes des gaines épithéliales des follicules pileux expriment des kératines épidermiques mais également prés d'une dizaine d'autres kératines qui leurs sont spécifiques D'un point de vue développemental, les poils proviennent d'une invagination tubulaire de l'épiderme qui s'enfonce dans le derme. Ces cellules prolifèrent et donnent naissance à des cellules épithéliales qui se kératinisent et dont la progression se fait vers la surface cutanée pour former la tige du poil. Les poils sont des structures mélanisées. Leur coloration est due à l'incorporation de mélanosomes produits par des mélanocytes localisés dans la partie profonde du follicule pileux. Les variations de couleur des poils s'expliquent à la fois par la quantité de mélanosomes présents dans les cellules épithéliales et par la qualité du pigment produit (eumélanine ou phéomélanine). Par défaut, les poils sont de couleur noire ou marron mais un polymorphisme du récepteur de l'αMSH peut bloquer la synthèse d'eumélanine pour ne permettre que la synthèse de phéomélanine et ainsi une pigmentation

rousse. Au cours du vieillissement physiologique, les poils et les cheveux ont tendance à blanchir. Il n'y a pas d'explication univoque pour rendre compte de ce phénomène même si plusieurs hypothèses ont été proposées, tels que la diminution du nombre des récepteurs de l'αMSH, une destruction des mélanocytes induite par des causes environnementales ou génétiques.

-Les glandes sébacées : Cette structure est composée de sébocytes. Son rôle est de produire et sécréter du sébum afin de lubrifier le poil. Au niveau dermique celles-ci se localisent au niveau supérieur du follicule pileux et leur visualisation est possible par la détection de l'expression de l'AEM (Antigène Epithélial Membranaire) ainsi que l'antigène OM-1 (antigène de cystadénocarcinome ovarien) et la lipase (Zouboulis CC et al., 1994)

-Les glandes sudorales : La fonction principale des glandes sudorales (ou sudoripares) est de produire et sécréter la sueur. Ce liquide, produit durant le processus de transpiration, joue un rôle majeur dans la régulation de la température corporelle. Le marqueur principal de ces cellules est l'ACE (antigène carcino embryonnaire) mais elles expriment également les kératines K8, K18 et K19 (Kurokawa I et al., 2006).

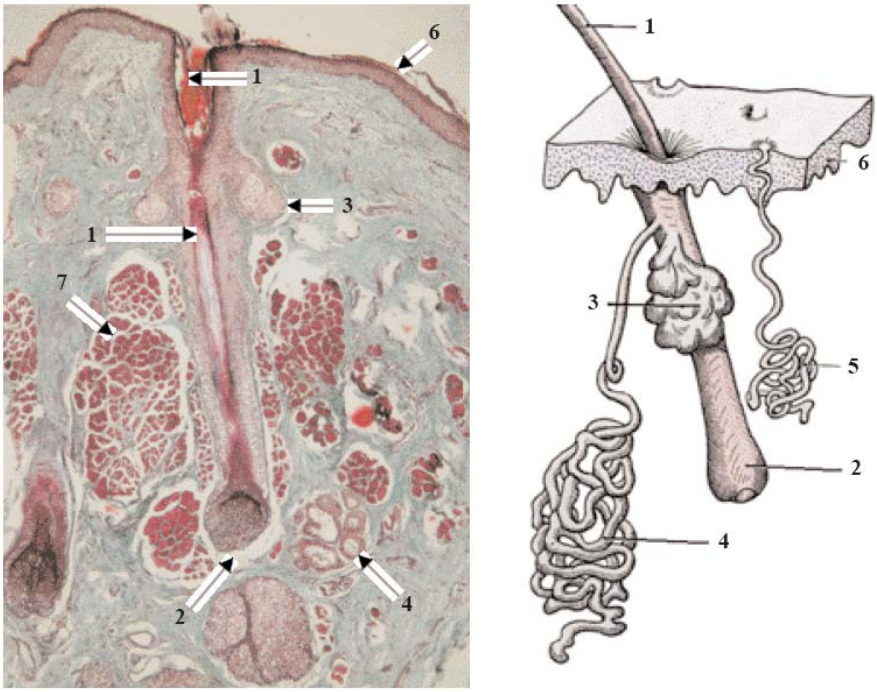


Figure 14: Les annexes cutanées.
(A) Coupe histologique d'une peau humaine permettant de distinguer :1) Tige du poil, 2) Follicule pileux, 3) Glande sébacée, 4) Glandes sudorales apocrines, 5) Glandes sudorales eccrines, 6) Epiderme, 7) Muscle striée.
(B) Schéma représentant les mêmes structures.
Source : Comprendre la peau. Annale de Dermatologie et de Venereologie 2005.

2. Les cellules résidentes du derme

La population cellulaire largement majoritaire constituant le derme sont les fibroblastes. Ce sont de grandes cellules (100 μm) fusiformes ou étoilées possédant de longs prolongements cytoplasmiques. Ces cellules sont les cellules fondamentales de tous les tissus conjonctifs. Elles produisent la majorité des protéines composant la matrice extracellulaire du derme, principalement des collagènes, de l'élastine, et des glycoprotéines de structure. Elles produisent également des protéinases, principalement des MMPs (métalloprotéases matricielles) capables de dégrader et de remodeler cette matrice extracellulaire.

Le derme contient également des dendrocytes dermiques. Ces cellules représentent un réseau de cellules mésenchymateuses hétérogène de morphologie dendritique. Elles sont de deux types : Les dendrocytes dermiques de types I (DDI) sont présents autour des vaisseaux sanguins du derme papillaire et sont caractérisés par leur expression du facteur de coagulation XIIIa alors que les dendrocytes dermiques de type II (DDII), exprimant le marqueur CD34 sont localisés autour des annexes épidermiques.

Par ailleurs le derme est composé de cellules d'origine sanguine telles que les mastocytes, cellules intervenant dans les réactions allergiques, les macrophages qui possèdent un rôle crucial dans l'inflammation et l'activation de l'immunité ainsi que des cellules endothéliales qui participent à la formation des vaisseaux sanguins.

D. L'hypoderme

D'un point de vue anatomique, l'hypoderme est le compartiment le plus profond et le plus épais de la peau. Il s'invagine dans le derme et est rattaché au derme sous-jacent par des fibres de collagène et d'élastine. Au niveau cellulaire, il est essentiellement constitué d'un type de cellules spécialisées dans l'accumulation et le stockage des graisses, les adipocytes. Grace à cette accumulation de graisses, l'hypoderme joue le rôle de réserve énergétique du corps humain et participe à sa thermorégulation grâce aux propriétés isolantes de la graisse

II. Cellules souches pluripotentes et développement ectodermique

A. Régulation des premières étapes de l'ontogenèse

L'être vivant est le résultat d'une cascade d'événements cellulaires et moléculaires parfaitement orchestrés ayant pour origine la formation d'un œuf (ou zygote) durant le processus de fécondation. Cet œuf contient en lui l'ensemble de la complexité de l'espèce humaine, fruit de millions d'années d'évolution. Dès les premiers jours suivant la fécondation, l'œuf subit de nombreuses mitoses afin que de nombreuses cellules-filles puissent être produites et donner naissance aux différents lignages primitifs qui sont à l'origine de la considérable diversité d'un organisme adulte (Figure 15). Les deux premiers mois du développement représentent la période embryonnaire. Cette période correspond à la mise en place des différents feuillets embryonnaires puis à la mise en place des différents organes. Ceux-ci continueront ensuite leur maturation durant la période fœtale qui couvre les 7 derniers mois de gestation.. La mise en place des différents feuillets aboutissant à l'embryon tridermique sont décrits ci-après.

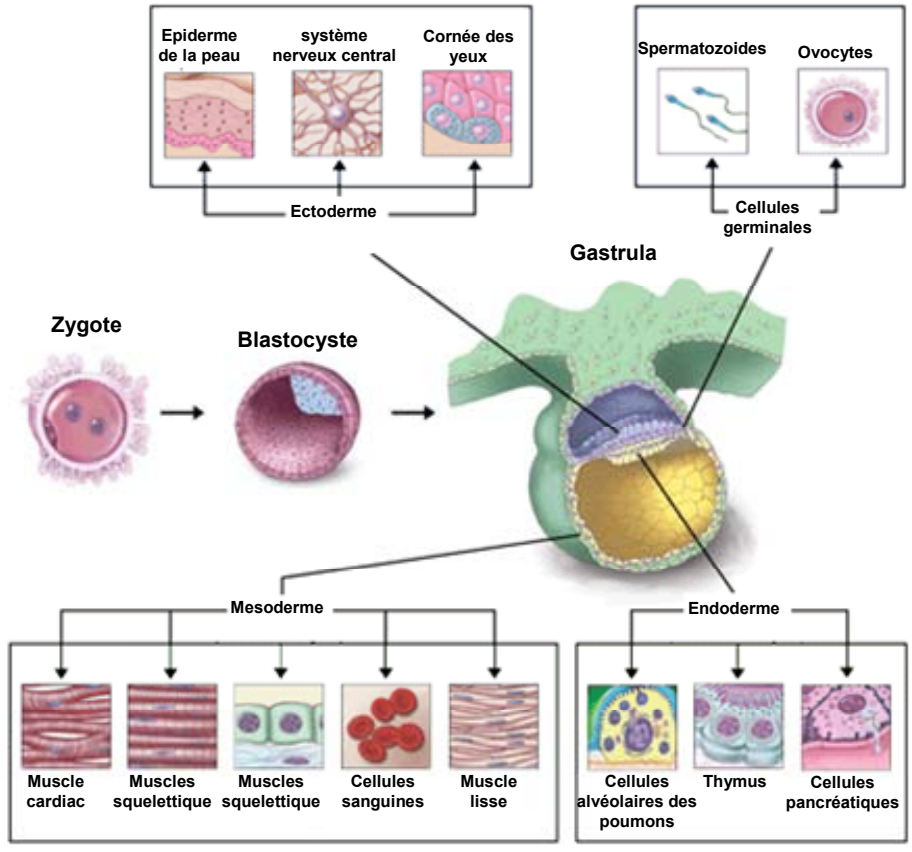


Figure 15 : Différenciation des cellules de la masse cellulaire interne dans les différents tissus de l'organisme.
Adapté de: What is a Cell? by the National Center for Biotechnology Information.

1. De la segmentation à la gastrulation

La segmentation ou clivage est la première étape du développement embryonnaire humain. Au cours de cette période, l'embryon passe de l'état unicellulaire à pluricellulaire avec l'occurrence d'une mitose toutes les 10 heures (Figure 16). A la fin de la troisième journée, le zygote est ainsi composé de 16 cellules de petites tailles il est alors appelé morula (petite mûr) et les cellules qui la composent sont appelées blastomères. À ce stade, ces cellules sont strictement identiques et dites « totipotentes », c'est-à-dire capable de donner l'ensemble des types cellulaires constituant le futur organisme ainsi que les annexes extra-embryonnaires. Dès cet instant, sans toutefois être totalement différenciées, les cellules sont dites déterminées. Ainsi les cellules situées à la périphérie de l'œuf seront amenées à former un tissu nommé trophectoderme alors que les cellules internes constitueront les cellules de la masse cellulaire interne (ou MCI). Durant la phase de segmentation, l'œuf quitte progressivement son site original, traverse la trompe de Fallope pour pénétrer dans la cavité utérine vers le 4ème jour;

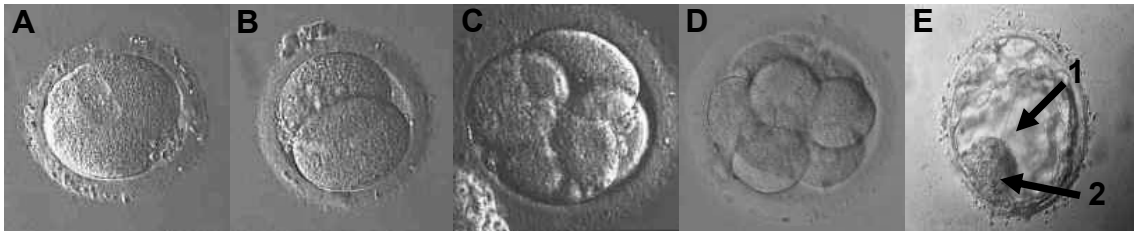


Figure 16: Description des premières étapes de l'embryogénèse humaine : Du zygote au blastocyste.
(A) Zygote après fécondation.
(B) Première mitose de segmentation, l'embryon est au stade de 2 cellules.
(C) Deuxième mitose de segmentation conduit à la formation du stade 4 cellules.
(D) Embryon au stade Morula. Au 3ème jour les limites cellulaires sont parfaitement visibles et les blastomères peuvent être séparés mécaniquement les uns des autres.
(E) Blastocyste (4ème jour) présentant une cavité centrale, le blastocèle (1), et à un de ses pôles, la masse cellulaire interne (2).

Enfin, la dernière étape de la segmentation est la blastulation. La MCI subit un phénomène de compaction aboutissant à la formation d'une cavité intra-embryonnaire. (ou cavitation). L'embryon est alors appelé blastocyste et est composé de quatre structures (Figure 17):

-Les cellules de la masse cellulaire interne qui donneront l'embryon lui-même

-La zone pellucide

-Le tropho-ectoderme qui donnera les annexes de l'embryon (placenta et autres annexes extra-embryonnaires)

-Le blastocœle, cavité remplie de liquide

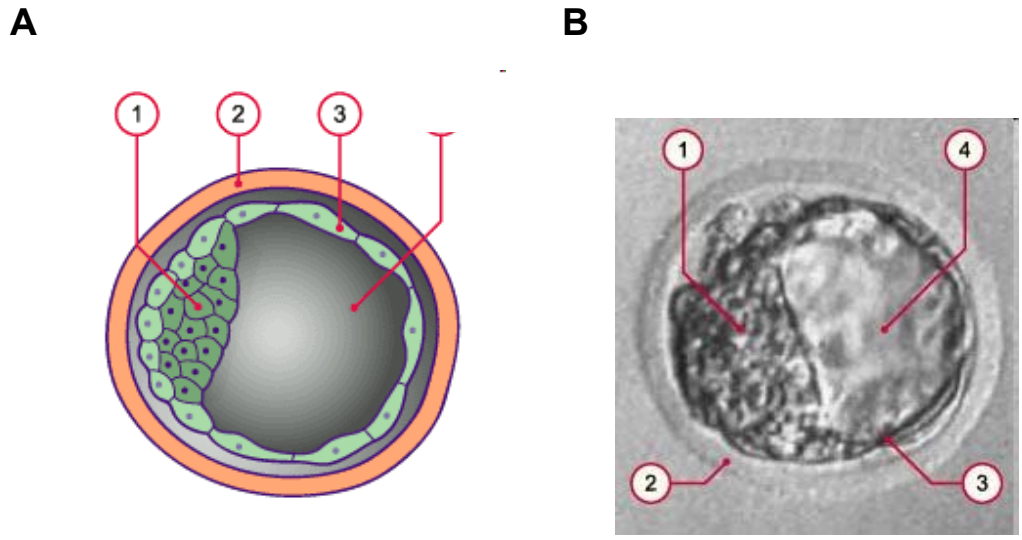


Figure 17: Structure du blastocyste.
(A) Schéma illustrant un blastocyste composé de 1) La Masse cellulaire interne ; 2) La zone pellucide ; 3) Trophoectoderme et 4) Le Blastocoele**.**
(B) Photo de microscopie optique de la même structure.
Adapté de www.embryology.ch. Copyright: Dr. A. Senn et al, CHUV Lausanne.

Ces premières étapes du développement embryonnaire font passer l'embryon d'un état unicellulaire à une structure organisée ou chaque cellule est déjà engagée dans un processus de différenciation spécifique. Ainsi les cellules de la masse cellulaire interne sont dites pluripotentes, elles ne sont plus capables de donner les annexes extra-embryonnaires mais sont capables de se différencier en l'ensemble des types cellulaires de l'organisme. C'est à partir de ces cellules que peuvent être dérivées les lignées de cellules souches embryonnaires (voir chapitre II). Au cinquième jour après la fécondation, se produit la phase d''éclosion du blastocyste, étape durant laquelle la masse cellulaire interne grossit puis sort de la zone pellucide. Ainsi l'œuf sorti de son enveloppe s'arrête au contact de la paroi utérine et y déclenche une réaction inflammatoire qui se traduit par une hyper vascularisation du site de fixation. Le blastocyste se fixe alors sur l'endomètre : cette étape étant appelé nidation. Au 6ème jour, les cellules du bouton embryonnaire commencent à se différencier et une assise cellulaire distincte se forme. L'endoblaste ainsi formé s'étalera progressivement pour former une cavité. Sur l'autre face de l'embryon, de hautes cellules forment un épithélium simple que l'on appelle ectoderme primitif. A ce stade, l'embryon est dit didermique. Il est déjà composé de deux feuillets distincts. Au 8ème jour, la cavité amniotique se forme entre le bouton embryonnaire et l'assise des cellules trophoblastiques. Cette cavité est bordée par deux structures : une mince membrane protectrice qui entoure entièrement l'embryon près du trophoblaste appelée amnios et de hautes cellules au niveau apical et formant un épithélium simple : l'ectoblaste. Au 10ème jour, l'épithélium utérin se referme derrière l'embryon. Commence alors la troisième étape majeure du développement embryonnaire : La

gastrulation. Au 15ème jour de gestation, une ébauche de sillon apparaît le long de l'axe longitudinal médian du disque embryonnaire (Figure 18A).

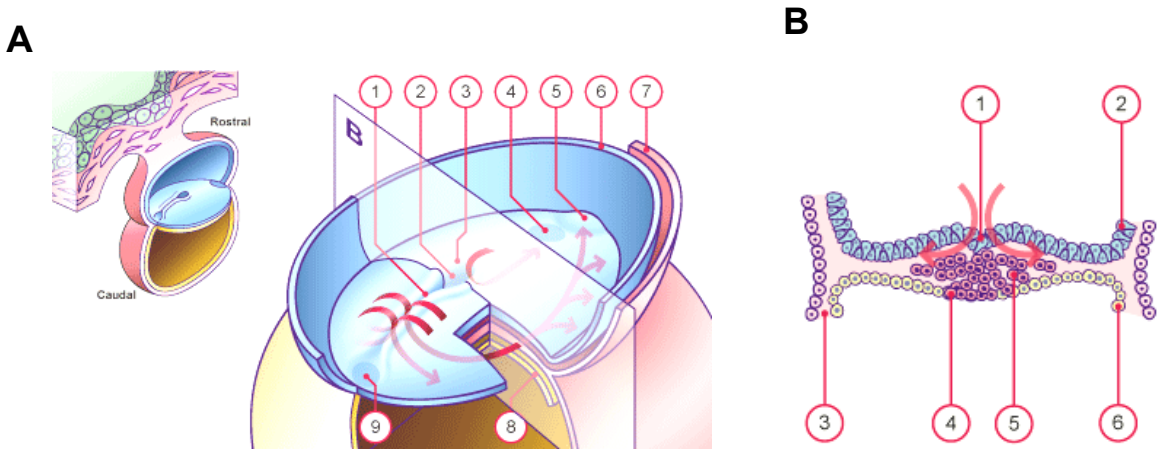


Figure 18: La gastrulation : Mise en place de ligne primitive de l'embryon et formation du troisième feuillet cellulaire.
(A) Disque embryonnaire (15 jours de développement) vu par sa face supérieure (dorsale).
Les flèches rouges représentent schématiquement la migration des cellules épiblastiques vers leurs territoires présomptifs respectifs. 1) sillon primitif ; 2) dépression primitive ; 3) noeud primitif 4) membrane oropharyngée ; 5) aire cardiaque ; 6) bord sectionné de l'amnios ; 7) mésoderme ; 8) endoderme ; 9) ligne primitive.
(B) Section transversale au niveau du sillon primitif au moment de la gastrulation montrant l'invagination des cellules épiblastiques formant le futur mésoblaste 1) sillon primitif ; 2) épiblaste ; 3) mésoblaste extra-embryonnaire ; 4) entoblaste définitif ; 5) invagination des cellules formant le futur mésoblaste Intraembryonnaire ; 6) hypoblaste.
Adapté de www.embryology.ch. Copyright: Dr. A. Senn et al, CHUV Lausanne.

Dans cette région de l'embryon, les cellules de l'ectoderme primitif vont former un épaississement longitudinal s'élargissant vers la région céphalique. Ce sillon, appelé ligne primitive, a pour première conséquence de définir le plan de symétrie du futur individu. Les cellules qui composeront le troisième feuillet embryonnaire, le mésoderme, sont à ce stade encore incluses dans l'ectoderme primitif. Au cours de la formation de la ligne primitive, ces cellules se regroupent sur les bords de la ligne puis condensent et plongent pour conquérir l'ensemble du territoire situé entre l'endoderme primitif et l'ectoderme définitif (Figure 18B). A la fin de la gastrulation, l'embryon est dit tridermique puisqu'il est composé de 3 feuillets cellulaires spécialisés : l'endoderme définitif, le mésoderme et de l'ectoderme définitif.

2. La neurulation : Spécification du feuillet neurectodermique

Avec la formation du feuillet mésodermique débute une nouvelle phase clé du développement embryonnaire : la neurulation. Les cellules de la partie médiane compactent et forment une structure tubulaire longitudinale, la chorde. Cette organe, aussi appelé organiseur de Spemann, est à l'orgine du déclenchement de la neurulation (Smith WC et al., 1992). En effet, conjointement à l'effet des parties latérales du mésoderme, les somites, la chorde conditionne le devenir des cellules ectodermiques présentes à son contact. En effet, les cellules des

somites synthétisent et sécrètent des molécules morphogènes de la famille des BMPs (Bone morphognetic proteins) ou, quand en parallèle, la chorde synthétise et sécrète leurs principaux antagonistes dont le plus représentatif, Noggin (Smith WC et al., 1992). Les cellules de l'ectoderme sont donc exposées à un gradient de concentration de BMPs selon un axe medio-latéral qui va conditionner leur appartenance au futur tissu neural ou épidermal.

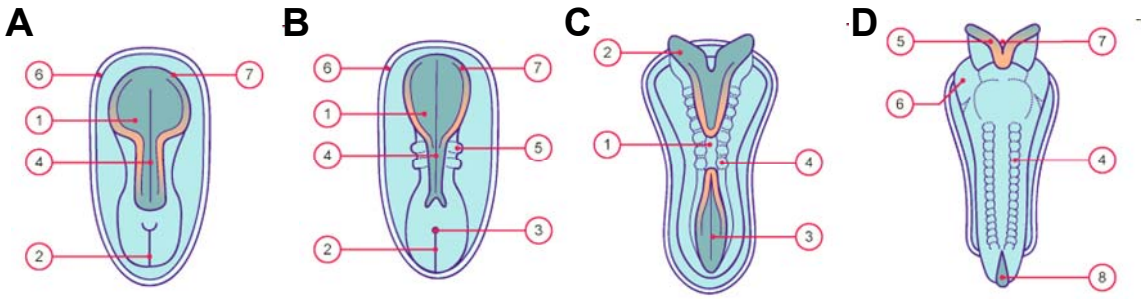


Figure 19: La neurulation : Induction de la plaque neurale chez l'homme.
Schéma représentant les différentes étapes de la neurulation : Formation de la plaque neurale à 23 jours (A) puis 25 jours (B). 1) plaque neurale ; 2) ligne primitive ; 3) nœud primitif ; 4) gouttière neurale ; 5) Somites 6) bord sectionné de l'amnios 7) bourrelet neural.
Suivi de la formation des bourrelets neuraux qui délimitent la gouttière neurale à 28 jours (C) et fermeture du tube neural dans la région cervicale (à mi-longueur de l'embryon) 29 jours (D). 1) bourrelets neuraux fusionnés ; 2) bourrelet neural ;3) gouttière neurale ; 4) somites ; 5) crête neurale (orange) ; 6) renflement péricardique ; 7) neuropore rostral ; 8) neuropore caudal.
Source : Adapté de www.embryology.ch. Copyright: Dr. A. Senn et al, CHUV Lausanne.

La neurulation aboutit donc à la constitution d'un tissu spécialisé, le neurectoderme. (Figure 19). Le neurectoderme naît à la face dorsale (coté cavité amniotique) de l'embryon dans le plan de symétrie. Le 19ème jour, l'ectoderme situé juste au dessus de la chorde s'épaissit pour former la plaque neurale. La plaque neurale apparaît d'abord à l'extrémité crâniale de l'embryon où elle est la plus large puis elle se développe vers la région caudale de l'embryon. Rapidement, les bords latéraux de la plaque neurale se soulèvent créant la gouttière neurale qui s'invagine le long de la ligne médiane. Au 28ème jour, la gouttière neurale commence à se refermer pour former le tube neural, structure précurseur du système nerveux central. Les cellules des lèvres latérales de la gouttière neurale sont à l'origine de la crête neurale, qui s'isole au cours de la fermeture du tube neural puis migrent à travers le mésoderme pour donner naissance à de nombreuses structures périphériques comme les ganglions rachidiens. La partie de l'ectoderme non impliquée dans la genèse du système nerveux forme l'épiblaste. Il se referme au-dessus du tube neural et se transforme en un épithélium (Figure 20).

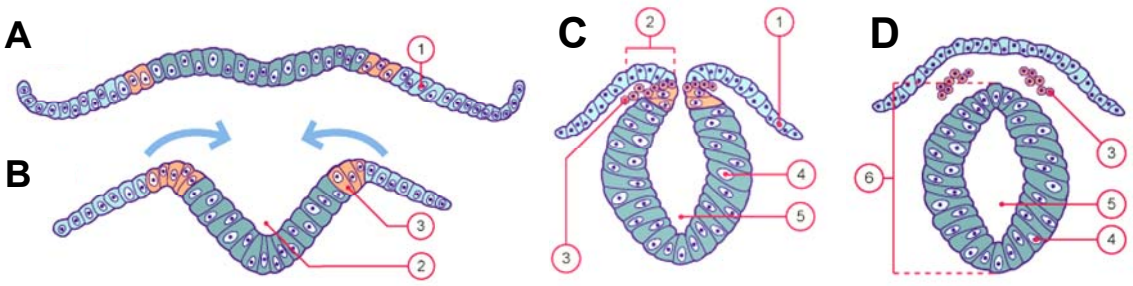


Figure 20: La Neurulation : Formation de l'épiblaste, du tube neurale et des crêtes neurales.
Début de la neurulation dans la région cervicale avec ébauche de formation de la gouttière neurale à 19 jours (A) et 23 jours (B). En orange figurent les cellules de la future crête neurale. Les flèches indiquent le sens du plissement latéral. 1) épiblaste ; 2) gouttière neurale ; 3) crête neurale.
Formation à partir de la plaque neurale de la gouttière neurale et finalement du tube neural. A 25 jours (C) Des amas de cellules se détachent des lèvres latérales de la plaque neurale, constituant les crêtes neurales. A 29 jours (D) les trois structures dérivées de l'ectoderme sont formées: Le tube neural, l'épiblaste et les cellules de la crête neurale. 1) épiblaste ; 2) bourrelets neuraux ; 3) cellules des crêtes neurales en migration ; 4) neuroépithélium ; 5) canal épendymaire ; 6) tube neural.
Source : Adapté de www.embryology.ch. Copyright: Dr. A. Senn et al, CHUV Lausanne.

Cette structure épithéliale primitive sera à l'origine de la formation de l'épiderme. L'engagement des cellules de l'ectoderme dans le lignage neural, épithélial ou des crêtes neurales est principalement régulé par le gradient de BMP créé par les actions conjointes des somites et de la chorde. Toutefois d'autres voies de signalisation incluant les voies du TGFβ (Transforming growth factor β), incluant les BMPs (Bone Morphogenetic Proteins) et Nodal, des FGFs (Fibroblast growth factors), la voie canonique de Wnt (wingless integration site) (pour revue Thomas AJ et al., 2008) ainsi que la voie dépendant de Notch (Figure 21) qui seront décrites dans les paragraphes suivants.

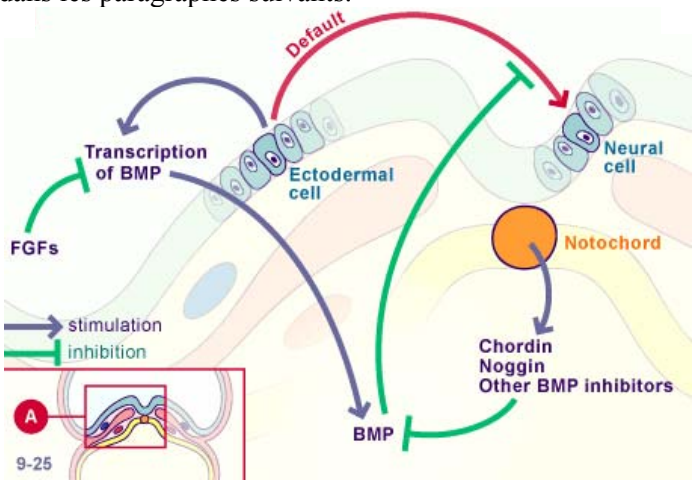


Figure 21: Voies de signalisations impliquées dans le processus de neurulation : Rôle centrale de la voie des BMPs.
La transformation des cellules ectodermiques en cellules neurales se ferait par défaut. Cette différenciation neurale est toutefois inhibée par la décharge tonique de BMP en provenance des cellules ectodermiques. Toutefois, au cours de la gastrulation, des substances telles que follistatine, chordin et noggin sécrétées par la notochorde inhibent l'activité de la BMP, permettant ainsi à la différenciation de la plaque neurale. En outre, avant la gastrulation, les FGFs agissent en inhibant la transcription (mRNA) de la BMP.
Source : Adapté de www.embryology.ch. Copyright: Dr. A. Senn et al, CHUV Lausanne

3. Mécanismes moléculaires régulant l'ontogenèse

3.1. De l'épiblaste à l'épiderme

Chez l'homme dès la fin du processus de neurulation, une ébauche épidermique unicellulaire recouvre le corps de l'embryon. Cet épithélium, appelé «Epiblaste» est constitué de cellules progénitrices exprimant les kératines K8 et K18 (Koster MI et al., 2004). Au début de la 7ème semaine cette structure subit un processus de maturation pour former deux couches cellulaires, une première de cellules dites «basales» (ou ectoblaste) et une seconde de cellules superficielles appelée « périderme » (Figure 22). Au cours de cette étape l'épiblaste commence par exprimer la kératine K5 avant de finalement de ne plus exprimer les kératines K8 et K18 et de les remplacer par la kératine K14 (Koster MI et al., 2004). Cette transition permettant le passage d'un épithélium non stratifié exprimant le couple K8/K18 et la future couche basale de l'épiderme pluristratifié exprimant le couple K5/K14 est assez bien décrite chez la souris mais moins détaillée chez l'homme.

A ce stade, les cellules du périderme forment un épithélium pavimenteux, elles sont plus larges et plus plates que les cellules basales sous jacentes. Leurs surfaces apicales sont en contact avec le liquide amniotique et sont composées de microvillosités.

De la 8ème à la 11ème semaine, l'épiderme commence son processus de stratification pour former une couche intermédiaire de cellules entre les deux couches préexistantes. Les cellules néoformées présentent un phénotype proche des cellules de la couche épineuse de l'épiderme définitif de par leur expression des kératines K1 et K10 ainsi que de la desmogléine. Ces cellules, hautement prolifératives vont former plusieurs assises cellulaires avant de remplacer de manière définitive le périderme à la 23eme semaine de gestation Durant cette période, la couche basale préexistante subit également des changements morphologiques en devenant plus cuboïdes et en exprimant de nouvelles kératines telles que les kératines K6 et K16. A partir de la 21ème semaine commence le processus de kératinisation. La couche intermédiaire se différencie en couche épineuse, couche granuleuse et couche cornée et le périderme rudimentaire est supprimé. A ce stade, les cellules qui composent la couche basale de l'épiderme élaborent des protéines structurales importantes permettant son ancrage au derme telles que les hemidesmosomes et les intégrines α6 et β4. La formation de l'enveloppe cornée imperméable représente la dernière étape de la différentiation des keratinocytes sous l'action des transglutaminases, de la protéine LEKT1 (Lympho-Epithelial Kazal-Type I), la phytanoyl CoA réductase et la stéroïde sulfatase. Au 5ème mois de développement, l'épiderme pluristratifié est fonctionnel.

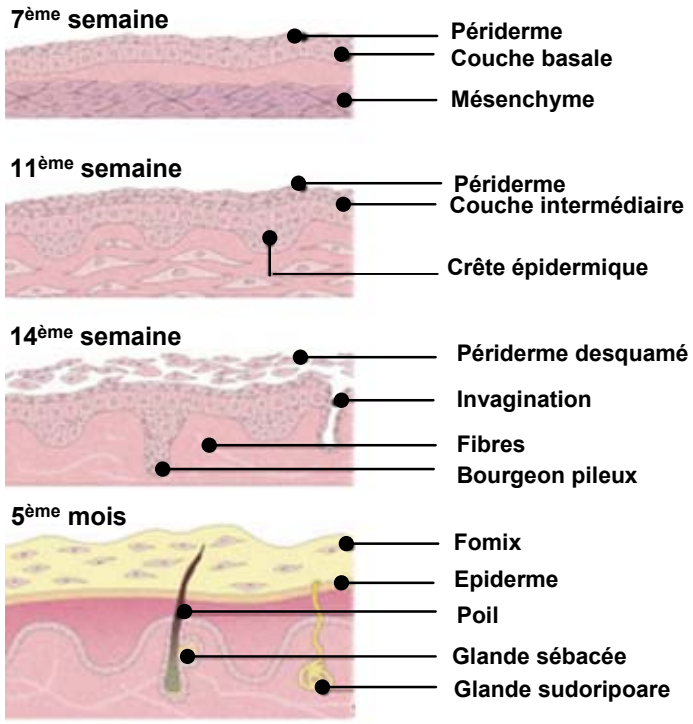


Figure 22: Représentation schématique du passage d'un épithélium simple à un épithélium stratifié au cours du développement embryonnaire humain.

3.2. Rôle centrale de la BMP4 dans l'engagement épidermique

L'épiderme embryonnaire provient du feuillet ectodermique. Il est le résultat d'interactions entre les cellules issues du mésoderme et celles provenant de l'ectoderme qui, au cours de l'embryogenèse, induisent la mise en place de l'ensemble des tissus de l'organisme, incluant l'épiderme. Les études préalablement effectuées sur l'embryogenèse de Xénope ont prouvé l'effet inducteur ou répresseur de différents facteurs de croissance, facteurs nucléaires ou morphogènes. Ainsi il a été démontré que la mise en place des différents lignages ectodermiques était sous l'influence d'un gradient entre les différents facteurs dorsalisant produits par la notochorde (comme la Noggin, la Chordin et la Follistatin) (Hemmati Brivanlou A et al., 1994 ; Sassai Y et al., 1995, zimmerman LB et al., 1996) et le principal facteur ventralisant qui est la BMP4 (Bone Morphogenetic Protein 4) (Hemmati-Brivanlou A et al., 1995). L'hypothèse développée par l'étude du développement ectodermique du Xenope est celui de la différenciation neuronale par défaut initialement proposé par Hemmati-Brivanlou et Melton en 1994. Ainsi selon ce modèle les BMPs ont pour fonction d'empêcher l'induction neurale des cellules de l'ectoderme pour former de l'épiderme (De Robertis EM, Kuroda H, 2004). Les régions de l'ectoderme contenant plus de BMPs s'engageront dans la voie épidermique alors que les régions dans lesquelles l'action des BMPs est inactivée vont donner le neuroectoderme (Hemmati-Brivanlou A, Melton D, 1997) Ainsi au cours de ces

expériences Hemmati-Brivanlou a démontré que les progéniteurs ectodermiques d'embryon de Xénope une fois dissociés et traités à la BMP4 perdaient leurs capacités à se différencier en cellules neurales pour ne devenir que des cellules épidermiques (Figure 23).

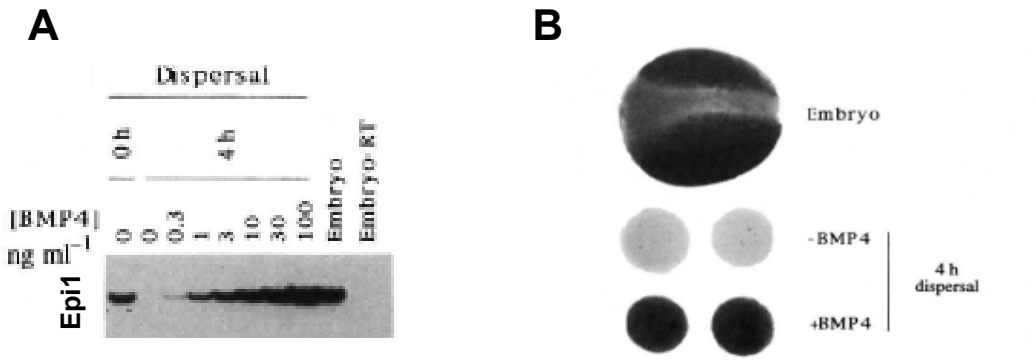


Figure 23: Expériences d'Hemmati-Brivanlou : Mise en évidence du rôle de la BMP4 sur la formation de l'épiderme de Xenope.
Des cellules du neurectoderme de Xenope ont été dissociées et mises en culture avec des con centrations croissantes de BMP4. Ainsi stimulées pendant 4 heures, les cellules se mettent à exprimer la protéine Epi-1 (Epidermis specific antigene) en Western Blot (A) et en Immunohistochimie (B) signifiant leur différenciation dans la voie épidermique.
Source: Wilson PA, Hemmati-Brivanlou A. 1995. Induction of epidermis and inhibition of neural fate by BMP4.

Différentes études ont par la suite complété les études de Hemmati-Brivanlou en caractérisant le rôle de la BMP4 dans le contrôle de la différenciation épidermique. Il a ainsi été montré que l'expression d'une forme tronquée du récepteur BMP (Sassai Y et al 1995, Suzuki A et al., 1997) ou bien d'un dominant négatif de BMP4 (Hawley SH et al., 1995) ou encore d'ARN antisens BMP4 (Sassai Y et al., 1995) dans des cellules ectodermiques bloquait complètement leur différenciation épidermique pour les engager dans le lignage neural. Chez la souris, il a également été démontré qu'au cours du processus de neurulation, la BMP4 était sécrétée au niveau de l'organisateur mésodermique ventral de l'embryon dans le but de définir les régions qui deviendront le futur épiblaste en inhibant la différenciation neurale d'une partie des cellules du neuroectoblaste.

- Les ligands

Les protéines de la famille des TGFβ telles que la BMPs sont dans un premier temps synthétisés sous forme de précurseurs inactifs monomériques qui se dimérisent pour être ensuite clivés. Ce sont des homo-ou hétérodimères C terminaux qui seront actifs et sécrétés (Hogan BL, 1996). Dans le cas des BMPs l'activité biologique des hétérodimères est supérieure à celles des homodimères ; Comme c'est le cas par exemple pour la BMP2 qui a une activité 10 fois supérieure si elle est dimérisée avec la BMP7 ou 6 que sous forme homodimériques.

- Les récepteurs

Les ligands de la famille des TGFβ se fixent sur des récepteurs membranaires à activité Serine/Thréonine kinase. Ces récepteurs sont répartis en deux classes : Les récepteurs de type I, BMPR-IA/ALK3, BMPR-IB/ALK6 et ActR-IB/ALK2 ainsi que les récepteurs de type II, BMPR-II, ActR-II et ActR-IIB (Itoh S et al., 2000). L'activation du récepteur passe par la fixation d'un ligand dimérique avec deux récepteurs de type I et deux récepteurs de type II (Massagué J et al., 1998). Suite à cette liaison, le récepteur de type II recrute par phosphorylation un recepteur de type I, qui se dimérise et phosphoryle les protéines Smad2 et Smad3. Ces deux effecteurs se dimérisent pour ensuite former un complexe avec la protéine co-Smad4 et être transloqué dans le noyau pour réguler l'expression de plusieurs centaines de cibles transcriptionelles.

- La voie des BMPs/SMAD

Les protéines Smads (Mothers against decapentaplegic homolog) sont les substrats intracellulaires majeurs de la voie de signalisation des TGFβ. Elles sont au nombre de 8 chez les mammifères et sont réparties en 3 groupes selon leurs structures et leurs fonctions (Figure 24) :

-Les R-Smads (Receptor regulated Smads) sont phosphorylés par les récepteurs de type I. Parmi elles on trouve les Smads 2, 3 (activées par l'Activin et le TGFβ) ainsi que les Smads 1, 5 et 8 (activées par les BMPs). Il a en effet été démontré que les Smads 1 et 5 pouvaient suppléer l'action du BMP4 pour inhiber l'engagement neural de cellules neurectodermiques en culture.

-La Co-Smads (Common mediator Smads) ou Smad4 est la seule identifiée à ce jour chez les mammifères. Elle se lie à l'extrémité C terminale des R- Smads phosphorylés pour transloquer ce complexe au noyau et ainsi réguler la transcription de nombreux gènes cibles. L'action du complexe ainsi formé peut agir directement sur des séquences promotrices SBE (Smad binding element) ou interagir avec différents cofacteurs comme AP-1, NF-kB (nuclear factor-kappa B) ou encore STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) et ainsi réguler de manière positive ou négative la transcription de leurs cibles

-Les I-Smads (Inhibitory Smads) sont les Smads 6 et 7. Ceux sont les inhibiteurs endogènes de la voie de signalisation du TGFβ. Ces Smads agissent de deux manières, soit, dépourvues de site phosphorylable, elles se fixent sur les récepteurs et ainsi en bloquent l'accès aux R-Smads, soit en empêchant l'interaction entre les R-Smads et les Co-Smads

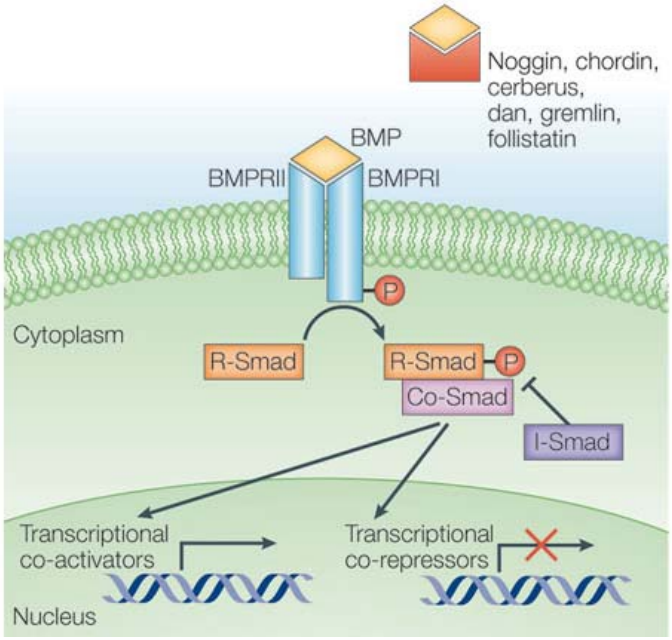


Figure 24: Schéma illustrant les cascades de régulation des Smads induites par la voie des BMPs.
Source: Liu A et al., 2005. Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development.

- La voie des BMPs/MAPK

Une seconde voie de signalisation peut être activée par la voie des TGFβ, il s'agit de la voie des MAPK (Mitogen-activated protein kinase). En effet en 1995 une étude a démontré qu'une protéine appartenant à la famille des MAPKKK (MAP kinase kinase kinase) ayant comme substrat la protéine p38 MAPK pouvait médier la transduction du signal TGFβ (yamaguchi Ket al., 1995). Les auteurs ont également montré que cette protéine était directement activée par l'action de BMP4 et TGFβ et ceci de manière dose dépendante. Cette voie de signalisation semble avoir un rôle similaire à celle des Smads puisqu'il a été montré qu'elle participait à la ventralisation de l'embryon de Xenope (Shibuya H et al., 1998) et qu'elle pouvait être bloquée par les I-Smads (yanagisawa M et al., 2001). L'activation de la voie BMP/Smad ou BMP/MAPK semble dépendre de la nature de la liaison du ligand au recepteur. En effet lorsque les récepteurs de type I activent le recrutement des récepteurs de type II, c'est la voie des MAPK qui est activée. Par contre lorsque le ligand se lie à un complexe préformé c'est la voie des Smad qui médie le signal.

- Les gènes cibles des BMPs

Un grand nombre de gènes ont été identifiés pour être transcritionellement régulés suite à une activation de la signalisation des BMPs. Il s'agit principalement de gènes impliqués dans le développement tels que les homéogenes (msx1, msx2, mix1, hox3, fd1 et myf5) , Mis en évidence chez la drosophile puis chez le Xenope ces protéines, particulièrement msx2, régulent l'organisation du plan de développement de l'organisme (Marazzi G et al., 1997)

.Les gènes appartenant à la famille Id (Inhibitor of differentiation), les facteurs de transcription vent-1 et vent-2 (Gawantka V et al., 1995), les gènes codant pour Wnt-8 (Hoppler S et al., 2000), Smad8 (Nakayama T et al., 1998) sont également des cibles de la BMP4 et ont toutes été mis en évidence dans l'étude du développement du Xenope (pour revue Karaulanov et al., 2004). Par ailleurs, des expériences initialement réalisées chez le poisson zèbre mais confirmées par la suite chez le mammifère ont démontré que la protéine p63, un homologue du facteur de transcription p53, était une des cibles majeures de la voie des BMPs dans le mécanisme de répression de la différenciation neurale (Bakkers J et al., 2002 ; Lee H et al., 2002).

3.3. Rôle de p63 dans le développement épidermique

Un des facteurs clé de l'engagement des cellules de l'ectoblaste dans le lignage épidermique est le facteur de transcription p63 dont la structure et la fonction ont préalablement été décrits pour réguler la différenciation des kératinocytes à la fois *in vitro* et *in vivo* (Voir chapitre I.A.2.1.3). Le rôle de p63 dans le développement de la peau a dans un premier temps été étudié dans le modèle du poisson zèbre (Bakkers J et al., 2002) (Figure 26). Cette étude a ainsi démontré que l'extinction du gène codant p63 entrainait d'importantes anomalies développementales incluant des anomalies structurales de la peau (Figure 25A). Dans un deuxième temps, l'étude du phénotype de souris déficientes en p63 (Souris $p63^{-/-}$) a démontré que cette protéine jouait un rôle majeur dans la différenciation épidermique des mammifères puisque parmi les nombreux défauts développementaux, ces souris KO (Knock out) présentent un épiderme anormal (Figure 25 B) (Candi E et al., 2006). Les auteurs de cette étude ont également démontré que la surexpression de l'isoforme ΔNp63 au cours du développement pouvait partiellement corriger ces anomalies en induisant une légère stratification caractérisée par l'expression de la kératine K10 et de la filaggrine (Figure 25B).
Des travaux récents suggèrent que l'engagement embryonnaire des cellules ectodermiques vers le lignage kératinocytaire nécessitent l'expression de TAp63 alors qu'à l'inverse ΔNp63 jouerait un rôle dans la stratification épidermique (Candi E et al., 2007). L'invalidation du gène p63 dans le modèle murin ou le poisson zèbre ainsi que l'analyse phénotype-génotype des mutations de p63 chez l'homme ont démontré indiscutablement le rôle de p63 dans la formation embryonnaire de l'épiderme et dans l'homéostasie de la peau.

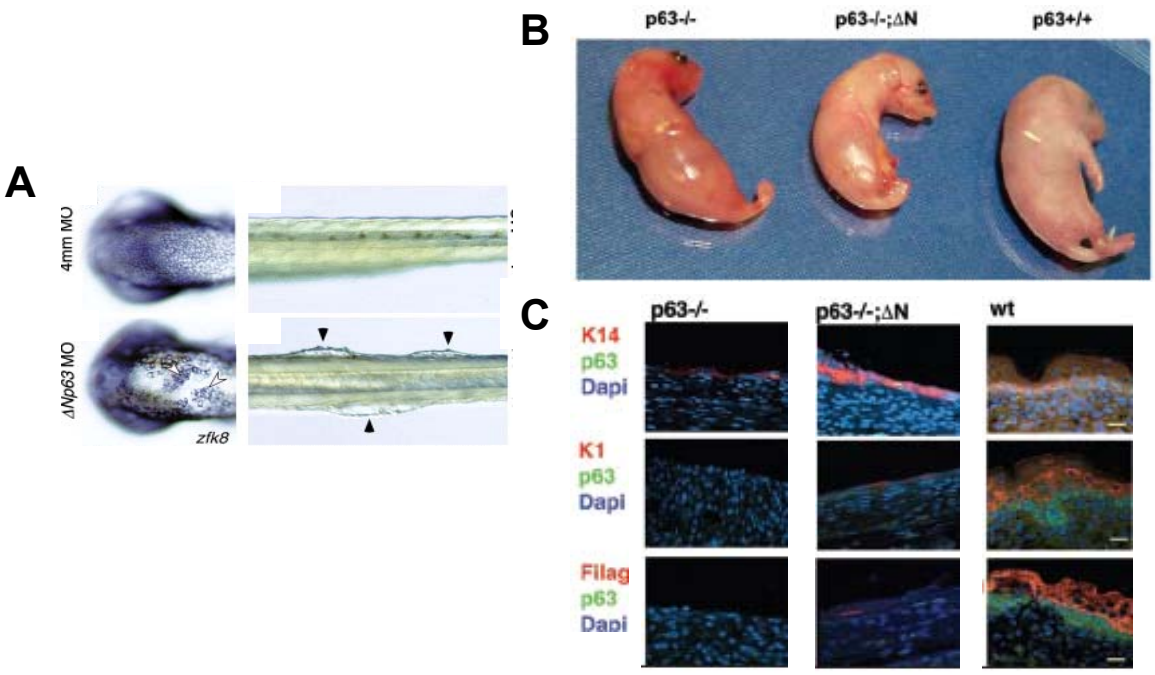


Figure 25: Démonstration du rôle de p63 dans des modèles de Knock down réalisés sur le poisson zèbre et la souris.
(A) Formation de l'épiderme dans un modèle de poisson zèbre après l'extinction de ΔNp63 par morpholino oligonucleotides (MO).
Source Jeroen Bakkers et al 2002 "Zebrafish ΔNp63 Is a Direct Target of Bmp Signaling and Encodes a Transcriptional Repressor Blocking Neural Specification in the Ventral Ectoderm".
(B) Phénotype des souris KO p63-/-, des souris KO p63-/- après surexpression de ΔNp63 et des souris normales p63+/+.
(C) Etude immunocytochimique des marqueurs K14, p63, K1 et filaggrine au niveau des épidermes de souris KO p63-/- avec ou sans surexpression de ΔNp63, en comparaison avec des souris WT (Wild type).
Source: Candi E et al., 2007 "TAp63 and DeltaNp63 in Cancer and Epidermal development".

Différentes hypothèses ont été proposées pour expliquer les mécanismes contrôlés par p63 durant l'ontogenèse. La première vient du groupe de McKeon qui en 1999 a démontré que p63 était nécessaire au maintien de la capacité proliférative des cellules souches épidermiques (Yang A et al., 1999). La seconde est que p63 contrôlerait directement les mécanismes de spécification, de différentiation et de stratification des cellules épithéliales (Koster et al., 2004).Comme nous l'avons vu précédemment, au niveau épidermique, l'isoforme TAp63 est exprimé dans les couches suprabasales des épithéliums stratifiés (Nylander K et al., 2002) alors que l'isoforme ΔNp63 est préférentiellement exprimé dans la couche basale (Yang A et al., 1998). Ces observations combinées à l'analyse phénotypique des souris $p63^{-/-}$ ont mené le groupe de McKeon à proposer qu'au niveau cutané, la fonction régulatrice de p63 consistait à maintenir le potentiel prolifératif des cellules souches épidermiques. Dans ce modèle l'expression de p63 dans les cellules souches épidermique est nécessaire à l'initiation du développement de la peau et à la régénération de l'épiderme tout au long de sa vie. Ce modèle permet également d'expliquer pourquoi, à certains endroits de l'épiderme de souris KO $p63^{-/-}$,

il est possible de détecter ponctuellement certains marqueurs tels que l'involucrine, la loricrine et la filaggrine (yang et al 1998).

En 1999, une hypothèse alternative permettant d'expliquer le rôle de p63 dans le développement de l'épiderme a été proposé par le groupe de Dennis Roop sur un modèle de souris KO similaire à celui de Franck McKeon (Mills AA et al., 1999). Leur hypothèse est que p63 régulerait l'initiation de la stratification et la différenciation des cellules progénitrices de l'ectoderme en kératinocytes. En effet, dans leur modèle de souris KO, les cellules progénitrices de l'ectoderme, exprimant les kératines K8 et K18, ne se différencient pas correctement et contrairement à des souris normales ne se mettent pas à exprimer les kératines K5 et K14 (Figure 25 B et C). La conséquence de ce KO est que les souris naissent avec un « pseudo épiderme » constitué uniquement de cellules immatures présentant un phénotype similaire aux cellules de la couche superficielle de l'ectoderme. Dans le but de comprendre à quel stade de développement, ces cellules progénitrices étaient bloquées, les auteurs ont isolé les cellules de ce « pseudo épiderme » au jour embryonnaire 18.5 et ont montré que ces cellules exprimaient tout de même les marqueurs spécifiques de la stratification mais pas les kératines K5 et K14.

Chez l'homme la mutation du gène p63 est reliée à plusieurs syndromes malformatifs héréditaires sévères. Tous ces syndromes ont un mode de transmission autosomale dominant et sont au nombre de 5 : EEC (Ectrodactyly-Ectodermal dysplasia-Clefting), AEC (Ankyloblepharon-Ectodermal dysplasia-Clefting), LMS (Limb-Mammary Syndrome), ADULT (Acro-Dermato-Ungual-Lacrymal-Tooth) et SHFM (Human Split-Hand/Foot Malformation).

Les anomalies phénotypique induites par ces syndromes sont très similaires aux malformations observées dans les souris KO $p63^{-/-}$. Ils sont caractérisés par plusieurs anomalies liées au développement des membres (ectrodactylie), des dérivés de l'ectoderme (poils, peau, dents, ongles, glandes sudoripares et mammaires) et de la face (fente labio-palatine).

Malgré une accumulation importante de données sur l'engagement et la différenciation cutanée in vivo, en grande partie grâce à la technologie de la transgénèse, l'absence d'un modèle cellulaire humain approprié ne permet toujours pas l'étude des évènements moléculaires précoces responsables des engagements épidermiques chez l'homme.

4. Morphogénèse du système nerveux central à partir du tube neural

La neurogenèse est un processus précoce qui débute, chez l'homme, dès la 3e semaine du développement embryonnaire et qui aboutit à la formation du système nerveux et à la mise en place de la quasi-totalité des structures cérébrales vers la 12e semaine. Chez les chordés, le

système nerveux se développe à partir du tube neural durant l'étape de neurulation. Les cellules du tube neural, appelées cellules NEP (cellules neuro-epithéliales) sont dites multipotentes puisque, si elles ne sont plus capables de produire l'ensemble des types cellulaires de l'organisme, elles peuvent toutefois donner naissance à tous les types cellulaires du lignage neural tel que les neurones, les astrocytes. Les NEP expriment certaines protéines structurales spécifiques telles que la protéine associée aux filaments intermédiaires Nestine, ou la protéine d'ancrage cellulaire NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule). Sous l'influence de cascades moléculaires complexes, impliquant de nombreux morphogènes, les cellules du tube neural subissent en parallèle une multiplication intense ainsi qu'une spécification régionale. Ce processus entraîne vers la 5e semaine la subdivision progressive du tube neural en 3 vésicules ayant un destin différent: le prosencéphale, le mésencéphale et le rhombencéphale. Le prosencéphale se subdivisera à son tour en télencéphale et diencéphale, et le rhombencéphale en métencéphale et myélencéphale. L'étude du développement neural chez les chordés a ainsi permis d'identifier quatre voies principales de signalisation régissant les phénomènes de formation puis de régionalisation du système nerveux : la voie des TGFβ incluant les BMPs et la voie Activin/Nodal (pour revue Kitisin K et al., 2007), la voie des FGFs, la voie canonique de Wnt (pour revue Thomas AJ et al., 2008) et enfin la voie Notch (Gaulden J, Reiter JF, 2008). Les BMPs ont une activité inhibitrice sur la formation du neuroectoderme (voir chapitre II.A.). Des antagonistes de ces molécules tels que Noggin, Chordin et Follistatin, sont sécrétés par la notochorde et le mésoderme paraxial au cours de l'induction neurale. Si le rôle des BMPs fait consensus dans la communauté scientifique, celui des autres voies de signalisation apparaît moins bien établi. Bien que la voie Wnt/β-catenine semble être importante au stade blastula pour induire l'expression des antagonistes des BMPs, son inhibition est nécessaire à un stade plus tardif pour permettre l'induction neurale. Il en est de même, pour Nodal dont le KO bloque la neuralisation des tissus du neurectoderme chez la souris (Camus A et al., 2006). Les voies FGFs et Notch sembleraient quant à elles avoir une activité pro-neurale. L'expression de certains facteurs de transcription tels que les gènes *Sox1*, *Sox2* et *Sox3 (*Sex determining region Y-box 1, 2 et 3) appartenant à la sous-famille *SoxB1* signe au final l'engagement des cellules dans le lignage neural. (Bylund M et al., 2003 ; Kan L et al., 2004)..

5. De la crête neurale aux mélanocytes :

5.1. Généralités

Les cellules des crêtes neurales sont à l'origine de nombreux types cellulaires telles que les neuroblastes du système nerveux périphérique, les glioblastes de la glie périphérique, les

médulloblastes, les cellules de l'éctomésenchyme de la région céphalique, les cellules des leptoméninges, ainsi que les mélanoblastes (cellules à l'origine des mélanocytes) (Figure 26). Ces cellules constituent donc un véritable quatrième feuillet embryonnaire avec une organisation segmentaire partielle participant à la formation du système nerveux périphérique (neurones ainsi que cellules gliales des systèmes nerveux sympathique, parasympathique et sensoriel).

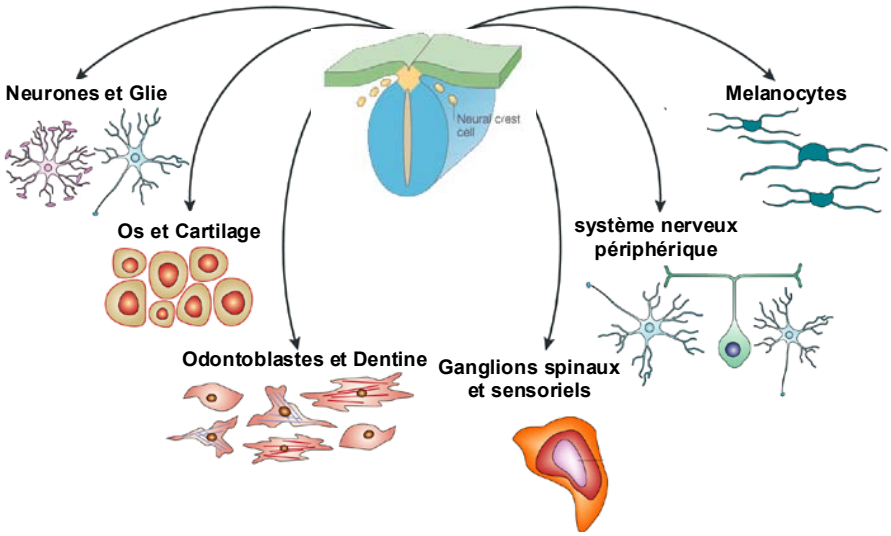


Figure 26: Les cellules dérivées de la crête neurale.
Adapté de: Aaron J. et al 2008. The making of a melanocyte: the specification of melanoblasts from the neural crest.

Ainsi lors de la fermeture de la gouttière neurale durant le processus de neurulation, certaines cellules situées à la jonction entre le neuroectoblaste et l'ectoblaste prolifèrent suite à l'interaction de ces deux tissus et migrent en profondeur. Ces cellules présentent des capacités migratoires remarquables ainsi qu'une diversité phénotypique puisqu'elles donnent naissance à de nombreux types cellulaires différenciés. Les mécanismes régulant la migration de ces cellules ne sont pas encore totalement identifiés même si des évidences ont démontré que la famille des TGFβ semblait stimuler le départ en migration des cellules de la crête neurale en modifiant leurs propriétés d'adhérence au niveau des composants la matrice extracellulaire (fibronectine, laminine, collagène) (Garamszegi N et al., 2010). La fin de la migration cellulaire est associée à une réexpression des cadhérines et des NCAM, molécules favorables à l'adhésion des cellules (Nakagawa S et al., 1991).

5.2. Induction du lignage mélanocytaire

Les mélanocytes dont des cellules dérivées de la crête neurale dont la fonction principale est la production de mélanines permettant la pigmentation de la peau et des poils. Parmi l'ensemble des cellules composant les dérivés de la crête neurale se trouvent leurs précurseurs, les mélanoblastes. La différenciation des mélanoblastes en mélanocytes

(acquisition du caractère dendritique et synthèse de mélanine) se produit chez l'Homme entre la 8ème et la 14ème semaine. Après une migration qui s'effectue selon un axe dorsoventral et craniocaudal, les mélanoblastes atteignent la couche basale de l'épiderme et les follicules pileux pour y terminer leur différenciation. Chez la souris ce processus a été caractérisé par MacKenzie et ses collaborateurs en réalisant des souris transgéniques exprimant la cassette LacZ, sous le contrôle du promoteur du gène Dct/TRP2 (Figure 27) (Mackenzie MA et al., 1997). Ils ont ainsi démontré que les mélanoblastes commençaient leur migration vers 10.5 jours de développement pour coloniser l'épiderme de l'animal vers E16.5 (Figure 27). L'activation des voies des Wnt/β-caténine (Jin EJ et al., 2001) et Notch (Moriyama M et al., 2006) ont clairement été déterminées comme étant des éléments majeurs dans le contrôle de la survie de ces progéniteurs au cours de leur maturation.

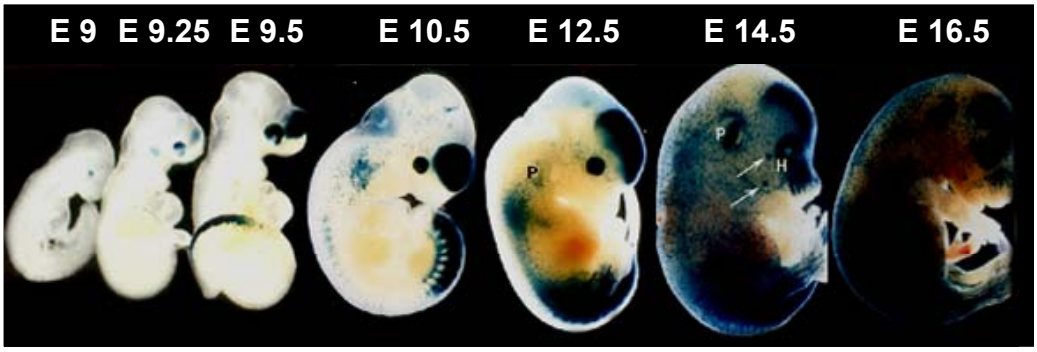


Figure 27: Migration des mélanoblastes au cours du développement embryonnaire de souris.
Embryons de souris transgéniques *Dct-lacZ (MarquageXGal des mélanoblastes)* : E9, E9.25, E9.5, E10.5, E12.5, E14.5, et E16.5. Entre les stades E10.5 et E12.5, les mélanoblastes migrent le long des somites et commencent à se disperser au niveau de l'épiderme (E 14.5) pour recouvrir la quasi totalité de la surface de l'embryon (E16.5.).
Adapté de : Activation of the Receptor Tyrosine Kinase Kit is required for the proliferation of Melanoblasts in the mouse embryo Mackenzie MA et al 1997.

5.3. Les facteurs clés de la différenciation mélanocytaire

Initialement, les principaux facteurs impliqués dans la migration et la différenciation des melanoblastes ont été identifiés par l'étude des phénotypes hypopigmentant d'origine génétique observés chez la souris. L'étude des hypomélanoses humaines ont par la suite confirmé que certains gènes essentiels régulaient les différentes étapes du développement des mélanocytes tel que M mais également PAX3 (paired box 3), SOX10 (Sex determining region Y-box 10), c-Kit (cytokine receptor), Kitl ou SCF (cytokine receptor ligand or Stem Cell Factor), EDN3 (Endothelin 3) et EDNRB (Endothelin receptor type B)(Figure 28).

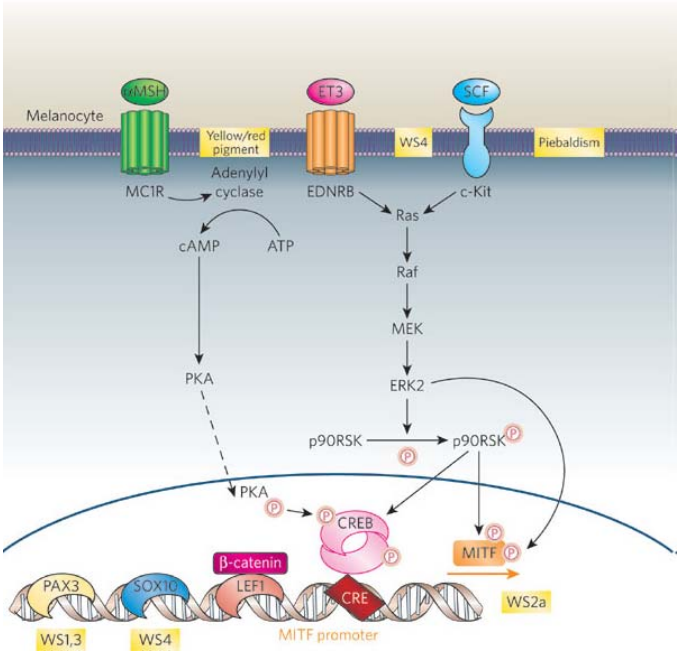


Figure 28 : Schéma représentant les principaux gènes impliqués dans la différenciation des mélanocytes au cours du développement embryonnaire.
Source : Lin JY et al., 2007. Melanocyte biology and skin pigmentation.

-Rôle centrale de MITF

MITF est un facteur de transcription clé pour l'initiation de la transcription de plusieurs gènes spécifiques de la lignée mélanocytaire qui peut avoir des fonctions très différentes selon l'isoforme produit. Au niveau des mélanocytes, l'isoforme MITF-M est majoritaire et a pour fonction de réguler à la fois la mélanogénèse et le développement mélanocytaire. Les cibles transcriptionelles de MITF sont à la fois des enzymes de la mélanogénèse (Tyrosinase, TRP1, TRP2) (Yasumoto K et al., 1997), des protéines de structure du mélanosome (Silv/Pmel17/Gp100) (Du J et al., 2003) et d'acteurs impliqués dans la survie des mélanoblastes (Bcl2) (McGill GG et al., 2002). Chez l'homme, des mutations du gène du MITF sont à l'origine du syndrome de Waardenburg de type II-A, qui se manifeste par une hypomélanose localisée, une absence de mélanocytes cutanés, iriens et pilaires ainsi qu'une surdité. Le rôle central de MITF a par ailleurs été montré par des études de reprogrammation génétique. Ainsi, Tachibana et coll ont démontré que la surexpression de MITF dans des fibroblastes en culture conduisait l'acquisition d'une morphologie dendritique similaire à des melanocytes ainsi qu'à l'expression de marqueurs de la différenciation mélanocytaire (Tachibana M et al., 1996).

-PAX3 et SOX10 :

Il s'agit de deux facteurs de transcription régulant l'expression de MITF. Initialement identifiés chez certaines souris *pie* (ou *piebald*). PAX3 (mutant *Splotch*) est un facteur de transcription à homeo-domaine régulant l'expression de Mitf dont la mutation a pour

phénotype un ventre blanc chez la souris (Epstein DJ et al., 1991). Chez l'homme des mutations du gène PAX3 peuvent être à l'origine de syndrome de Waardenburg de types I et III. SOX10 (mutant *Dom*) est un facteur de transcription de la famille HMG (High Mobility Group) homologue au facteur SRY (Sex determining factor). Il active en coopération avec PAX3 l'expression de MITF dans les mélanoblastes pour promouvoir leur survie et leur différentiation en mélanocytes (Poterf SB et al., 2000). Chez l'homme, des mutations du gène de SOX10 ont été rapportées au cours de syndrome de Waardenburg de type IV.

-c-Kit / Kitl

Kit (ou c-Kit) est un récepteur membranaire de type tyrosine kinase exprimé à la surface des mélanoblastes et ayant pour ligand Kitl encore appelé stem cell factor (SCF) ou mast cell growth factor (MGF). Chez la souris, son rôle a été mis en évidence dans le contrôle de la survie, de la migration et de la différentiation des mélanoblastes en mélanocytes respectivement par l'analyse du phénotype des mutants *Dominant white-spotting* et *Steel* (Figure 29) (Mackenzie MA et al., 1997). Sa fonction a par la suite été confirmée chez l'homme. En effet les mutations de ce gène sont à l'origine du piébaldisme, pathologie se caractérisant par une absence de mélanocytes dans les zones médianes et aux extrémités du corps. Le rôle de c-Kit une fois lié à son ligand, est d'activer la voie des MAP Kinases (MEK/ERK/RSK), PI3 Kinases, JAK/STAT et des membres de la famille Src (Broudy VC et al., 1999) pour délivrer un signal anti-apoptotique et activer l'expression MITF

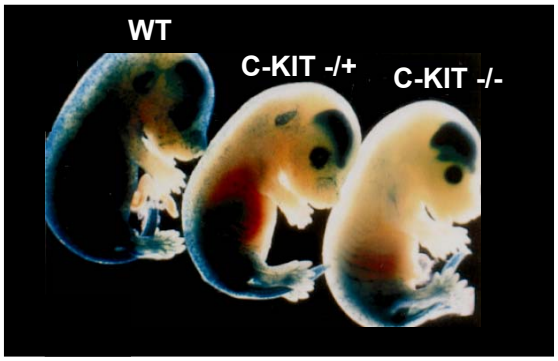


Figure 29: c-Kit est impliqué dans la survie et la migration des mélanoblastes.
Embryons de souris transgéniques Dct-lacZ (MarquageXGal des mélanoblastes). Comparaison du nombre et de la localisation de melanoblastes dans les souris WT, c-Kit-/+ et c-Kit-/-(mutant spotting)
Adapté de : Mariana A F et al 1997. Activation of the Receptor Tyrosine Kinase Kit is required for the proliferation of Melanoblasts in the mouse embryo.

-EDN3/EDNRB

Tout comme les mutants du couple ligand/récepteur c-Kitl/Kit, les mutations du couple EDNRB/EDN3 entrainent respectivement le phénotype *Piedbal-lethal* et *Lethal-spotting* ayant pour conséquence un développement mélanocytaire anormal. L'endothéline 3 (ou

EDN3) est un peptide vasoconstricteur de 21 acides aminés dont le récepteur (EDNRB) largement exprimé par les mélanoblastes murins. L'activation de son récepteur couplé à une protéine G, l'EDNRB conduit à l'activation des voies de signalisation PKC (Protéine Kinase C), CamKII (Ca 2+ /Calmodulin-Dependent Protein Kinase II), et MAP Kinases (Imokawa G et al., 2000) en synergie avec le couple c-Kit/Kitl pour réguler la migration des mélanoblastes. Il a également été montré in vitro que l'EDN3 est un puissant mitogène des cellules pluripotentes des crêtes neurales et un inducteur de la différenciation de ces cellules vers les lignées mélanocytaires (Dupin Eet al., 2001) (Figure 30). Chez l'homme, des mutations des gènes de l'EDN3 et de l'EDNRB sont à l' origine de syndrome de Waardenburg de type IV, qui associe une dépigmentation due à l'absence de mélanocytes et un mégacôlon due à l'absence de cellules gliales coliques.

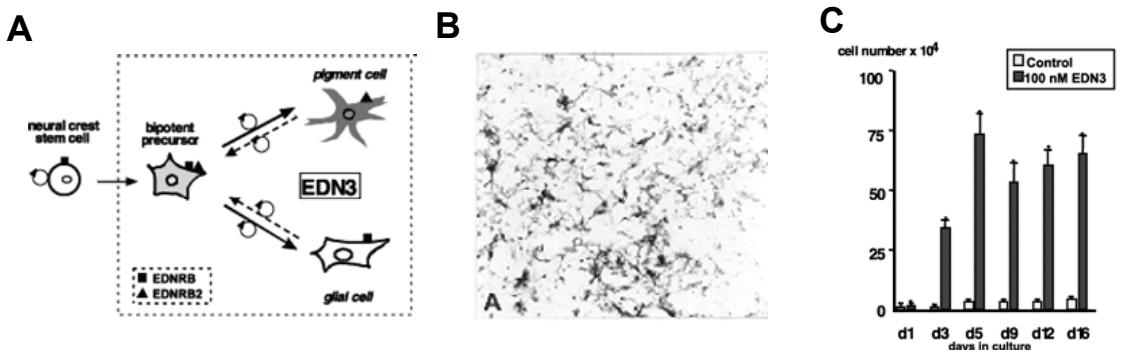


Figure 30: L'endothéline 3 participe au processus de pigmentation et à la prolifération des cellules de la crête neurale.
(A) Schéma décrivant le profil d'expression du recepteur à l'endothelin 3 durant le processus de différenciation des cellules de la crête neurale en cellules mélanogéniques.
(B) Effet de l'endothéline 3 sur la pigmentation de culture primaire de crêtes neurales aviaires.
(C) Effet de l'endothéline 3 sur la prolifération des cellules en cultures dérivés de crêtes neurales aviaires.
Adapté de Dupin E. et al., 2001. The neural crest stem cells: control of neural crest cell fate and plasticity by endothelin-3.

Tous ces mutants, chez l'homme comme chez la souris, ont pour conséquence une altération des processus soit de différenciation soit de migration des mélanoblastes entrainant l'apparition de zones partiellement ou totalement dépigmentées selon la sévérité de la mutation ou le gène affecté. La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement mélanocytaire normal peut permettre d'appréhender les processus souvent analogues mis en place lors de l'oncogenèse mélanocytaire.

A ce jour aucun modèle développemental humain ne permet d'étudier, *in vitro*, les mécanismes moléculaires impliqués dans la mise en place des lignages épithéliaux, neuraux et mélanocytaires. Grace à leur propriétés de pluripotence, les cellules souches pluripotentes apparaissent être une alternative unique aux études, *in vivo*, impossible à effectuer chez l'homme.

B. Les cellules souches pluripotentes

1. Cellules souches embryonnaires humaines

1.1 Origine, dérivation et propriétés des cellules hES.

Les cellules souches embryonnaires humaines ou cellules hES (human embryonic stem cells) sont principalement caractérisées par deux propriétés majeures, elles sont pluripotentes et possèdent une capacité d'autorenouvellement illimitée, ce qui les rend conceptuellement immortelles. Ainsi en fonction des protocoles de différenciation utilisés ces cellules peuvent se différencier dans l'ensemble des types cellulaires qui composent un organisme (Figure 31).

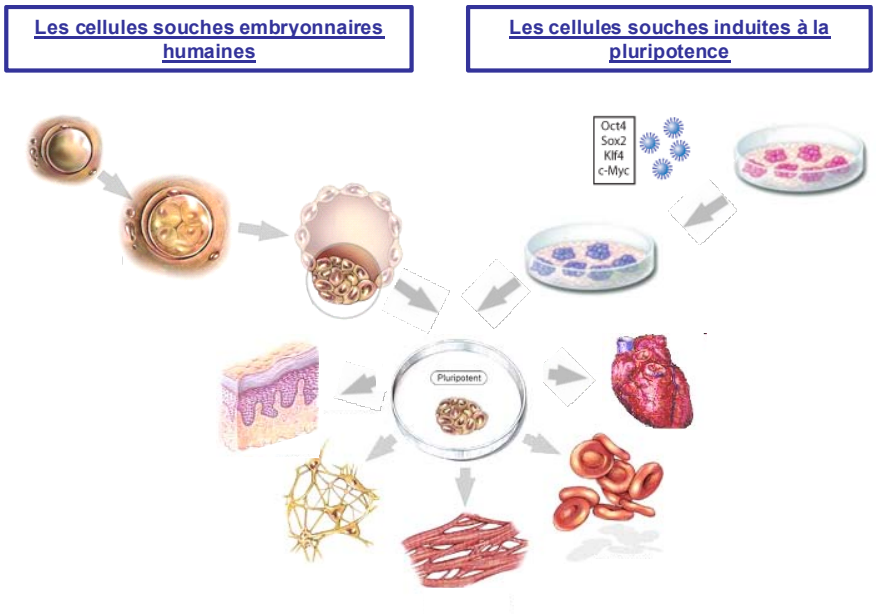


Figure 31: Les cellules souches pluripotentes.

Ces cellules ont été mises en évidence en 1981 dans un premier temps chez la souris simultanément par Martin Evans, Mattew Kaufman et Gail Martin (Evans MJ, Kaufman MH, 1981, Martin GR et al., 1981) et ont ensuite été dérivées chez l'homme en 1998 par les équipes de James Thomson(Thomson JA et al., 1998), Joseph Istkovitz-Eldor et Benjamin Reubinoff. Pour ces travaux, Evans, Kaufman et Martin ont obtenus le prix Nobel de médecine en 2007. Les lignées de cellules hES sont établies à partir d'embryons surnuméraires obtenus lors d'une procédure de Fécondation In Vitro (ou FIV) dans le cadre strict d'un protocole d'Assistance Médicale à la Procréation (ou AMP).. Ainsi lorsque les embryons surnuméraires ne font plus l'objet de projet parental et après obtention du consentement éclairé des deux parents, les cellules de la masse cellulaire interne du blastocyste, entre le 5e et le 7e jour après fécondation sont isolées et mise en culture selon un protocole décrit Figure 32. Cette étape d'isolation est généralement réalisée par

immunochirurgie, technique consistant à digérer la zone pellucide avec des enzymes puis lyser le trophectoderme par réaction anticorps-complément (Thomson JA et al., 1998). Bien que d'autres techniques fondées sur une séparation mécanique peuvent également être utilisées (Heins N et al., 2004 ; Amit M, Itskovitz-Eldor J, 2002), l'isolation par immunochirurgie est celle qui comportent le moins de risque d'une sur-prolifération des cellules du trophectoderme au détriment des cellules de la masse interne. Une fois isolées, les cellules de la masse interne sont cultivées sur cellules nourricières dans des conditions favorisant leur prolifération, en présence de bFGF (*fibroblast growth factor* basique) et après quelques semaines les lignées de cellules hES sont établies.

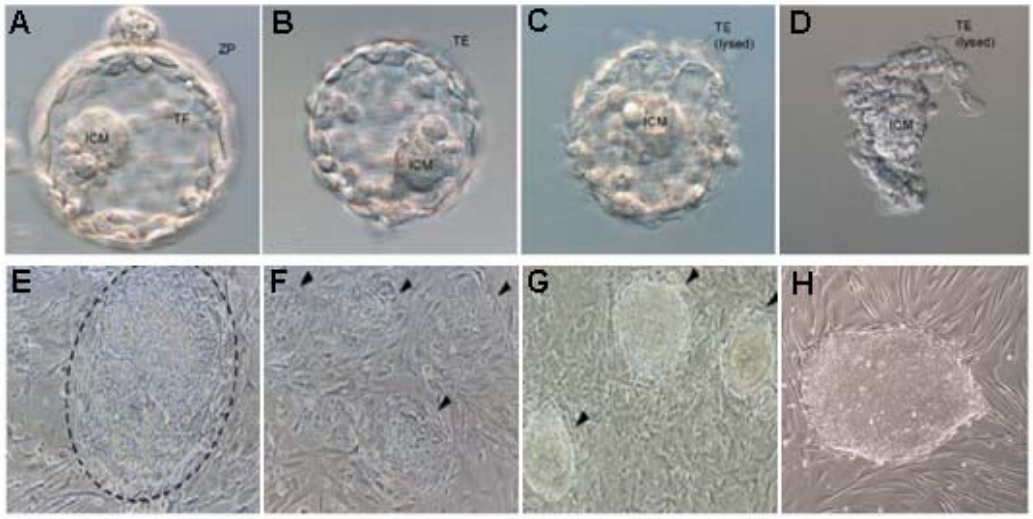


Figure 32: Dérivation de lignées de cellules souches embryonnaires humaines (hES).
A-H : Photos de microscopie représentant les différentes étapes de la dérivation de lignées de cellules hES à partir d'un blastocyste (A). Les cellules sont dans un premier temps dégradées par l'utilisation d'un Anticorps dirigé contre les cellules humaines en tandem avec le complément (B). Une fois le traitement terminé (C) les cellules sont traitées à l'Acide Tyrode qui va dissoudre la zone pellucide (5-30 secondes) et isoler la Masse cellulaire interne (D). Les cellules de la MCI sont ensuite ensemencées sur des Fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) (E) et après quelques passages (F et G) des colonies de cellules hES sont observables (H).
Adapté de : Alice E. Chen, Douglas A. Melton "Derivation of Human Embryonic Stem Cells by Immunosurgery" Journal of Visualized Experiments.

Lorsque les embryons sont porteurs d'une anomalie génétique recherchée dans le cadre d'un diagnostic préimplantatoire (ou DPI) (Figure 33), il est ainsi possible de dériver des lignées de cellules hES porteuses de ce défaut génétique et ainsi réaliser des études de modélisation pathologique *in vitro*. A l'occasion d'un DPI, il est ainsi possible de détecter des anomalies caryotypiques telles que des trisomies, des translocations ou des aneuploïdies ainsi que des mutations ou des délétions partielles. Au 1er janvier 2006, environ 300 lignées avaient été dérivées et publiées dans plus de 20 pays (essentiellement États-Unis, Israël, Grande-Bretagne, Suède, Australie, Corée du Sud, Espagne) mais, seule une vingtaine sont réellement utilisées en recherche par la communauté internationale.

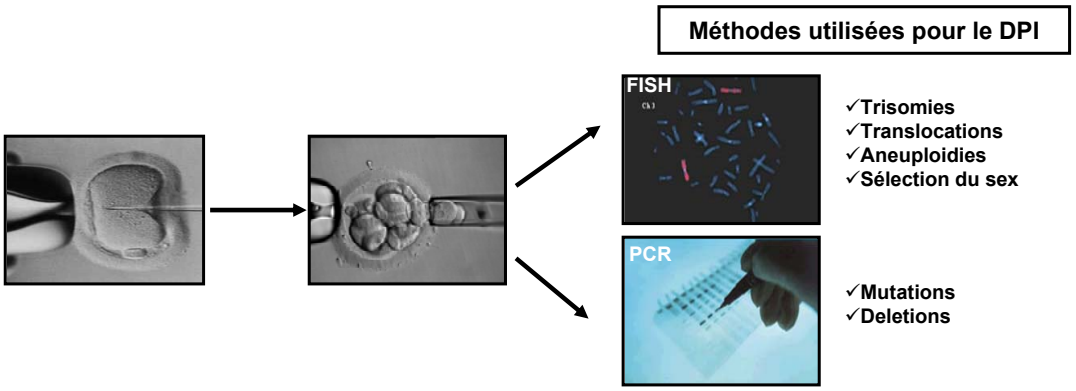


Figure 33: Le diagnostic préimplantatoire (DPI).

A ce jour plusieurs équipes ont démontré la capacité des cellules hES à se différencier dans un grand nombre de types cellulaires tels que des cellules gliales (Reubinoff BE et al., 2001 ; Hong S et al., 2008), divers sous-types de neurones (Perrier AL et al., 2004 ; Hong S et al., 2008), des cardiomyocytes (Mummery CL et al., 2007), des précurseurs hématopoïétiques (Chadwick K et al., 2003), des cellules sécrétrices d'insuline (Van Hoof D et al., 2009), ou encore des hépatocytes (Baharvand H et al., 2008). Au niveau épidermique, il a été montré que ces cellules pouvaient s'engager dans les lignages épithéliaux (Metallo CM et al., 2008) et mélanocytaires (Fang D et al., 2006).

1.2 Potentiel thérapeutique des cellules hES

L'identification de lignées cellulaires potentiellement immortelles, présentant la capacité de se différencier dans n'importe quelle cellule adulte offre des perspectives de recherche thérapeutique innovantes de premier ordre. La médecine régénératrice, qui vise à régénérer un organe dont les cellules ont été détruites par greffe ou injection de cellules, trouve donc dans les cellules hES une source cellulaire unique pour répondre au traitement de pathologies touchant n'importe quel organe. Ainsi les premières évidences ont été apportées chez la souris où les cellules mES ont démontré leur capacité à traiter des pathologies tels que l'infarctus du myocarde (Menard C et al., 2005), le diabète (Kroon E et al., 2008) ou la maladie de parkinson (Roy NS et al 2006). La transposition au modèle humain nécessite cependant quelques adaptations. Il est ainsi nécessaire de vérifier la « sureté » et « la tolérance » de la greffe. En effet une différenciation incomplète des cellules hES peut être à l'orgine de la formation de tératome. Pour cela, parallèlement à l'optimisation des protocoles, des stratégies fondées sur l'utilisation de gènes suicides (Hara A et al., 2008) ou de tri cellulaire sont étudiées (Fukuda H et al 2006).

2. Les cellules souches pluripotentes induites (iPS)

2.1 Mécanismes de reprogrammation des cellules iPS

Jusqu'en 2006 et la découverte faite par Shinya Yamanaka sur la reprogrammation de cellules somatiques en cellules pluripotentes, les cellules hES représentaient la seule source de cellules souches pluripotentes. Bien que beaucoup de points restent à vérifier, les cellules souches induites à la pluripotence (iPS pour induced pluripotent stem cells) représentent potentiellement une source cellulaire inépuisable présentant les mêmes capacités de différentiation que les cellules hES mais ne nécessitant pas la destruction d'un embryon. Cette découverte ouvre ainsi les portes de la médecine régénérative de demain avec la possibilité de réaliser des iPS spécifiques d'un patient, de les différencier dans le type cellulaire défaillant et ainsi de greffer ces cellules en limitant les risques de rejet. Les premières expériences de Yamanaka ont consisté à cribler de 24 facteurs de transcription préalablement sélectionnés pour leur rôle dans le maintien de la pluripotence ou dans la prolifération cellulaire. Ainsi la combinaison de 4 facteurs OCT4 (ou POU5F1, de la famille des facteurs de transcription POU), SOX2, KLF4 (Krueppel-like factor 4) et c-Myc – a été identifiée comme optimale pour transformer des fibroblastes en une population cellulaire présentant les mêmes caractéristiques que de cellules ES (Takahashi K et al., 2006) (Figure 34).

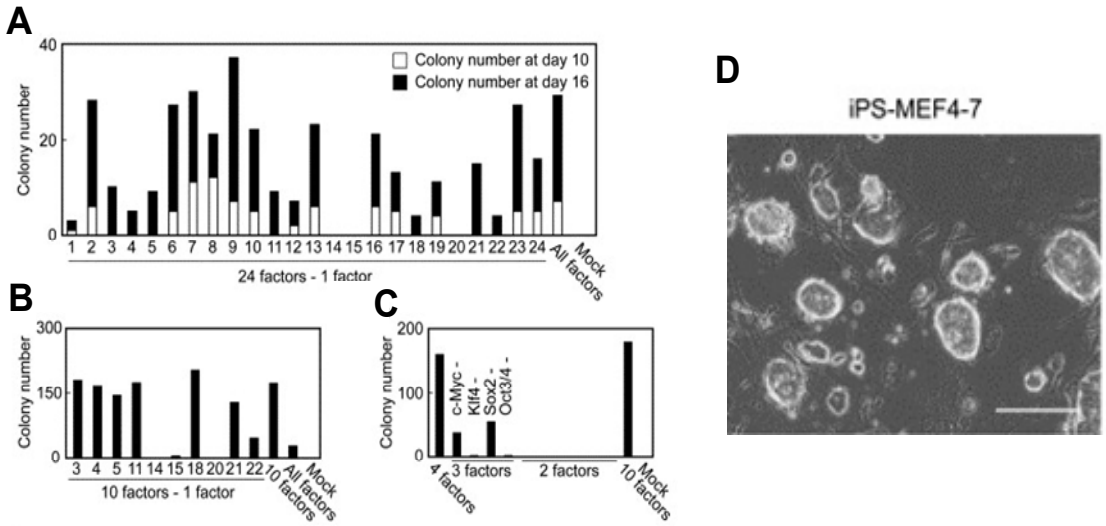


Figure 34:Expérience de Yamanaka- Découverte des cellules souches induites à la pluripotence.
(A) Des fibroblastes de souris Fbx15βgeo/βgeo ont été transduites avec un pool de 24 facteurs. Le graphique représente le nombre de colonies reprogrammées (résistantes au G418) à 10 jours et à 16 jours en présence de tous les facteurs ou avec le retrait de l'un d'entres eux.
(B) La liste a été restreinte à 10 facteurs puis 4 facteurs (C).
(D) Morphologie d'une colonie de cellules iPS générée après la surexpression de OCT4, KLF4, SOX2, and c-Myc.
Source: Takahashi K, Yamanaka S et al., 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.

Simultanément aux Etats-Unis, le groupe de Thomson à fait une découverte similaire en utilisant une autre combinaison de facteur- OCT4, SOX2, NANOG and LIN28- ayant pour avantage majeur d'éviter la surexpression de l'oncogène c-Myc (Nakagawa M et al., 2008). Par la suite les travaux menés par les groupes de Yamanaka, Jaenisch, Hochedlinger, Thomson, et Daley, ont caractérisé les mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus de reprogrammation ce qui a permis de l'optimiser (Figure 35).

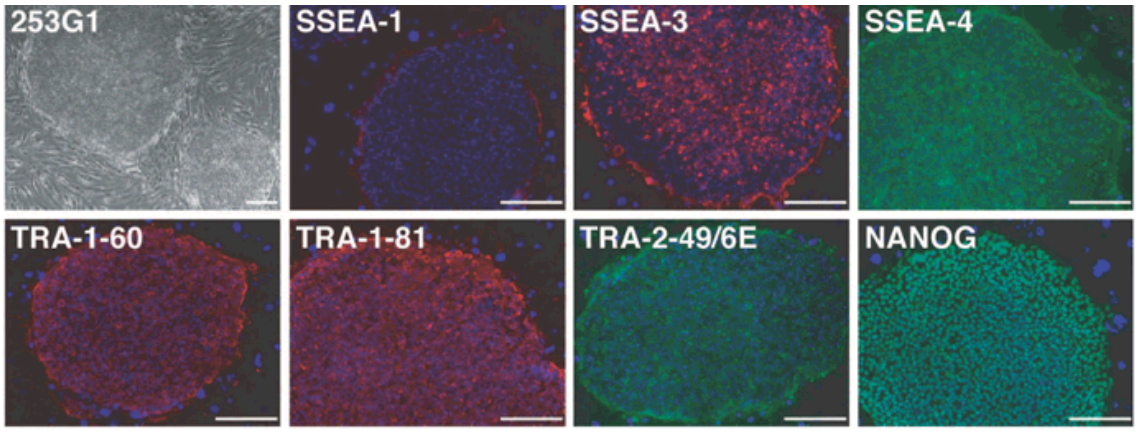


Figure 35: Caractérisation moléculaire de cellules iPS générées selon la méthode de Yamanaka.
Caractérisation morphologique (A) et immunocytochimique (B) des cellules iPS pour les marqueurs SSEA1, SSEA3, SSEA4, TRA 1-60, TRA 1-81, TRA 2-49 et NANOG.
Source : Nakagawa M et al 2008. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts.

Ils ont ainsi rapidement été en mesure de transposer ce modèle à l'homme (Takahashi K et al 2007 ; Lowry WE et al 2008) en utilisant les mêmes combinaisons de facteurs utilisés chez la souris (OCT4, SOX2, KLF4, et c-Myc ou OCT4, SOX2, NANOG, et LIN28). Les auteurs de ces études ont démontré que la reprogrammation de fibroblastes humains en cellules iPS se produisait progressivement dans les 10 premiers jours de la reprogrammation (Figure 36).

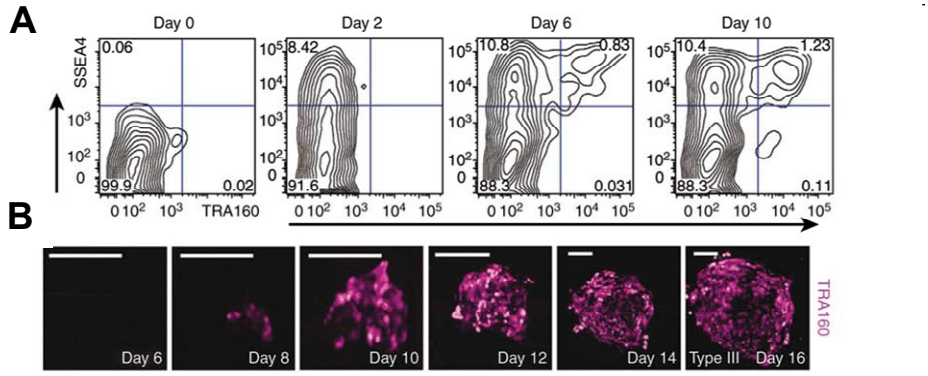


Figure 36 : Acquisition du caractère pluripotent au fur et à mesure de la reprogrammation.
(A) Analyse de l'expression de SSEA4 et TRA 1-60 dans des fibroblastes humains après 2, 4, 6 et 10 jours de reprogrammation.
(B) Analyse Immunocytochimique du marqueur TRA 1-60 dans des fibroblastes à 6, 8, 10, 12, 14 et 16 jours après reprogrammation.
Source: Chan EM et al., 2009. Live cell imaging distinguishes bona fide human iPS cells from partially reprogrammed cells.

Plus récemment Yamanaka et Jaenisch ont démontré la possibilité de générer des lignées d'iPS à partir de fibroblastes en surexprimant seulement 3 des 4 facteurs de Yamanaka en excluant c-Myc (Nakagawa M et al., 2008, Wernig M et al., 2008). Bien que la reprogrammation réalisée sans c-Myc présente une efficacité plus faible (diminuer de l'ordre de 40%), cette dernière apporte la possibilité d'éviter la surexpression de ce fort oncogène dans les cellules. Par la suite d'autres études ont démontré la possibilité de générer des lignée d'iPS à partir d'autres types cellulaires que des fibroblastes tels que des hépatocytes (Aoi T et al., 2008), des kératinocytes (Aasen T et al 2008) ou plus récemment des cellules souches neurales (Silva J et al., 2008 ; Kim JB et al., 2009), des cellules sanguines humaines CD34+ (Loh YH et al., 2009) ou encore des mélanocytes (Utikal J et al., 2009). Les vecteurs utilisés pour introduire les facteurs de reprogrammation dans les cellules adultes ont été initialement des vecteurs intégratifs rétrovirus (Yamanaka) et lentivirus (Thomson). Alors que les rétrovirus peuvent s'insérer dans les cellules en division, les lentivirus ont la capacité de pouvoir pénétrer dans un noyau en interphase. Différentes études ont par la suite tenté de générer des lignées d'iPS plus « sures » soit en utilisant des vecteurs lentiviraux polycistroniques permettant l'expression des 4 facteurs de reprogrammation (Sommer CA et al., 2009), soit en utilisant des méthodes innovantes permettant l'élimination des transgènes insérés dans le génome après la reprogrammation à l'aide de constructions de type piggyBac (Woltjen K et al., 2009) ou des systèmes de recombinaison homologue fondés sur le système Cre-LoxP (Kaji K et al., 2009). Très récemment des iPS ont été générées en utilisant des protéines recombinantes (Zhou H et al., 2009) ou encore en surexprimant certains types de microARNs (Judson RL et al., 2009).

2.2 Intérêt des cellules iPS en thérapie cellulaire

Les cellules iPS représentent donc un intérêt majeure, à la fois dans la mise en place de protocole de thérapie cellulaire innovantes mais également dans le cadre de recherches pharmacologiques *in vitro*. Ainsi la première preuve de principe de la possibilité de générer des iPS patient –spécifique (Figure 37) a été rapportée en 2008, par la génération d'iPS à partir de fibroblastes cutanés chez deux sœurs âgées de 82 et 89 ans, atteintes de sclérose latérale amyotrophique familiale. Dans cette étude les auteurs ont démontré que ces cellules pouvaient servir de modèle pathologique *in vitro* en démontrant leur capacité à se différencier en neurones porteurs de la mutation du gène de la superoxyde dismutase (Dimos JT et al., 2008). Plus récemment des cellules iPS humaines ont été générées à partir de fibroblastes prélevés sur cinq patients atteints de la maladie de parkinson et ont ensuite été différenciées en neurones dopaminergiques (Soldner et al., 2009). Ces deux dernières années diverses études ont ainsi démontré la capacité de cellules iPS à se différencier en cardiomyocytes

(Germanguz I et al., 2009), cellules épithéliales pigmentaires (ou RPE pour Retinal Pigmentary Epithelium) (Buchholz DE et al., 2009), cellules souches neurales (Chambers S et al., 2009), mesenchymal stem cells (Liu T et al., 2010) et hépatocytes (Gai H et al., 2010).

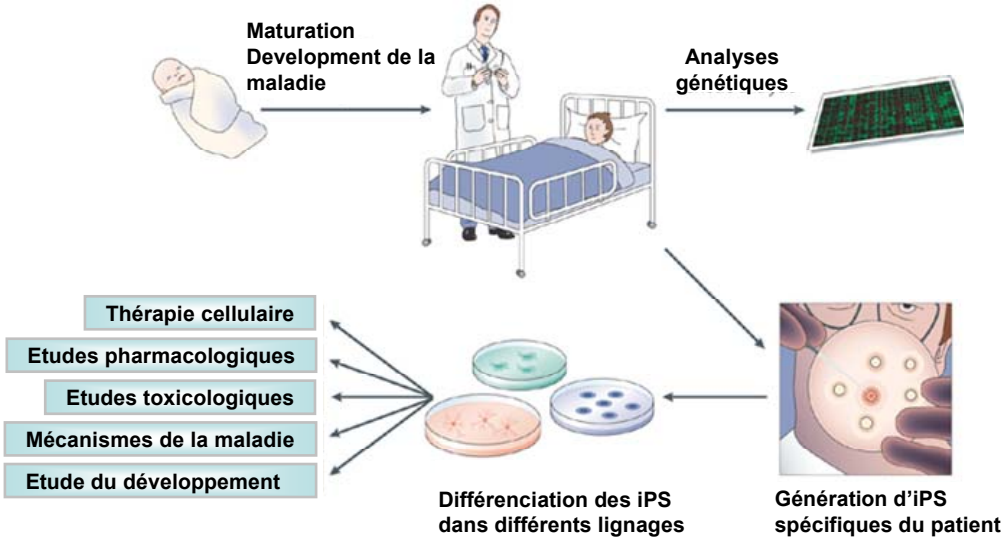


Figure 37:Génération de cellules souches induites à la pluripotence (iPS) spécifiques du patient.
Adapté de: Nishikawa S et al., 2008. The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy.

3. Caractéristiques des cellules souches pluripotentes

Les cellules souches pluripotentes présentent certaines caractéristiques particulières, tant au niveau morphologique que phénotypiques. Tout d'abord, au niveau morphologique, elles sont reconnaissables par leur petite taille (2-3µm), par leur rapport nucléo-cytoplasmique élevé et par leur organisation en colonies compactes et plates, lorsqu'elles sont cultivées sur cellules nourricières. D'un point de vue phénotypique, ces cellules présentent une expression importante de la transcriptase inverse TERT (télomerase reverse transcriptase) associée à une forte activité télomérasique assurant ainsi le maintien de la stabilité et de l'intégrité chromosomique au fur et à mesure des divisions et empêchant la sénescence des cellules. Les cellules souches pluripotentes sont également définies par leur niveau d'expression de nombreux marqueurs de surface et facteurs de transcription, permettant leur identification en culture. Parmi les nombreux marqueurs de surface, SSEA-4 (Stage Specific Embryonic Antigen), SSEA-3, TRA-1-60 (Tumour Rejection Antigen), TRA-1-81, CD9, AC133, flt3 (CD135), c-Kit (CD117), des facteurs de transcription tels que Oct4, Nanog, Sox2, Foxd3, ou encore Fgf4.

Le caractère pluripotent des cellules souches peut être démontré de deux manières : *In vitro*, par la réalisation de corps embryoides (ou EBs pour Embryoid bodies), agrégats cellulaires en 3 dimensions comportant les dérivés cellulaires des trois feuillets embryonnaires (endoderme, mésoderme et ectoderme). *In vivo*, par la formation de tératomes composés de types

cellulaires issus de plus d'un feuillet embryonnaire après la greffe de cellules indifférenciées sur des rongeurs immunodéprimés (Heins N et al., 2004).

L'étude des mécanismes impliqués dans le maintien des propriétés de pluripotence et d'autorenouvellement des cellules hES et iPS font actuellement l'objet d'une recherche intense. Ces dernieres années de nombreux facteurs de transcription et voies de signalisation ont ainsi été mis en évidence.

3.1. Les facteurs clés de la pluripotence et de l'autorenouvellement

Les facteurs de transcription clés régulant les capacités pluripotentes des cellules hES et iPS, tant chez la souris que chez l'homme, forment le « réseau de régulation transcriptionnels de la pluripotence » (core transcriptional regulatory circuitry). Ce complexe est composé de OCT4, NANOG et SOX2 (Boyer LA et al., 2005). Ces trois gènes régulent de manière directe la transcription de nombreux autres gènes importants dans la physiologie des cellules hES mais également de manière indirecte via leur association à des protéines des groupes polycomb (PcG pour Polycomb group) et trithorax (TrxG pour trithorax group) qui modifient l'état de la chromatine par méthylation des histones (Lee TI et al., 2006). Ces modifications de la chromatine se traduisent globalement par une transcription activée dans les cellules hES et sont régulées au cours de la différenciation.

3.2. Les voies de signalisation

Si de nombreuses questions restent en suspens, certaines voies de signalisation ont déjà pu être identifiées (pour revue : Stewart R et al., 2006), c'est le cas des voies du FGF, Wnt/β-caténine, et Activin/nodal (Figure 38).

- La voie des FGFs

-Le bFGF est indispensable au maintien de l'état indifférencié des cellules hES, il a ainsi été démontré que ce dernier pouvait agir sur la synthèse de composés de la matrice extracellulaire (Xu C et al., 2005), ou en inhibant la voie BMP (Aubin et al., 2004). L'inhibition de la voie des BMPs empêche la phosphorylation de Smad1/5/8 en favorisant celle des Smads2/3, rendant ainsi disponible la formation d'un complexe avec Ssmad4. Une fois formé ce complexe est transloqué dans le noyau où il joue un rôle important dans la régulation transrationnelle de gènes impliqués dans le maintien de l'état indifférencié (James D et al., 2005 ; Vallier L et al., 2009).

- La voie Activin/Nodal

L'Activine A et Nodal, membre de la famille du TGFβ, participe également à stimulation de la phosphorylation des Smads 2/3 autorisant ainsi son interaction avec Smad4 (James D et al., 2005 ;Vallier L et al., 2005). Il a ainsi été montré qu'un inhibiteur de la voie Activin/nodal, le

SB431542, pouvait induire la différenciation des cellules hES alors qu'au contraire l'ajout d'Activin et de Nodal en combinaison avec du bFGF pouvait en prévenir la différenciation démontrant ainsi l'importance de cette voie (Vallier L et al., 2005). D'autre part une étude récente a démontré la relation direct entre la voie Activin/Nodal et la régulation transcriptionelle de Nanog soulignant ainsi son rôle du maintien du caractère pluripotent des cellules hES et iPS (Xu RH et ., 2008)

- La voie Wnt/β-caténine

Une autre voie de signalisation impliquée dans le maintien du caractère pluripotent des cellules hES est la voie Wnt/β-caténine. Il a ainsi été démontré que la liaison de Wnt à son récepteur, Frizzled, inhibe la dégradation intracellulaire de la β-caténine (Stewart R et al., 2006), cette dernière agissant comme coactivateur de la transcription des gènes *Oct4* et *Nanog* (Stewart E et al., 2006). Néanmoins, il semblerait que la voie Wnt/β-caténine interviendrait plutôt dans la prolifération que dans le maintien de l'état indifférencié (Stewart et al., 2006).

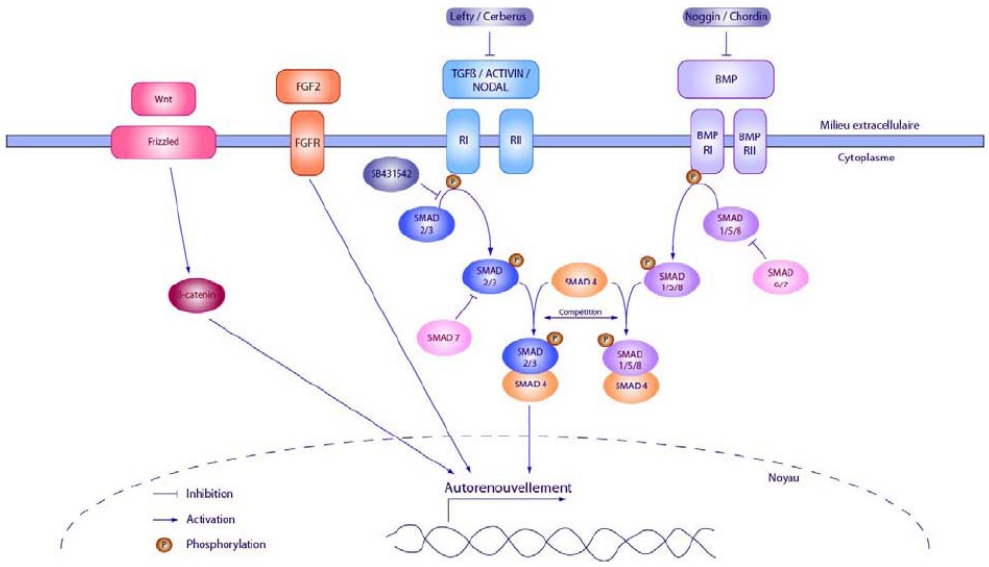


Figure 38: Schéma illustrant les principales voies de signalisation intervenant dans l'autorenouvellement des cellules pluripotentes.
Adapté de :Stewart R et al 2006. Mechanisms of self-renewal in human embryonic stem cells.

4. Culture des cellules souches pluripotentes

Les cellules hES et iPS sont classiquement cultivées sur une monocouche de fibroblastes embryonnaires murins (MEF) préalablement traitées à la mitomycine C ou par irradiation pour en bloquer la prolifération. D'autres cellules nourricières peuvent être utilisées, telles que des lignées de cellules murines (STO) ou encore des fibroblastes humains provenant par exemple de prépuce. Le rôle exact de ces cellules n'est pas encore complètement déterminé, mais il semble qu'elles jouent un rôle important dans le maintien de l'état indifférencié et la croissance des cellules hES en fournissant certains facteurs solubles. Les cellules nourricières

d'origine animale peuvent ainsi être remplacées par des fibroblastes dérivées de cellules hES (Stojkovic P et al., 2005) ou remplacées par des matrices tels que la fibronectine (Amit M et al., 2004), la laminine (Xu C et al., 2001) ou le matrigel (Braam SR et al., 2008). Le milieu de culture est généralement supplémenté avec 20% de KSR (Knock-out Serum Replacement) en remplacement du SVF (Sérum de veau foetal) et en présence de bFGF. Les méthodes de passages des cellules sont variables, il est possible d'utiliser des méthodes mécaniques ou enzymatiques bien que ces dernières ont démontré un risque d'anomalies chromosomiques telles que des trisomies 12 ou 17 (Hoffman LM, Carpenter MK, 2005)

4. Loi de bioéthique et recherche sur les cellules hES en France

En 1994, la loi de Bioéthique avait statué et interdit la recherche sur l'embryon humain en France. Il faudra attendre la révision de la loi de Bioéthique de 2004 pour que la législation encadrant cette recherche évolue. Ainsi le 6 août 2004 la loi maintient l'interdiction de recherche sur l'embryon mais en entrouvre la possibilité pour certains laboratoires bénéficiant d'une dérogation attribuée et encadrée par l'Agence de la biomédecine : « La recherche sur l'embryon humain est interdite (...). Par dérogation au premier alinéa, et pour une période limitée à cinq ans à compter de la publication du décret (...), les recherches peuvent être autorisées sur l'embryon et les cellules embryonnaires lorsqu'elles sont susceptibles de permettre des progrès thérapeutiques majeurs et à la condition de ne pouvoir être poursuivies par une méthode alternative d'efficacité comparable, en l'état des connaissances scientifiques ». Cette recherche ne peut être effectuée que sur des embryons « conçus in vitro dans le cadre d'une AMP qui ne font plus l'objet d'un projet parental. Elle ne peut être effectuée qu'avec le consentement écrit préalable du couple dont ils sont issus, ou du membre survivant de ce couple, par ailleurs dûment informés des possibilités d'accueil des embryons par un autre couple ou d'arrêt de leur conservation ». Selon la loi ces recherches autorisées doivent :

- Etre susceptibles de permettre des progrès thérapeutiques majeurs
- Ne pas pouvoir être poursuivies par une méthode alternative d'efficacité comparable en l'état des connaissances scientifiques
- Etre effectuées uniquement sur des embryons orphelins, conçus in vitro dans le cadre d'une AMP et sans projet parental.
- Etre soumises au consentement du couple formulé par écrit, qui doit être confirmé à l'issue d'un délai de réflexion de trois mois et qui est révocable à tout moment, sans motif
- Etre autorisées par l'Agence de la biomédecine après avis en Conseil d'orientation. La décision d'autorisation est prise en fonction de la pertinence scientifique du projet de

recherche, de ses conditions de mise en œuvre au regard des principes éthiques et de son intérêt pour la santé publique.

C. Différenciation des cellules souches pluripotentes dans le lignage ectodermique

Depuis une décennie, les cellules hES font l'objet de recherches intenses. L'un des défis majeurs est de définir des protocoles spécifiques de différenciation guidés vers des types cellulaires d'intérêt. En s'appuyant essentiellement sur les informations émanant des études développementales, différents protocoles d'induction, de spécification et de différenciation des cellules ES dans le lignage ectodermique ont été élaborés.

1. Différenciation des cellules souches pluripotentes en kératinocytes

1.1. Induction ectodermique des cellules ES par la BMP4 et son inhibiteur Noggin

Les études réalisées in vivo à la fois chez le Xenope, le poisson zèbre et la souris ont démontré que, la BMP4 participait à la mise en place des dérivés du neuroectoderme en stimulant la formation de l'épiblaste (Voir chapitre II.A). La BMP4 définit ainsi le devenir des territoires du neuroectoderme en formant un gradient de concentration. Ainsi au cours du développement embryonnaire, les cellules du neuroectoderme recevant un fort taux de BMP4 deviendront l'épiblaste, les cellules stimulées avec une concentration intermédiaire, la crête neurale et les cellules déplétées en BMP4, le tube neural. A l'inverse, ses antagonistes (Noggin, Chordine et Follistatine) ayant pour fonction de stimuler la formation du tube neural en inhibant l'induction épidermique (Sassai Y et al., 2001).

In vitro, le modèle de différenciation neural par défaut s'applique également. Il a ainsi été démontré que les cellules ES différenciées spontanément en absence de BMP4 étaient par défaut engagées dans le lignage neural (Tropepe V et al., 2001). De même, l'ajout de Noggin ou de Chordine dans le milieu de culture ainsi que leur surexpression constitutive dans les cellules ES de souris provoque une augmentation de la différenciation neurale (Gratsch TE, O'Shea KS,, 2002). Plusieurs études ont ainsi démontré le rôle inhibiteur de la BMP4 sur la formation ou la survie de précurseurs neuronaux à la fois *in vitro* et *in vivo* (Furuta Y et al., 1997) (Mabie PC et al., 1999). En 2000, les premiers travaux démontrant le rôle de la BMP4 sur l'engagement épithélial des cellules ES ont été publiés par l'équipe de Sassai. Dans cette étude, les auteurs ont démontré que l'ajout de BMP4 sur des cellules ES de souris engagées dans le lignage neurectodermique, entrainait une diminution du nombre des cellules exprimant la Nestine (marqueurs des progéniteurs neuraux) et une augmentation des cellules

exprimant la kératine K14 (cellules épidermiques) (Kawasaki H et al., 2000). En 2006, l'équipe de Daniel Aberdam a démontré in vitro que le traitement à la BMP4 de cellules ES de souris entrainait une apoptose importante des progéniteurs neuraux exprimant le marqueur Sox1 favorisant ainsi leur engagement dans le lignage épithéliale (Gambaro K et al., 2006) (Figure 39A, B et C). Dans la même étude, ces chercheurs ont associé cet effet proapoptique de la BMP4 à l'inhibition de Smad6 et le clivage de la caspase 3 (Figure 39D).

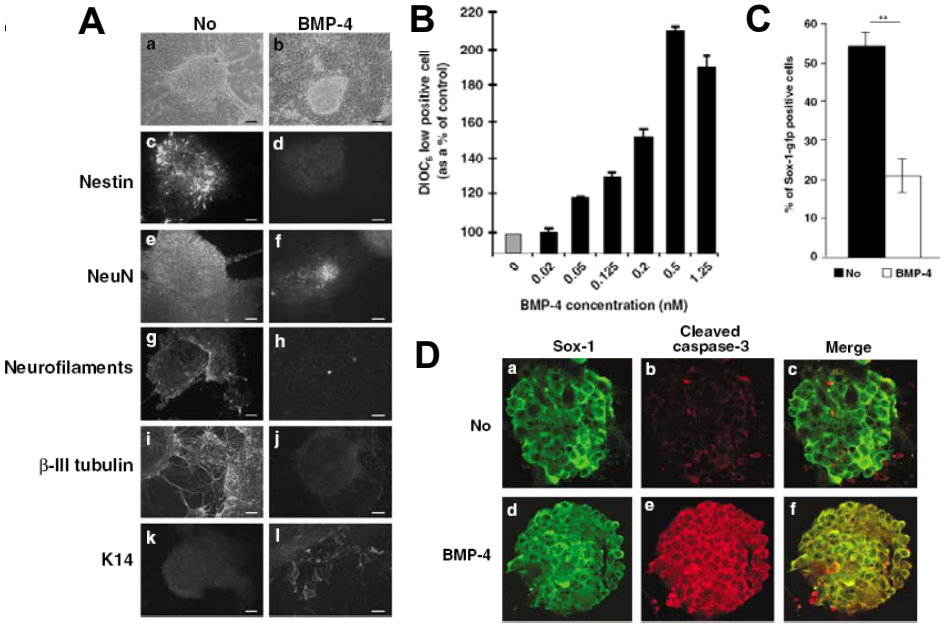


Figure 39: Rôle de la BMP4 dans l'apoptose des progéniteurs neuraux.
(A) Effet de la BMP4 sur la différenciation des cellules souches embryonnaires de souris (cellules mES) dans le lignage neural (Nestin, NeuN, Neurofilaments, bIII tubulin) et kératinocytaire (K14).
(B) Effet dose dépendante de la BMP4 sur l'apoptose des cellules neurales dérivées de cellules mES.
(C) Effet inhibiteur de la BMP4 sur la différenciation neurale de cellules mES exprimant la GFP sous le controle du promoteur SOX1.
(D) Analyse immunocytochimique de SOX1 et de la caspase 3 clivée sur des cellules mES traitées ou non à la BMP.
Source :Gambaro K et al., 2006. BMP4 induces a Smad-dependent apoptotic cell death of mouse embryonic stem cell-derived neural precursors.

La même équipe a par la suite transposé ces travaux sur des cellules ES en démontrant la possibilité d'isoler une population pure à 95% de cellules exprimant les kératines K8 et K18 après un traitement de 4 jours à la BMP4 (Aberdam E et al., 2008) (Figure 40). Ces premières études réalisées sur des cellules ES de souris ont démontré que l'ensemble des données obtenues in vivo pouvaient être transposé sur ce modèle in vitro. Il a ainsi été démontré que la différenciation des cellules ES suivait le même programme génétique qu'au cours de l'embryogénèse tant sur l'expression des marqueurs que sur leur sensibilité aux différentes concentrations de morphogènes et signaux extracellulaires.

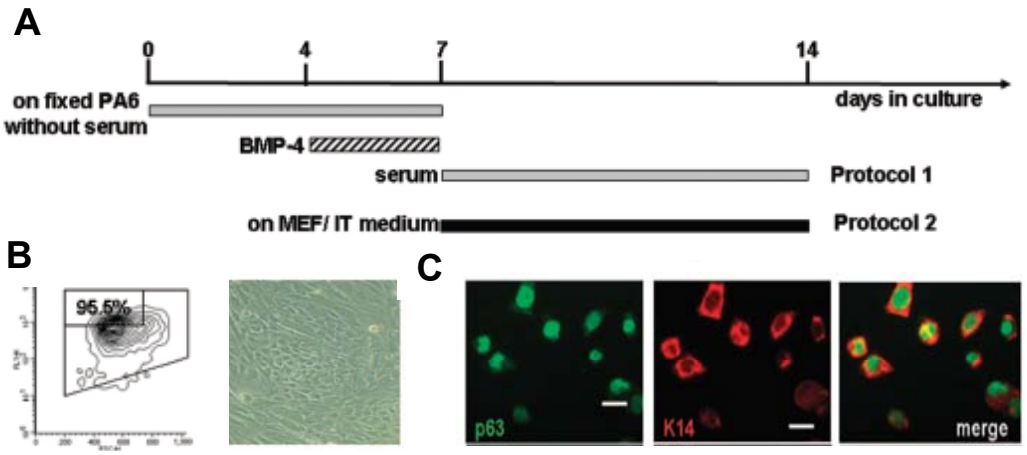


Figure 40: Différenciation de cellules hES dans le lignage épithélial : Rôle de la BMP4 et de p63.
(A) Protocole de différenciation de cellules hES dans le lignage épithélial sur cellules stromales PA6 avec un traitement de 4 jours à la BMP4.
(B) Obtention d'une population pure à 95,5% de cellules exprimant la kératine K18.
(C) L'expression forcée de p63 entraine la différenciation des cellules exprimant la K18 en cellules exprimant la kératine K14.
Source: Aberdam E et al., 2008 A Pure Population of Ectodermal Cells Derived from Human Embryonic Stem Cells.

1.2. ΔNp63 et différentiation kératinocytaire des cellules ES

Les premières expériences réalisées *in vitro* sur l'engagement des cellules hES dans le lignage épithélial ont mis en évidence que le premier marqueur épidermique exprimé par des cellules hES était comme chez la souris, p63 (Green H et al., 2003). Dans cette étude, Howard Green et ses collaborateurs, pionniers dans la recherche dermatologique, ont injecté des cellules hES à une souris SCID (severe combined immune deficient). Par défaut les cellules ainsi injectées ont formé des nodules contenant des cellules différenciées dans plusieurs types cellulaires dérivés des 3 feuillets embryonnaires, incluant des kératinocytes. C'est ainsi que les auteurs ont suivi la chronologie de marqueurs exprimés par ces cellules avant de se différencier en kératinocytes et ont déterminé p63 comme étant (avec la basonucleine) le marqueur le plus précocement exprimé (Figure 41). Ces données acquises *in vitro*, ont suggéré pour la première fois, dans un modèle humain, que p63 jouait un rôle important de régulateur dans l'engagement épithélial.

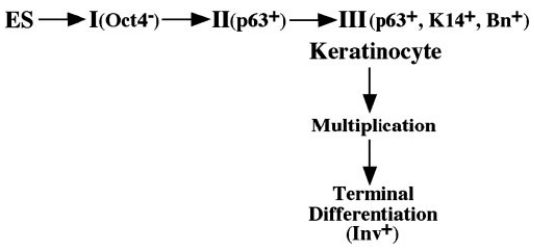


Figure 41: Marqueurs successivement exprimés au cours de la différenciation de cellules souches embryonnaires humaines en kératinocytes.
Source: Green H et al.,2003. Marker succession during the development of keratinocytes from cultured human embryonic stem cells.

Les travaux réalisés par l'équipe de Daniel Aberdam ont clairement démontré que l'isoforme ΔNp63 était directement régulé par la BMP4 durant le processus de différenciation (Aberdam D et al., 2007; Aberdam E et al., 2008). Ils ont ainsi montré que cet isoforme de p63 était spécifiquement augmenté dans les toutes premières heures de la différenciation des cellules ES et que sa surexpression (à l'aide d'un lentivirus) entrainait une différenciation partielle des cellules épithéliales (exprimant les kératines K8 et K18) en kératinocytes (exprimant les kératines K5 et K14 (environ 6% des cellules) (Figure 40). Cette expérience a confirmé les hypothèses émises à la suite des travaux du groupe de Howard Green et révèlent p63 comme un régulateur majeur de la différenciation épidermique des cellules hES.

1.3. Différenciation des cellules souches embryonnaires de souris (cellules mES) en kératinocytes

La recherche sur l'étude du potentiel de différenciation des cellules mES en kératinocytes a commencé en 1996 avec la publication des travaux réalisés par le groupe de Fiona Watt à Londres (Bagutti C et al., 1996). Dans cette étude, des cellules mES ont été cultivées sous forme de corps embryoides dans un milieu permettant la formation des 3 feuillets embryonnaires. Après 15 jours en suspension et une culture en phase adhérente des corps embryoides, les auteurs de cette étude ont démontré qu'une partie des cellules mES s'était engagée dans le lignage kératinocytaire caractérisé par leur expression de la kératine K14. Par ailleurs, cette étude a également démontré pour la première fois la notion de chronobiologie du processus de différenciation. En effet, ainsi différenciées, ces cellules ont été caractérisées par leur expression des les premiers jours d'induction, les kératines K8 et K18 (marqueur du lignage épithélial) avant d'exprimer la kératine K14 (marqueur du lignage épidermique) puis la kératine K10 (marqueur de différenciation terminale).

En 2000, les travaux de l'équipe de Sassai (Kawasaki H et al., 2000) ont permis de mettre en évidence le rôle de la BMP4 dans la différenciation épidermique (voir chapitre précédent).C'est sur la base de ces travaux que l'équipe de Daniel Aberdam a mis en place un protocole permettant de différencier des cellules mES en kératinocytes en évitant la formation de corps embryoides mais en utilisant une différenciation directe induite par la BMP4 (Coraux C et al., 2003). Ainsi dans cette étude, les cellules mES ont été ensemencées sur un support préalablement recouvert de protéines de la matrice extracellulaire sécrétées par les cellules mésenchymateuses et les fibroblastes du derme. Sur cette matrice les auteurs ont démontré une accélération de la différenciation épidermique en mesurant une augmentation d'expression de la kératine 14 dès 8 jours de différenciation alors que dans les conditions nécessitant la formation corps embryoides celle-ci n'augmentait pas avant 20 jours. Ainsi

différenciées les cellules obtenues ont été caractérisées à la fois d'un point de vue phénotypique par la mesure de leur niveau d'expression de la kératine K14 mais également d'un point de vue fonctionnel en démontrant leur capacité à générer un épiderme pluristratifié (Figure 42). De manière surprenante les auteurs de cette étude ont rapporté que ces cellules avaient non seulement été capables de former un épiderme comportant l'ensemble des couches de l'épiderme mais également un derme sous jacent sans apporter de réelles explications à ce phénomène.

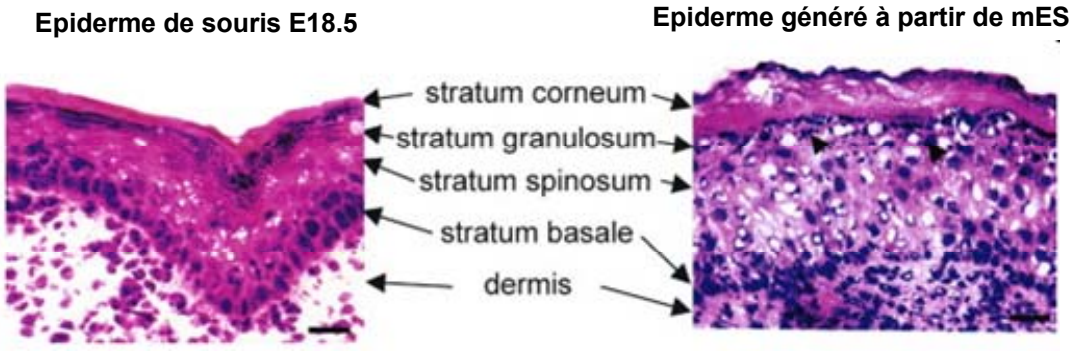


Figure 42 : Première reconstruction d'épiderme à partir de cellules souches embryonnaires de souris : Rôle central de la BMP4 dans l'induction épithéliale.
Coloration à l'Eosine Hématoxyline d'un épiderme de souris au stade E18.5 du développement et d'un épiderme généré à partir de cellules mES.
Source : Coraux C et al., 2003. Reconstituted skin from murine embryonic stem cells.

En 2005, parallèlement aux travaux de l'équipe d'Aberdam, une équipe canadienne a également démontré la possibilité de générer des keratinocytes à partir de cellules mES via la formation de corps embryoides et leur culture sur des matrices artificielles (collagène I ou matrigel). Ce protocole a permis de dériver des cellules K8/K18 capable de différencier en cellules K5/K14 et enfin après quelques jours de subconfluence en cellules terminalement différenciées exprimant les marqueurs K1, K10, involucrine, filaggrine et la loricrine (Troy TC, Turksen K, 2005)

1.4. Différenciation des cellules souches embryonnaires humaines (cellules hES) en kératinocytes

Ces dernieres années, deux groupes leaders ont tenté de transposer les protocoles mis au point sur les cellules mES aux cellules hES, les groupes de Howard Green et de Sean Palecek. Ainsi le premier groupe à avoir réaliser cette performance est le groupe de Howard Green en Fevrier 2006. Ce résultat a été obtenu en injectant les cellules hES à des souris SCID selon la technique décrite en 2003 (Iuchi S et al., 2006) (Figure 43A). Apres isolement des nodules formés, les cellules ont été remises en culture dans des conditions favorisant la prolifération et la survie des kératinocytes. Les premières cellules isolées par cette technique présentaient

effectivement un phénotype épithélial avec une expression à la fois des marqueurs p63, K5 et K14 mais ne présentaient qu'une très faible capacité de proliferation. Pour corriger cela, Green et coll ont immortalisé ces keratinocytes dérivés de hES en surexprimant le gène E6/E7 provenant du virus 16 du papillome humain et ont évalué le potentiel prolifératif de ces cellules à 60 doublements cellulaires. Par ailleurs les auteurs ont démontré que ces cellules arrivées à subconfluence pouvaient exprimer comme les kératinocytes humains en culture, la transglutaminase 1, la kératine K10 et l'involucrine. Bien que cette réussite technologique soit une avancée scientifique réelle, l'obtention de ces cellules nécessitant la surexpression d'un gène capable de contrôler l'expression de deux puissants oncogènes telles que p53 ou TERT rend impossible leur potentielle utilisation clinique. Dans la même année le groupe de Sean Palecek a publié une autre méthode permettant de dériver des kératinocytes à partir de cellules hES en utilisant un protocole issu des travaux réalisés par Fiona Watt en 1996. C'est ainsi que les auteurs de cet article ont montré possible la différenciation spontanée de cellules hES en kératinocytes, caractérisés par leur expression de la kératine K14, en utilisant la formation de corps embryoides sans toutefois être en mesure de démontrer la fonctionnalité des cellules ainsi dérivées (Ji L et al., 2006) (Figure 43B).

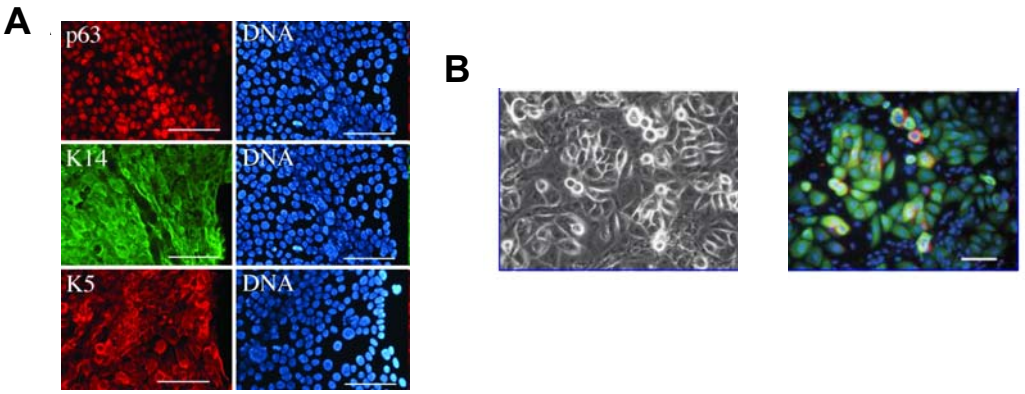


Figure 43: Génération de lignées kératinocytaires immortalisées dérivées de cellules souches embryonnaires humaines.
(A) Analyse Immunocytochimique de l'expression des marqueurs p63, K14 et K5 sur des kératinocytes dérivés de cellules hES obtenus selon la méthode de Green après formation de Nodule sur souris SCID
Source: Iuchi S et al., 2006. Immortalized keratinocyte lines derived from human embryonic stem cells.
(B) Analyse Immunocytochimique de l'expression des marqueurs K14 (vert) et involucrine (rouge) sur des kératinocytes dérivés de cellules hES obtenus selon la méthode de Palecek après formation de corps embryoides.
Source: Ji L et al., 2006. Generation and differentiation of human embryonic stem cell-derived keratinocyte precursors.

C'est en 2008 que la même équipe publie une adaptation de ce protocole en combinant cette fois la formation de corps embryoides à un traitement à la BMP4 et à l'acide rétinoïque (Metallo CM et al., 2008). Les cellules ainsi différenciées sont homogènes à plus de 95% pour l'expression de la kératine K14 et présentent toutes les propriétés phénotypiques des kératinocytes à l'exception notable de leur capacité à générer un épiderme pluristratifié et de

pouvoir se différencier terminalement (Figure 44). Dans cette étude les auteurs ont démontré que le traitement à l'acide rétinoïque agissait en synergie avec la BMP4 pour potentialiser l'engagement dans le lignage épithélial caractérisé par une augmentation d'expression de ΔNp63 et de K14 et associé à une diminution d'expression des marqueurs de différenciation neurale Sox1 et Pax6.

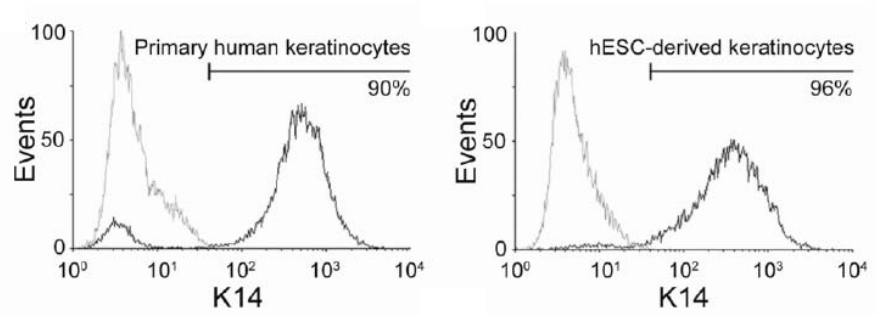


Figure 44 : Première dérivation d'une population pure et homogène de cellules exprimant la kératine K14 à partir de cellules hES.
Analyse par FACS de l'expression de la kératine K14 dans les kératinocytes adultes et les kératinocytes dérivés de cellules hES.
Source : Metallo CM et al., 2008. Retinoic acid and Bone morphogenetic protein signalling synergize to efficiently direct epithelial differentiation of human embryonic stem cells.

En 2009 la même équipe publie la caractérisation complète, autant au niveau transcriptomique que fonctionnel des cellules produites selon le même protocole de différenciation (Metallo CM et al., 2010). Ainsi, Sean Palecek et ses collaborateurs ont démontré possible la génération de kératinocytes fonctionnels capables de répondre à une stimulation au calcium en surexprimant l'involucrine et de générer un épithélium pluristratifié exprimant la kératine K10 et l'involucrine dans les couches suprabasales (Figure 45). Bien que les cellules dérivées par le groupe de Palecek ressemblent en tout point à des kératinocytes humains, leur caractérisation transcriptomique a cependant montré quelques différences notamment au niveau de l'expression d'une kératine, la kératine K19 ainsi qu'au niveau de la surexpression de l'IGF2 (Insulin-like growth factor 2), de l'IGFBP3 (insulin-like growth factor binding protein 3), du bFGF, des gènes relatifs à la voie des Wnt (WNT5A, SFRP2 (Secreted Frizzled Related Protein 2)), ainsi que des gènes codant pour des protéines de la matrice extracellulaires telles que la laminine 5 et la fibronectine. Bien que répondant à tous les critères morphologiques, phénotypiques et fonctionnels des kératinocytes, l'obtention de kératinocytes dérivés selon la méthode de Palecek nécessite tout de même la formation de corps embryoides sans prévenir la formation de dérivés d'autres feuillets pouvant rendre incompatibles toute application de thérapie cellulaire. A ce jour aucune méthode de différenciation dirigée en 2D n'a permis de dériver des cellules hES en une population pure et homogène des kératinocytes fonctionnels.

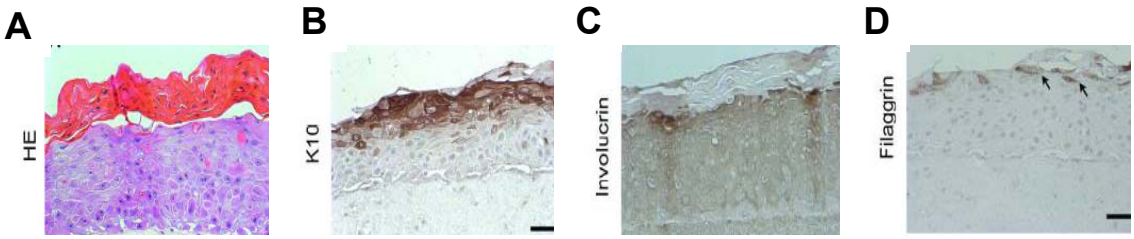


Figure 45: Reconstruction d'un épithélium pluristratifié à partir de keratinocytes dérivés de cellules souches embryonnaires humaines.
(A) Coloration Eosine Hématoxyline d'un épiderme généré à partir de cellules hES selon la méthode de Metallo.
(B-D) Analyse immunocytochimique de la Kératine K10 (B) , de l'involucrine (C) et de la filaggrine.(D) sur des épidermes générés à partir de cellules hES.
Source: Metallo CM et al., 2009. Human embryonic stem cell-derived keratinocytes exhibit an epidermal transcription program and undergo epithelial morphogenesis in engineered tissue constructs.

2. Induction des cellules hES dans le lignage neural

Les protocoles expérimentaux permettant l'engagement des cellules ES dans le lignage neural sont largement inspirés des données expérimentales obtenues chez la souris.

A ce jour les méthodes permettant d'obtenir des cellules neurales à partir de cellules hES sont de trois types, soit la formation de corps embryoides, soit la coculture sur des cellules stromales spécifiques ou par défaut en monocouche adhérente (Figure 46).

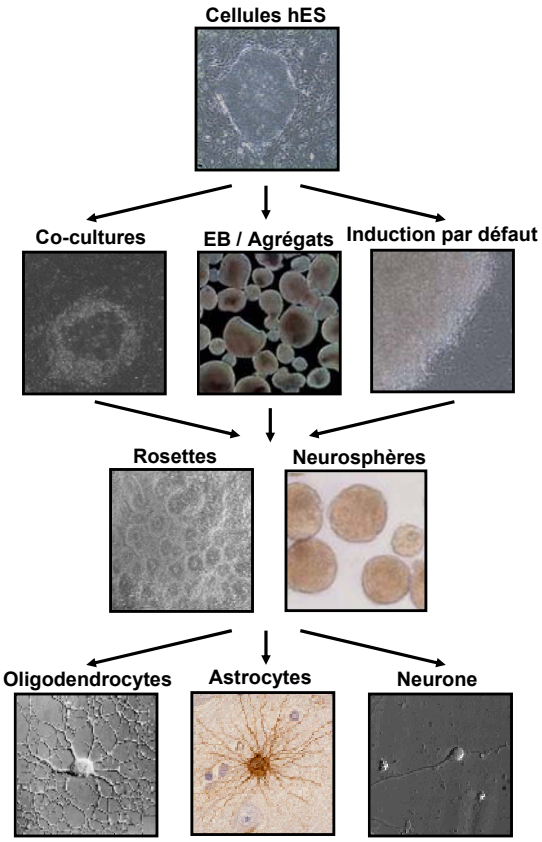


Figure 46 : Les différentes méthodes d'induction neurale des cellules souches pluripotentes.

L'ensemble de ces protocoles ont permis de dériver des précurseurs neuraux qui s'organisent soit en neurosphères (structure neurale en suspension) ou en rosettes neurales contenant des cellules neuroépithéliales (précurseurs neuraux). Les rosettes comme les neurosphères sont caractérisées par l'expression de marqueurs du neuroectoderme tels que NESTIN, SOX1, PAX6 et NCAM ((Zhang SC et al., 2001; Perrier AL et al., 2004) et sont capables de se différencier aussi bien en neurones fonctionnels, en oligodendrocytes qu'en astrocytes (Carpenter MK et al., 2001 ; Zhang SC et al., 2001 ; Reubinoff BE et al. 2001). En 2001, les premiers travaux d'induction neurale des cellules hES sont publiés par trois équipes (Carpenter MK et al., 2001 ; Zhang SC et al., 2001 ; Reubinoff BE et al., 2001). Deux de ces études se sont appuyées sur la capacité des cellules mES et hES à former des EBs contenant les trois feuillets embryonnaires (Carpenter MK et al., 2001 ; Zhang SC et al., 2001), la troisième s'appuyant sur la capacité des hES à se différencier spontanément en cellules neurales en conditions adhérentes (Reubinoff BE et al., 2001). Ainsi dans cette dernière étude, les auteurs ont récupéré mécaniquement des cellules exprimant le marqueur NCAM sur la base de leur morphologie spécifique et ont formé des neurosphères en mettant ces cellules en suspension en présence de EGF et FGF2 comme cela a été décrit pour les cellules souches neurales fœtales ou adultes. Ces travaux pionniers sur les cellules hES ont ainsi démontré la possibilité de produire à partir de ces cellules des précurseurs neuraux sans toutefois éviter la production de populations cellulaires non-neurales, dérivées de l'endoderme et du mésoderme, soulignant la nécessité d'améliorer ces protocoles et de spécifier le lignage. En 2000, Kawasaki et ses collaborateurs ont ainsi définis de nouvelles conditions de différenciation en utilisant la méthode dénommée «SDIA» (Stromal cell-Derived Inducing Activity) fondée sur la coculture des cellules ES avec des cellules stromales de moelle osseuse (PA6, MS5 ou S17) (Kawasaki H et al., 2000 ; Barberi T et al., 2003). Cette technique, permet, chez la souris, une induction neurale rapide et efficace sans expression de marqueurs du mésoderme (Kawasaki H et al., 2000). Ces systèmes ont depuis été transposés aux cellules hES en démontrant que la différenciation induite après coculture sur des cellules stromales MS5 permettait de produire un grand nombre des cellules neuroépithéliales organisées en rosettes neurales (Perrier AL et al., 2004 ; Tabar V et al., 2005 ; Hong S et al., 2008). Ainsi selon ce protocole, les cellules se différencient à prés de 90% en cellules neuroépithéliales exprimant les marqueurs du neuroectoderme NESTIN, SOX1 et PAX6. Par la suite, l'induction neurale des cellules hES a montré être potentialisée par l'action d'antagonistes de la voie des BMPs tels que Noggin (Itsykson P et al., 2005 ; Pruszak J et al., 2007 ; Zhou JM et al., 2008) ainsi que par la composition du milieu de culture qui ne doit pas contenir de sérum puisque ce dernier peut contenir des BMPs (Tropepe V et al., 2001) mais

du milieu N2 (Suter DM, Krause KH, 2008) supplémenté avec un autre complément, le B27 (Suter DM, Krause KH, 2008).

3. Différenciation des cellules souches pluripotentes dans le lignage mélanocytaire

La mise au point de protocole de différenciation de cellules souches pluripotentes humaines en mélanocytes est un enjeu scientifique majeur dans la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la mise en place de ce phénotype au cours de l'embryogenèse. En effet la majorité des informations concernant la migration des cellules de la crête neurale ou la différenciation des melanoblastes en mélanocytes proviennent de constatations faites initialement chez la souris et extrapolée au modèle humain par analogie phénotypique des différentes génodermatoses pigmentaires.

Comme nous l'avons vu dans le chapitre II, les mélanocytes sont dérivés de la crête neurale. A ce jour, trois méthodes ont démontré la possibilité de dériver des cellules ES en cellules dérivées de la crête neurale (cellules NC). Il s'agit principalement de méthodes fondées sur la formation de dérivés du tube neural « SDIA » ou « Rosette neurale » présentant la particularité de former également des cellules de la crête neurale ainsi que des méthodes non sélectives passant par la formation de corps embryoides

3.1. Dérivation de cellules souches pluripotentes en cellules de la crête neurale

- La méthode dite « SDIA »

Cette méthode consiste à utiliser les propriétés de différenciation d'une lignée stromale caractérisée pour spécifier un lignage cellulaire précis. Les différentes expériences réalisées ces dernieres années ont ainsi déterminé que l'induction neurale et crête neurale était favorisée avec une coculture sur la lignée PA6 (Kawasaki H et al., 2000; Mizuseki K et al., 2003). La différenciation de cellules hES sur cette lignée stromale a d'ailleurs fait l'objet de nombreuses études démontrant l'augmentation du niveau d'expression de marqueurs de la différenciation en cellules NC (Pomp O et al., 2005; Brokhman I et al., 2008; Pomp O et al., 2008). Comme nous l'avons vu précédemment la BMP4 est un agent capable de définir le destin cellulaire des cellules progénitrices multipotentes du neuroectoderme. C'est ainsi que la combinaison de la méthode SDIA sur cellules stromales PA6 avec un traitement tardif à la BMP4 (Entre le 5ème et le 8ème jour de différenciation) a démontré possible l'augmentation du nombre de cellules NC générées à partir de mES (Mizuseki K et al., 2003). La culture sur PA6 peut également être combinée avec la formation de neurosphères (Brokhman I et al., 2008) (Pomp O et al., 2008) permettant d'induire la différenciation des cellules hES de manière plus spécifique et plus efficace (supérieure de 25% à la méthodes SDIA). La

première étude réalisant une différenciation terminale de cellules NC dérivées de cellules mES fut réalisée en combinant une culture sur cellules stromale ST2 et une isolation par tri cellulaire sur la base du marqueur c-Kit (Motohashi T et al., 2007). C'est ainsi que les auteurs de cette étude ont démontré que ces cellules pouvaient dans un deuxième temps se différencier en melanocytes, neurones et cellules gliales in vitro. Récemment Jiang et al (2008) ont montré que des cellules hES pouvaient se différencier avec un très fort rendement en cellules NC en cocultivant les cellules hES sur PA6 pendant une semaine avant de réaliser un tri sur P75 et HNK1 (human natural killer-1), deux marqueurs des cellules NC au cours du développement (Bronner-Fraser M, 1986) (Lee G et al., 2007).

- La méthode des corps embryoides

Les corps embryoides ayant pour caractéristique d'être composés de cellules dérivés des trois feuillets embryonnaires il est apparu logique d'essayer d'isoler des cellules NC de ces structures en 3D. C'est ainsi que des EBs générés à partir de cellules hES ont été trypsinés puis triés sur la base de leur expression de FZD3 (Frizzled-3) et CAD11 (Cadherin 11).Les auteurs de cette études ont ainsi démontré que seulement 1% des cellules triées présentaient un double marquage et un potentiel de différenciation identique à des cellules NC (Zhou Y, Snead ML, 2008).

- La formation de rosettes neurales

En 2007, Lee et al ont démontré possible l'obtention d'une population pure et homogène de cellules NC isolées à partir de rosettes neurales en réalisant un tri sur la base de l'expression de p75 et HNK1. Ces structures contenant majoritairement des progéniteurs neuraux peuvent être obtenues de plusieurs manières soit par la méthode dite « SDIA » (Perrier AL et al., 2004) soit par la formation de corps embryoides (Zhang SC et al.,2001). En 2008, le groupe de Laurenz Studer démontra l'existence d'une sous population des cellules issues des rosettes neurales, exprimant le marqueur Forse1- /NCAD+, capable de se différencier en cellules NC (Elkabetz Y et al., 2008).

3.2. Implication du Wnt3A, de SCF et de l'EDN3 dans l'engagement de la différenciation mélanocytaire des cellules ES

Au cours du développement embryonnaire, la différenciation mélanocytaire est le résultat d'un assemblage complexe entre divers événements cellulaires incluant, spécification, proliferation, migration et survie cellulaire. Les principaux éléments régulateurs de ces différents processus ont été mis en évidence par l'analyse du phénotype de mutant présentant des anomalies de la pigmentation. On y trouve la voie des Wnt/β-catenine (Dunn KJ, et al., 2005), le stem cell factor et de son recepteur c-Kit (Kunisada T et al., 1998) ainsi que l'endothéline 3 (Baynash AG et al., 1994).

-La voie Wnt/β-caténine

La voie des Wnt a initialement été mise en évidence dans le développement mélanocytaire par l'observation de l'absence de mélanoblastes dans les souris KO pour les gènes encodant les Wnt1 and Wnt3a (Ikeya M et al.,1997). Par la suite, la voie des Wnt était démontrée pour simuler l'engagement dans le lignage mélanocytaire des cellules de la crête neurale au cours de l'embryogénèse du poisson zèbre (Dorsky R.I et al., 1998). Récemment, une expérience originale réalisée sur des cellules ectodermiques de poulet a démontré que le Wnt3A pouvait simuler l'engagement de leur différenciation en cellules de la crête neurales, exprimant les marqueurs HNK1 et SNAIL2 parallèlement à une absence de cellules neurales et épidermiques. Les auteurs de cette étude ont également démontré que l'ajout de Noggin ou de BMP4 au traitement au Wnt3a en annulait les effets (Patthey C et al., 2009) (Figure 47).

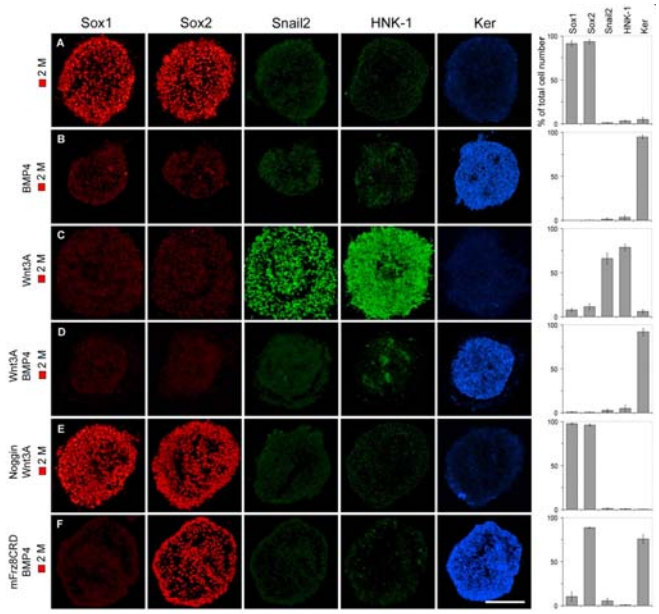


Figure 47: Induction des cellules dérivées de la crête neurale par le Wnt3A.
Effet des traitements au Wnt3A, à la BMP4 ou au Noggin sur des cellules dérivées de la crête neurale de poulet. Annalyse immunocytochimique de l'expression des marqueurs Sox1, Sox2, Snail2, HNK1 et de la Kératine K14.
Source : Patthey C et al., 2009. Wnt-regulated temporal control of BMP exposure directs the choice between neural plate border and epidermal fate.

-L'endothéline 3 (EDN3)

Le rôle de l'endothéline 3 a également été mis en évidence par l'étude du phénotype de souris KO pour son gène ainsi que pour son recepteur (EDNRB). Il a ainsi été démontré que les souris KO étaient totalement dépigmentée suggérant un rôle fondamental dans la différenciation des mélanocytes (Baynash AG.,et al.,1994, Hosoda K et al.,1994). Par la suite il a été démontré que l'EDN3 était nécessaire à la migration des cellules de la crête neurale nécessaire à leur différenciation et à leur engagement dans le lignage mélanocytaire (Lee HO et al., 2003 ; Shin, MK et al., 1999). Par ailleurs, il a été démontré in vitro que l'ajout

d'endothéline 3 sur des cellules de la crête neurale en culture entrainait à la fois leur prolifération et leur différenciation en mélanocytes (Lahav R et al., 1996).

-Rôle de c-Kit/SCF

c-Kit et son ligand SCF contrôle la survie, la migration et la différenciation de mélanoblastes en melanocytes.au cours du développement embryonnaire de souris (Ito M et al., 1999). Chez l'homme les mutations du gène encodant pour c-Kit est associé au piébaldisme également caractérisé par des anomalies de la pigmentation (Spritz RA et al., 1992).

3.3. Dérivation de mélanocytes à partir de cellules mES et hES

A ce jour seul trois laboratoires ont démontré la possibilité de dériver des cellules souches embryonnaires en melanocytes. C'est en 1999 que le groupe de Takahiro Kunisada au japon fut le premier à publier un protocole de différenciation de cellules mES en melanocytes (Yamane T et al., 1999) (Figure 48). Pour cela les auteurs ont utilisé un système de coculture sur la lignée stromale ST2 associé à une stimulation au Dexamethasone, au bFGF, à la Toxine Cholérique ainsi qu'à la 25-dihydroxyvitamin D3, quatre agents connus pour promouvoir la différenciation des mélanoblastes (Ito K et al., 1993). Parmi tous ces agents, les auteurs de cette étude ont démontré que l'ajout de Dexamethasone dans le milieu de culture était le plus fort inducteur de la différenciation. Ainsi stimulée pendant 21 jours, les cellules mES ont graduellement acquis une morphologie et un phénotype mélanocytaire (dès 14 jours) en exprimant les marqueurs c-Kit, TRP1 ainsi que la Tyrosinase. Les auteurs de cette étude ont également démontré que l'endothéline 3 pouvait potentialiser la différenciation mélanogenique en augmentant le nombre de mélanocytes générés. Bien que ce protocole soit une véritable avancée scientifique en offrant la possibilité d'élucider des mécanismes moléculaires impliqués dans la différenciation in vitro des mélanocytes, les auteurs admettent le manque de spécificité dans les types cellulaires produits puisque des cellules endothéliales, des macrophages et des neurones ont également été retrouvées dans les colonies différenciées.

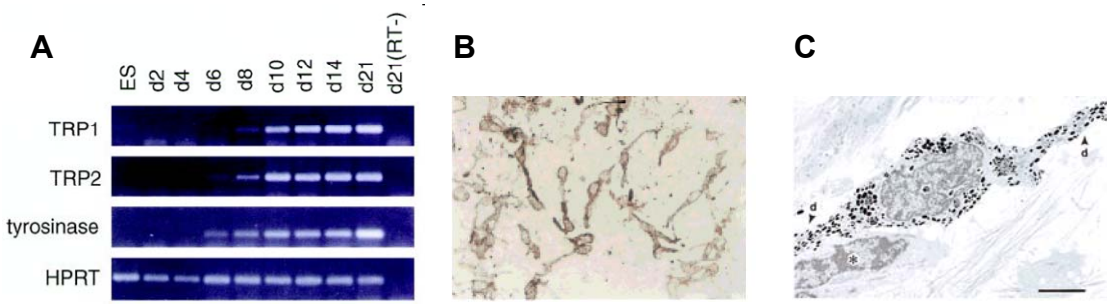


Figure 48: Dérivation de mélanocytes à partir de cellules souches embryonnaires de souris.
(A) RT-PCR permettant de suivre l'expression des gènes TRP1, TRP2, Tyrosinase au cours de la différenciation des cellules mES en mélanocytes.
(B) Observation en microscopie optique de mélanocytes dérivés de cellules mES.
(C) Observation des mélanosomes de mélanocytes dérivés de cellules mES en microscopie optique.
Source : Yamane T et al.,1999. Derivation of melanocytes from embryonic stem cells in culture.

En 2004 l'équipe du Dr Lionel Larue a utilisé le protocole décrit par le Dr Kunisada pour étudier les mécanismes impliqués dans la différenciation des mélanoblastes en mélanocytes (Pla P et al., 2004) (Figure 49). Pour cela les auteurs de cette étude ont établi une lignée de cellules ES à partir de souris transgéniques exprimant le gène rapporteur LacZ sous le control du promoteur de Dct (cellules ES Dct::lacZ). Ainsi, les auteurs ont pu évaluer l'importance du bFGF et de la Toxine Cholérique dans la détermination précoce des melanoblastes alors que l'endothéline 3 joue un rôle important dans la prolifération et le recrutement des melanoblastes. De manière surprenante, bien que le protocole de différenciation utilisé par l'équipe du Dr Larue soit similaire à celui du Dr Kunisada. Le temps nécessaire à l'observation de l'apparition des premiers mélanocytes constatée par les auteurs (21 jours) est décalé de 7 jours. Parallèlement à cette étude réalisée in vitro, les auteurs ont greffé ces cellules ES de souris Dct::lacZ à un embryon de poulet afin d'évaluer leur recrutement et leur différenciation in ovo. Ainsi, 18 heures après la greffe, les cellules ES Dct::lacZ ont démontré des capacités migratoires importantes puisque ces dernières ont migré le long de l'axe dorsolateral de l'embryon. Par ailleurs l'analyse phénotypique des cellules greffées a montré qu'une partie de ces cellules ayant été recrutées s'étaient différenciées en mélanoblastes (caractérisées par l'expression de MITF et de Dct). En 2005, l'équipe du Dr Kunisada publia une autre étude décrivant le rôle de l'endothéline 3 et de c-Kit au cours du développement mélanocytaire en utilisant le même protocole de différenciation de cellules mES que celui décrit précédemment. Ils ont ainsi démontré dans un premier temps que l'ajout de d'endothéline 3 dans le milieu de culture induisait la différenciation de ces cellules mES en melanocytes. Ils ont ensuite cherché à étudier le rôle compensateur de l'endothéline 3 sur la différenciation de cellules mES mutées pour c-Kit et ont observé que *in vivo*, la surexpression ectopique d'endothéline 3 sur la peau des souris réduisait le phénotype « white spotting » de souris mutées pour c-Kit. *In vitro* les auteurs ont également démontré que l'ajout du ligand de c-Kit et d'endothéline 3 permettait de stimuler la différenciation des cellules mES en mélanocytes de manière synergique (Aoki H et al., 2005). A l'inverse, la même étude démontra que l'inhibition des deux récepteurs de ces voies de signalisation, EDNRB et c-Kit empêchait l'induction du lignage mélanocytaire des cellules mES. En 2007, la même équipe démontra que les cellules mES induites dans ce processus de différenciation et exprimant le marqueur c-Kit présentaient la capacité de se différencier à la fois en neurones, en cellules gliales et en melanocytes soulignant la multipotentialité de ces cellules dérivées de la crête neurale (Motohashi T et al., 2007).

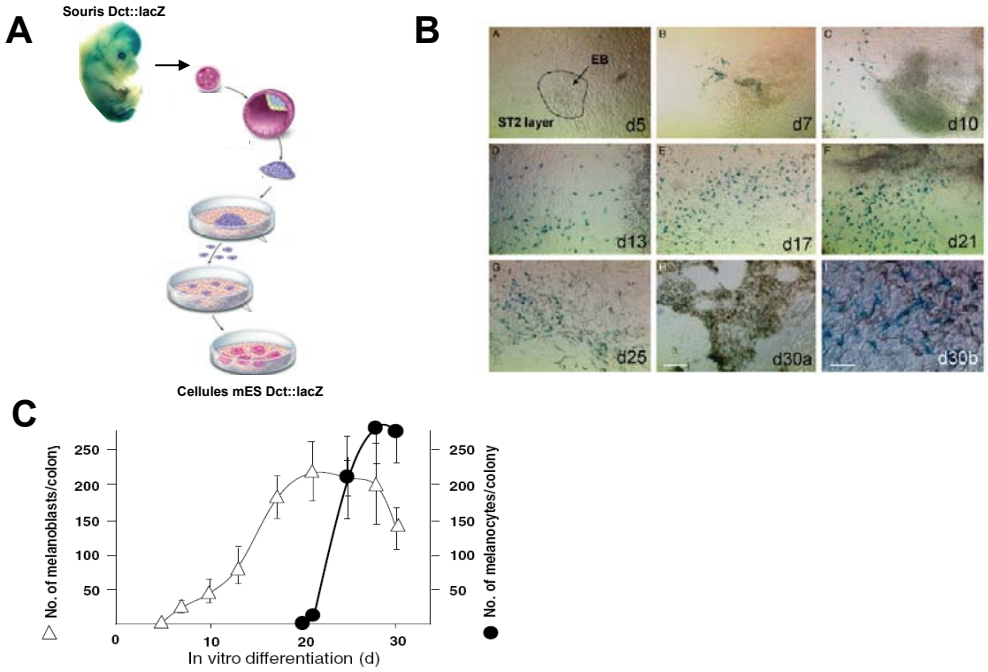


Figure 49: Dérivation de cellules mES Dct ::LacZ en mélanocytes.
(A) Dérivation de lignées de cellules mES Dct ::LacZ à partir de souris Dct ::LacZ.
(B) Coloration X-gal permettant de visualiser (en bleu) l'expression de Dct au cours de la différenciation des cellules mES à J5, J7, J10, J13, J17, J21, J25 et J30.
(C) Evolution du nombre de mélanoblastes et du nombre de mélanocytes durant le processus de différenciation de cellules mES.
Source : Pla P et al., 2004: Dct::lacZ ES Cells: A Novel Cellular Model to Study Melanocyte Determination and Differentiation.

En 2006, le groupe de Meenhard Herlyn a publié le seul et unique article à ce jour permettant de différencier des cellules hES en mélanocytes (Fang D et al., 2006). Ils ont ainsi défini des conditions expérimentales permettant de produire une population de mélanocyte homogène à plus de 85% s à partir de cellules hES en utilisant un protocole combinant à la fois une stimulation au Wnt3a, au SCF, et à l'EDN3 mais sans coculture sur cellules stromales (Figure 50). Leur méthode passe par la formation de corps embryoides de 4 jours suivie d'une phase d'adhérence de culture sur fibronectine. Durant les 6 à 8 semaines que dure le protocole de différenciation, les cellules hES ont été traitées avec du milieu conditionné de cellules stromales modifiées génétiquement pour surexprimer du Wnt3A tout en supplémentant ce milieu avec du Dexamethasone et de la Toxine Cholérique, comme décrit dans le protocole publié par Kunisada mais également en y ajoutant du SCF et de l'EDN3. Ainsi différenciés les melanocytes, dérivés de cellules hES présentent une morphologie dendritique mélanocytaire, sont capables de produire des melanosomes et expriment de nombreux marqueurs caractéristiques de ce lignage cellulaire (TRP1, MITF, Tyrosinase ; SOX10, PAX3, c-Kit, Dct et Pmel17.

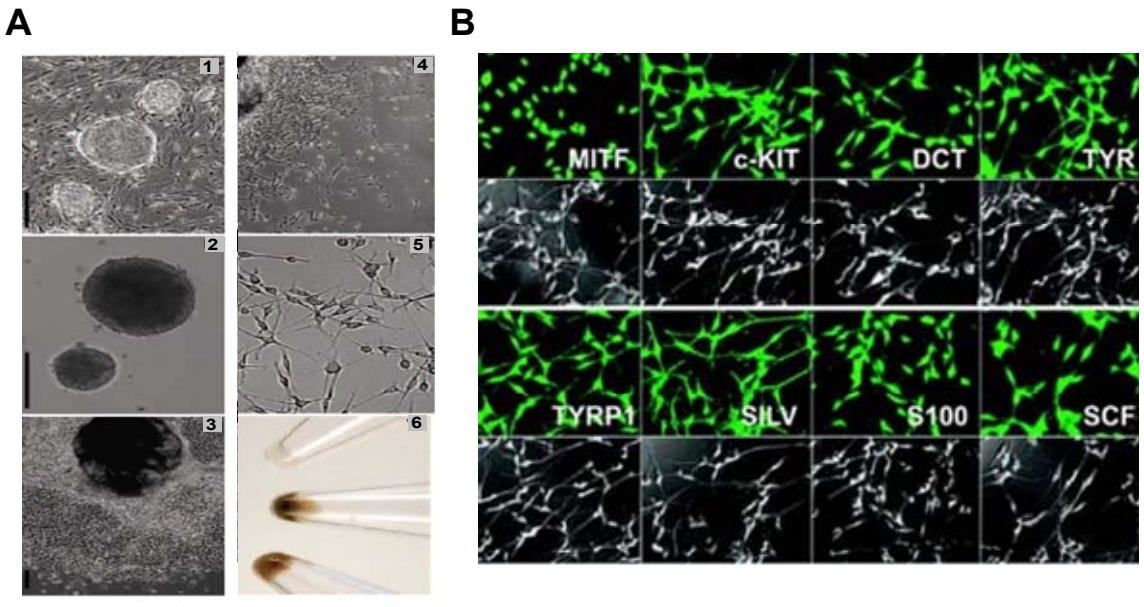


Figure 50 : Dérivation de mélanocytes à partir de cellules souches embryonnaires humaines.
(A) Observation en microscopie à contraste de phase des différentes étapes du protocole de différenciation des cellules hES en melanocytes selon la méthode de Fang. 1) cellules hES ; 2) Corps embryoides de 4 jours ; 3) Corps embryoides de 6 jours, après ensemencement sur plastique 3) cellules à 16 jours de différenciation ; 4) cellules dendritiques à 30 jours ;5) mélanocytes dérivés de cellules hES ; 6) culots cellulaires de cops embryoides (En haut), de melanocytes dérivés de cellules hES (Au milieu) et après 6 mois de culture (En bas).
(B) Analyse Immunocytochimique des marqueurs MITF, cKit, DCT, TYR, TRP1, SILV, S100 et SCF sur des mélanocytes dérivés de cellules hES.
Source: Fang D et al., 2006: Defining the conditions for the generation of melanocytes from human embryonic stem cells.

III Régulation des premières étapes du développement par les microARNs

A. Les microARNs : Une nouvelle classe de régulateurs

Découverts dans un premier temps chez la plante en 1990 (Van der Krol AR et al., 1990), puis retrouvés dans Caenorhabditis elegans (C. elegans) en 1993 (Lee RC et al., 1993), les microARNs sont des petits ARNs de 21–25 nucléotides (nt) qui participent aux mécanismes endogènes de régulation post transcriptionnels. Le premier microARNs à avoir été découvert fut lin-4. Son rôle a immédiatement été mis en évidence comme étant un élément clé de la régulation du développement larvaire chez C elegans (Lee RC et al., 1993). 7 ans plus tard let-7, corégulateur, avec lin-4, du même processus développemental fut découvert par le groupe de Reinhart et al (Reinhart BJ et al., 2000). C'est en 2001 que Grishok et ses collaborateurs ont démontré que les microARNs utilisaient la machinerie moléculaire de l'ARN interférence pour réguler l'expression de leur gènes cible (Grishok A et al., 2001). Bien qu'identiques d'un point de vue structurel, les siARNs (small inteferring RNAs) et les microARNs présentent de nombreuses différences notamment dans leurs mécanismes de régulation. Nous détaillerons dans le présent chapitre les mécanismes moléculaires mis en jeu par les microARNs dans la régulation de processus physiologiques majeurs tels que la contrôle de la balance prolifération/différenciation ou encore le contrôle des principales étapes clés du développement embryonnaire.

1. Biogénèse des microARNs

Les microARNs peuvent être situés aussi bien dans des séquences codantes que non codantes du génome (Pour revue Liu X et al., 2008). Ces séquences sont dans un premier temps transcrits sous forme d'un transcrit primaire (pri-microARN) par les ARN polymérases de type II ou III et sont ensuite maturés dans le noyau par le couple Drosha/DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8 gene). Le produit de cette maturation est une séquence double brins de 70 nt que l'on appelle transcrit secondaire (pre-microARN). Ces pre-microARNs sont ensuite exportés dans le cytoplasme via l'exportin V et sont pris en charge par la protéine Dicer qui va maturer cette séquence pour produire un ARN double brin de 21-25 nt. Dans un troisième temps c'est le complexe RISC (RNA induced silencing complex) qui va terminer le processus de maturation en utilisant les brins codant ou non codant pour se guider vers l'ARN messager ciblés et en réguler son expression.

2. Mécanismes de régulation de l'expression des microARNs

A ce jour près de 700 microARNs ont été décrits chez l'homme et l'on estime à environ 30% le nombre de gènes qu'ils régulent. La spécificité d'action des microARNs dépend d'une séquence de 8 nt située en 3' de leur séquence que l'on appelle « seed ». Cette séquence seed va permettre au complexe RISC de réguler l'expression de l'ARNm cible en association avec la protéine Argonaute (ou Ago) (Figure 51).

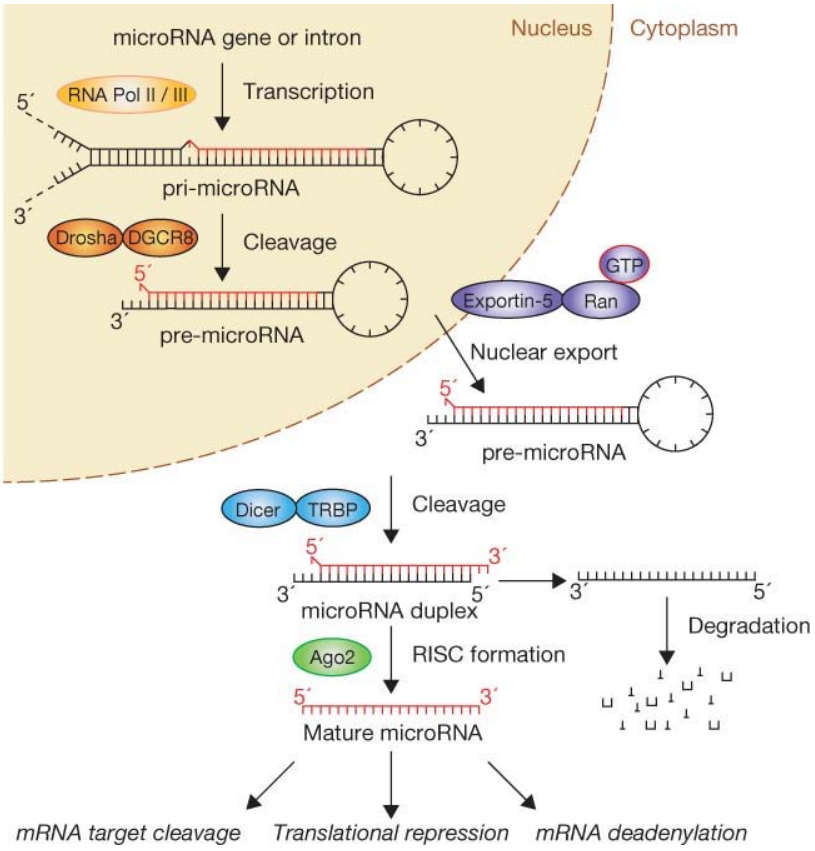


Figure 51 : Biogénèse des microARNs.
Source: Winter J et al., 2009. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation.

En fonction du degré de complémentarité compris entre la séquence seed du microARN et le 3'UTR (UnTranslated Region) de l'ARNm ciblé, différents mécanismes peuvent être mis en place (Figure 52). Dans le cas d'une complémentarité complète le complexe, RISC aura pour fonction de dégrader l'ARNm (Song JJ et al., 2003) alors que dans le cas d'une complémentarité partielle, l'inhibition de la traduction passera par une ablation de la coiffe de l'ARNm ou sa déadénylation. Dans certains cas, il a également été décrit des effets régulateurs du complexe RISC passant par la dégradation de la protéine néoformée ou le blocage de sa traduction (pour revue Eulalio A et al., 2008).

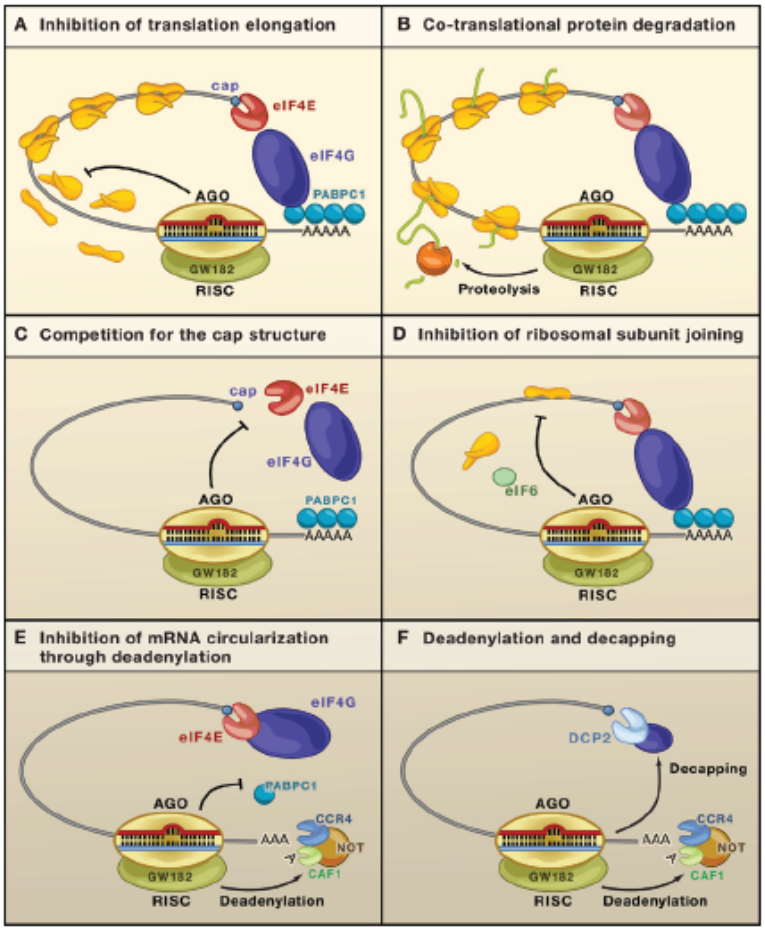


Figure 52: Les différents modes de régulation posttranscriptionnels des microARNs.
Source: Eulalio A et al., 2007. Getting to the Root of miRNA-Mediated Gene Silencing.

B. Fonctions régulatrices des microARNs au cours du développement embryonnaire

Bien que ce mécanisme de régulation post-transcriptionnel ait été à ce jour associé à la régulation de très nombreux processus biologiques, la majorité des études leur attribue un rôle majeur dans la régulation des processus de prolifération, de différenciation et cancéreux (Schickel R et al., 2008). Ces dernieres années de nombreuses équipes ont tenté d'étudier le rôle de ces petits ARNs dans la mise en place de différents tissus embryonnaires dérivés du neuroectoderme, en particulier le système nerveux central et l'épiderme.

1. Rôle des microARNs dans le développement neural

La mise en place du système nerveux central découle d'un enchainement extrêmement précis d'événements moléculaires impliquant de nombreux facteurs de transcription et signaux intercellulaires dont ont récemment été associés les microARNs. A l'instar des premières études développementales ayant mis en évidence la fonction de certains facteurs de transcription ce sont les observations faites sur des animaux présentant des mutations ou des pertes de fonctions qui ont apporté les premières évidences de l'implication des microARNs

dans la régulation de la neurogenèse. C'est donc en 2005 avec l'observation des importantes anomalies structurales et fonctionnelles du SNC (système nerveux central) présentées par les poissons zèbre KO Dicer (Giraldez AJ et al., 2005) puis confirmées chez la souris KO Dicer (De Pietri Tonelli Det al., 2008) que la maturation des microARNs est apparue essentielle à ce processus développemental. Les progrès technologiques permettant des études d'expression à grande échelle de plus en plus précises, des microARNs spécifiquement exprimées par les cellules neurales ont été identifiées et par la suite les études de perte de fonctions ciblées (KO spécifique de ces microARNs) ont permis d'en caractériser la fonction. miR-9 et miR-124 sont à ce jour les deux microARNs les plus étudiés pour leur rôle régulateur de la neurogenèse. Il a ainsi été démontré que miR-9 était principalement exprimé au niveau des progéniteurs neuraux alors que l'expression de miR-124 augmentait au cours de leur différenciation en neurone (Kapsimali M et al., 2007). La fonction de miR-124 dans les neurones a par la suite été associée à celle de ses cibles directes puisque celui ci peut inhiber des gènes clés de la neurogenèse tels que REST (RE-1-silencing transcription factor) (Visvanathan J et al., 2007) ou PTBP1 (Polypyrimidine Tract-binding Protein), entrainant l'augmentation d'expression de nombreux gènes pro-neuronaux (Makeyev EV et al., 2007). Un autre exemple important démontrant le rôle des microARNs dans la formation du SNC est celui de miR-9* (microARN antisens de miR-9) et de miR-124 qui ont été mis en évidence pour diminuer la prolifération de progéniteurs neuraux en induisant leur différenciation, via la modulation de BAF53a et BAF45a (Yoo AS et al., 2009).

D'autres microARNs ont été mis en évidence comme étant des éléments de régulation majeurs dans la neurogenèse c'est notamment le cas miR-125 et de let-7. L'implication de ces deux miroARNs dans la mise en place du SNC a initialement été démontrée In vitro par des études d'expression réalisées sur cultures primaires de neurones de C elegans et de drosophile (Smirnova L et al., 2005). Dans la même étude les auteurs ont démontré que l'expression de ces deux microARNs était spécifiquement augmentée au fur et à mesure de l'engagement des cellules mES dans le lignage neural.

Par la suite des études in vivo ont confirmé que MLin41, une cible commune de ces deux microARNs était nécessaire à la fermeture du tube neural au cours de l'embryogénèse de C elegans (Maller Schulman BR et al., 2008). En 2008 une autre étude démontra le rôle majeure de miR-125 dans l'engagement neural des cellules EC (embryonal carcinoma) et des cellules ES (Rybak A et al., 2008).

2. MicroARNs et développement épidermique

En 2006, parallèlement aux anomalies développementales observées au niveau de la peau des souris KO pour Dicer (Andl T et al., 2006), Yi et al du groupe d'Elaine Fuchs démontra le

rôle fondamental des microARNs dans la morphogenèse de l'épiderme (Yi R et al., 2006). Dans un premier temps, ils ont ainsi démontré que plusieurs microARNs étaient fortement et spécifiquement exprimés au niveau de l'épiderme interfolliculaire, parmi lesquels miR-200a/b, miR-203 miR-205 et miR-429 (Figure 53A). La fonction régulatrice de miR-203 a par la suite été étudiée conjointement par deux groupes, celui de Fuchs et celui de Candi qui publièrent quasi simultanément deux études démontrant son rôle régulateur de la différenciation kératinocytaire (Lena AM et al., 2008, Yi R et al., 2008). Il a ainsi été démontré que miR-203 était surexprimé au niveau des couches suprabasales de l'épiderme et que son expression, au cours du développement embryonnaire de la souris, était corrélé avec la formation d'un épiderme pluristratifié (entre E13.5 et E15.5 chez la souris). Ainsi l'action de miR-203 a été associée à celle de sa principale cible p63, dont le rôle a préalablement été décrit comme étant le principal régulateur de la différenciation kératinocytaire. Les auteurs de ces études ont par la suite démontré que, *in vivo*, la surexpression de miR-203 au cours du développement embryonnaire de souris (E18.5) entrainait une diminution du nombre de cellules au niveau de la couche basale et la formation d'un épiderme anormal (Figure 53B).

A

miRNAs highly expressed in epidermis			miRNAs highly expressed in hair follicle		
miRNA	Count[a]	Frequency (%)[b]	miRNA	Count	Frequency (%)
mmu-miR-16	88	7.81	mmu-miR-16	134	18.98
mmu-miR-203	**88**	**7.81**	**mmu-miR-199a**	**122**	**17.28**
mmu-miR-20	**77**	**6.83**	**mmu-miR-199a***	**59**	**8.36**
mmu-miR-125b	59	5.24	mmu-let-7c	38	5.38
mmu-miR-34a	**48**	**4.26**	mmu-let-7i	23	3.26
mmu-miR-200a	**47**	**4.17**	mmu-miR-21	23	3.26
mmu-miR-17-5p	**45**	**3.99**	mmu-let-7f	20	2.83
mmu-miR-200c	**42**	**3.73**	mmu-miR-125b	18	2.55
mmu-let-7c	38	3.37	mmu-let-7b	16	2.27
mmu-miR-93	**35**	**3.11**	mmu-miR-99b	16	2.27
mmu-miR-19b	**28**	**2.48**	**mmu-miR-214**	**14**	**1.98**
mmu-miR-141	**27**	**2.40**	mmu-miR-20	13	1.84
mmu-miR-205	**26**	**2.31**	**mmu-miR-126**	**12**	**1.70**
mmu-miR-200b	**23**	**2.04**	**mmu-miR-143**	**12**	**1.70**
mmu-miR-27b	**22**	**1.95**	mmu-miR-15b	11	1.56
mmu-miR-92	22	1.95	mmu-miR-24	9	1.27
mmu-miR-99b	22	1.95	mmu-miR-92	9	1.27
mmu-miR-15b	21	1.86	mmu-let-7a	8	1.13
mmu-miR-21	21	1.86	**mmu-miR-152**	**8**	**1.13**
mmu-let-7i	20	1.77	mmu-miR-15a	8	1.13
mmu-let-7b	18	1.60	mmu-miR-17-5p	8	1.13
mmu-miR-24	18	1.60	mmu-miR-18	7	0.99
mmu-let-7g	**17**	**1.51**	mmu-miR-206	6	0.85
mmu-miR-106b	17	1.51	mmu-miR-196a	5	0.71
mmu-miR-27a	**17**	**1.51**	mmu-miR-106b	4	0.57
mmu-miR-30b	**17**	**1.51**	mmu-miR-199b	4	0.57
mmu-miR-125a	**16**	**1.42**	mmu-miR-27b	4	0.57
mmu-miR-429	**16**	**1.42**	mmu-miR-351	4	0.57
mmu-miR-18	15	1.33	mmu-let-7d	3	0.42
mmu-let-7f	13	1.15	mmu-let-7g	3	0.42
mmu-miR-130a	13	1.15	mmu-miR-103	3	0.42
mmu-miR-191	**12**	**1.06**	mmu-miR-127	3	0.42
mmu-let-7a	11	0.98	mmu-miR-130a	3	0.42

[a]Count: the number of times an individual miRNA was cloned from the library. [b]Frequency (%): the cloning frequency of an individual miRNAs among total miRNAs in the library. Boldface denotes miRNAs whose expression is upregulated more than threefold compared with the other library.

© 2006 Nature Publishing Group http://www.nature.com/naturegenetics

B

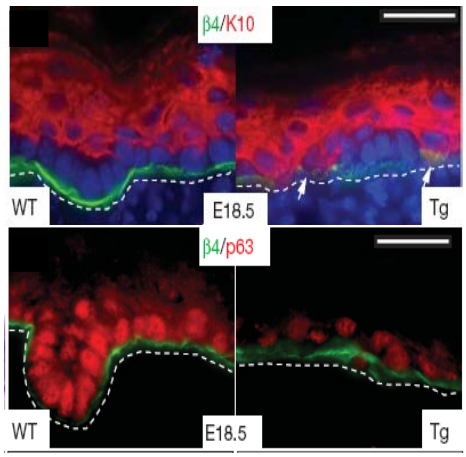


Figure 53: miR-203 régule la formation de l'épiderme de souris.
(A) Liste des microARNs les plus exprimés au niveau de l'épiderme interfolliculaire et du follicule pileux.
Source : Yi et al., 2006. Morphogenesis in skin is governed by discrete sets of differentially expressed microARNs.
(B) Analyse Immunocytochimique de la kératine K10 ainsi que de p63 et de l'intégrine β4 sur des épidermes d'embryon de souris wild type (WT) ou Transgéniques surexprimant miR-203 (Tg) au stade E18.5.
Source: Yi R et al., 2008. A skin microRNA promotes differentiation by repressing 'stemness'.

In vitro, il a également été montré que sa surexpression dans des kératinocytes entrainait une diminution importante de leur potentiel prolifératif, caractérisé par leur expression de la kératine 10 et une diminution de leur potentiel clonogénique (Lena AM et al., 2008) (Figure 54).

D'autres microARNs ont récemment été mis en évidence dans le contrôle de la différenciation épidermique, c'est notamment le cas de miR-34, qui chez la souris a été décrit comme étant régulé par p63 à la fois sur des cultures primaires de keratinocytes et sur de l'épiderme embryonnaire. Ainsi en 2010, Antonini D et al ont démontré que la restauration d'un niveau basal de miR-34 dans des kératinocytes murins cultivés in vitro entrainait un retour à un cycle cellulaire normal ainsi qu'une expression rétablie de la cycline D1 et de la Cdk4 (cyclin-dependent kinase 4) (Antonini D et al., 2010)

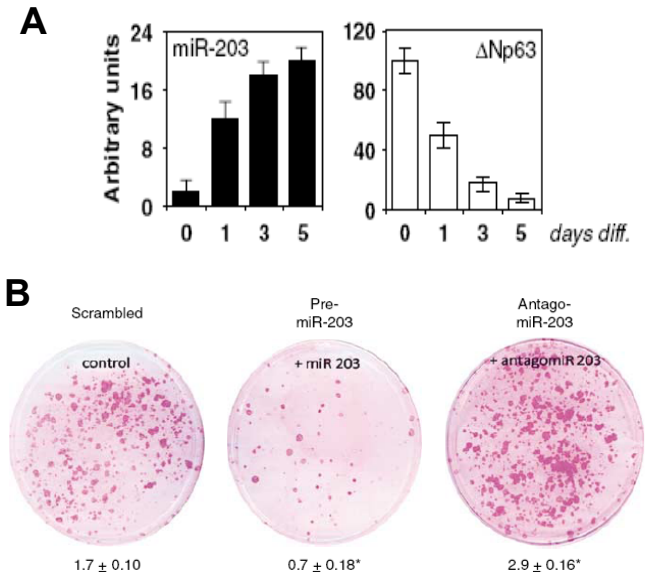


Figure 54: miR-203 régule la différenciation des kératinocytes *in vitro*.
(A) Expression de miR-203 et de ΔNp63 au fur et à mesure de la différenciation des kératinocytes induite au calcium.
(B) Effet de la surexpression (PremiR-203) ou du KO (AntagomiR-203) sur le potentiel clonogénique de kératinocytes humains.
Source : Lena AM et al., 2008., miR-203 represses 'stemness' by repressing DeltaNp63.

C. Rôle des microARNs dans les cellules souches pluripotentes

1. MicroARNs et cellules ES

Les premières évidences impliquant les microARNs dans le contrôle de la balance entre prolifération et différenciation des cellules souches embryonnaires ont initialement été observées dans des modèles de cellules mES KO pour Dicer (Kanellopoulou C et al., 2005; Murchison EP et al., 2005). Dans un deuxième temps la génération de cellules mES présentant un KO pour DGCR8 confirma l'importance de la maturation de certains

microARNs dans la différenciation de ces cellules. Alors que les cellules mES KO pour DGCR8 et Dicer présentent globalement des phénotypes similaires en terme de prolifération, cycle cellulaire anormale et défaut de différenciation (Wang Y et al., 2007), l'ensemble de ces paramètres sont aggravés chez les cellules mES KO Dicer. L'apport des systèmes permettant les études de criblage d'expression, ont permis par la suite de déterminer l'importance et la fonction de certains de ces microARNs dans la maintenance des capacités pluripotentes des cellules ES. C'est ainsi que les principales études d'expression réalisées sur les cellules ES ont consisté à comparer les profils d'expression entre cellules indifférenciées et différenciées en corps embryoides. Le croisement des données obtenues par les différentes équipes a permis de dégager une signature de 31 microARNs spécifique aux cellules hES incluant let-7a, miR-302, miR-367, miR-368, miR-371, miR-372, miR-373 (Chen C et al., 2007; Laurent LC et al., 2008; Morin RD et al., 2008). De même 17 microARNs ont été caractérisés par un profil d'expression inversé en présentant un très fort niveau d'expression dans les corps embryoides (Strauss WM et al., 2006; Chen C et al., 2007). C'est également par des études d'expression de ce type qu'un cluster présentant une fonction majeure dans les cellules ES de souris a été déterminé il s'agit du cluster miR-290 situé sur le chromosome 7 (Zovoilis A et al., 2009).

2. Régulation de la différenciation des cellules hES par les microARNs

Krichevsky et al. ont démontré que certains microARNs pouvaient jouer des rôles opposés dans l'engagement neural des cellules ES. Ainsi la réalisation d'études d'expression au cours du processus de neurogenèse de cellules mES a permis d'identifier deux microARNs ; miR-9 et miR-124 comme étant spécifiquement surexprimés dans les cellules différenciées en progéniteurs neuraux. Dans un deuxième temps les études fonctionnelles réalisées sur le même modèle de différenciation neurale ont permis de démontrer que la surexpression ou le KO de ces deux microARNs dans ces progéniteurs neuraux entrainait une modification de leur potentiel de différenciation. Ils ont ainsi démontré que la surexpression de miR-9 entrainait une réduction significative de la différenciation astrocytaire alors qu'à l'inverse le KO de miR-9 conduisait à la réduction de la différenciation neuronale (Krichevsky AM et al., 2006). Cette étude fut la première à indiquer que des microARNs spécifiques d'un tissu donné pouvaient jouer un rôle majeur dans la différenciation de cellules pluripotentes conduisant à sa formation.

L'engagement des cellules ES dans le lignage musculaire et cardiaque a également été décrit comme étant régulé par des microARNs. Ainsi différentes études ont démontré que miR-1 et miR-133, deux microARNs spécifiques du tissus cardiaque et du muscle squelettique, étaient directement régulé par de nombreux facteurs clés de la différentiation musculaire tels que le SRF (serum response factor), MyoD (Myosin D), ou Mef2c (myocyte enhancer factor 2C)

(Kwon et al., 2005 ; Rao PK et al., 2006; Zhao Y ; al., 2007). Ainsi miR-1 a démontré un rôle inducteur de la différenciation de progéniteurs cardiaques (Kwon et al., 2005 ; Rao PK et al., 2006; Zhao Y ; al., 2007) alors que miR-133 a été décrit pour avoir un rôle inverse en inhibant la différenciation des myoblastes squelettiques pour les maintenir à l'état de progéniteurs (Chen JF et al., 2006). Plus récemment, Ivey et al. ont montré que miR-1 and miR-133 étaient enrichis dans les cellules mES différenciées en cardiomyocytes et qu'ils commençaient à être surexprimés des les premiers jours de l'engagement mésodermique (Ivey KN al., 2008). (Figure 55) L'étude fonctionnelle sur ce modèle de différenciation démontra dans un deuxième temps que la surexpression de ces microARNs au niveau de corps embryoides entrainait une augmentation du nombre de cellules engagées dans le lignage mésodermique et une diminution du nombre de cellules engagé dans les autres feuillets.

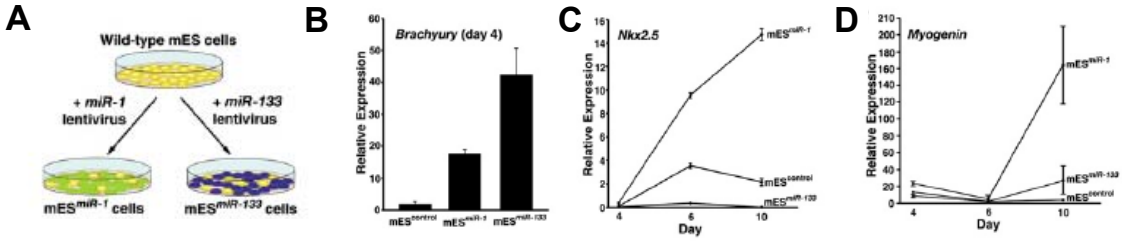


Figure 55: miR-1 et miR-133 régulent l'engagement des cellules mES dans le lignage mésodermique.
(A) Schéma expérimental de l'étude.
(B) Effet de la surexpression de miR-1 et de miR-133 sur l'expression de Brachyury à quatre jours de différenciation en corps embryoides.
(C-D) Effet de la surexpression de miR-1 et de miR-133 sur l'expression de Nkx2.5 (C) et de Myogenin (D) durant dix jours de différenciation en corps embryoides.
Source: Ivey KN et al., 2008. MicroRNA regulation of cell lineages in mouse and human embryonic stem cells.

La même année, le groupe dirigé par Benjamin Reubinoff et al (Tzur G et al., 2008) a rapporté, chez l'humain cette fois, que des microARNs spécifiques d'un tissus donné, en occurrence, le foie, pouvaient être augmentés dans un processus de différenciation direct de cellules hES. Dans cette étude, les auteurs ont pour cela engagé spécifiquement les cellules hES dans le lignage endodermique et ont démontré la surexpression de miR-122 et miR-192 deux microARNs spécifiquement exprimés par les cellules hépatiques (Figure 56). Contrairement à ce qui avait été déterminé chez la souris dans le lignage neural et cardiaque, les microARNs mis en évidence n'ont pas démontré d'habilité à moduler le processus de différenciation lorsque leurs expressions étaient modifiées.

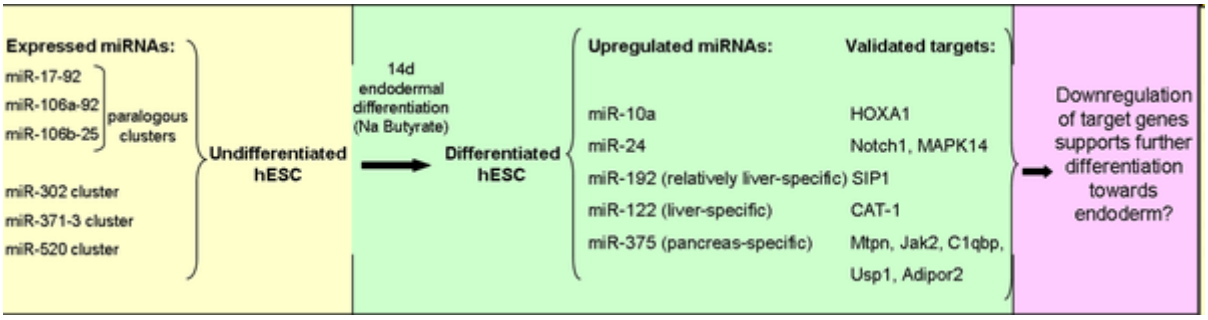


Figure 56: MicroARNs modulés au cours de l'induction endodermique des cellules hES.
Liste des microARNs dont l'expression est modifiée au cours de la différenciation des cellules hES dans la voie endodermique.
Source: Tzur G et al., 2008. MicroRNA expression patterns and function in endodermal differentiation of human embryonic stem cells.

3. Rôle des microARNs dans la régulation de la pluripotence

Les microARNs ont donc des fonctions très variables à la fois dans le contrôle de la balance prolifération/différenciation des cellules ES mais également dans le contrôle de leur destin cellulaire qu'il soit neural, cardiaque ou hépatique. Avec l'avènement des cellules iPS, de nombreuses études ont cherché à démontrer que les mêmes microARNs impliqués dans les cellules ES l'étaient également dans les cellules reprogrammées (Chin MH et al., 2009) C'est ainsi que le cluster miR-290 (dont l'homologue est miR-371, 372 et 373 chez l'humain (Suh et al., 2004) a été décrit dans deux études récentes comme étant des éléments de régulation majeure de la maintenance de l'état pluripotent des cellules ES via la régulation du statut de méthylation de son ADN (Benetti R et al., 2008; Sinkkonen L et al., 2008). C'est ainsi qu'en 2009, Judson et ses collaborateurs ont démontré que la surexpression de ce cluster dans des fibroblastes de souris pouvait suppléer à la surexpression de c-Myc dans leur reprogrammation en cellules iPS (Judson RL et al., 2009).

Ces différents travaux de recherche démontrent que les microARNs n'ont pas seulement un rôle passif dans la différenciation ou la prolifération des cellules souches embryonnaires mais une véritable fonction régulatrice de leur destin cellulaire. La majorité des études ayant été faites chez la souris, peu de choses sont encore connues dans des modèles humains de différenciation, ouvrant ainsi la porte à un domaine de recherche encore inexploré.

IV Problématique

Comme nous venons de le voir dans l'introduction, les cellules souches pluripotentes d'origines embryonnaires (cellules hES) ou induites à la pluripotence (cellules iPS) possèdent deux propriétés essentielles, l'autorenouvellement et la pluripotence. Ces deux propriétés font de ces cellules une ressource biologique unique pour l'étude des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans le développement embryonnaire précoce. A ce jour les données permettant de comprendre ces mécanismes chez l'homme sont principalement le résultat d'extrapolations phénotypiques faites entre des modèles pathologiques humains et des souris KO ou mutantes impliquant les mêmes gènes. Les cellules souches pluripotentes apportent la possibilité de mettre en place des modèles de différenciation *in vitro* permettant de confirmer le rôle de certains de ces facteurs mais également d'en identifier d'autres qui, à ce jour, n'avaient pas été mis en évidence.

Ainsi, l'objectif général de ma thèse a consisté à étudier les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la spécification des cellules du neurectoderme vers le lignage épidermique. Nous avons pour cela initié un projet de recherche consistant à dériver des populations homogènes de kératinocytes et de mélanocytes à partir de cellules souches pluripotentes. Durant la première partie de ma thèse j'ai donc participé à la mise au point et la caractérisation de ces processus de différenciation. Les microARNs ayant été mis en évidence pour réguler à la fois les processus de développement embryonnaire humain *in vivo* et la différenciation des cellules hES *in vitro*, il nous est apparu intéressant de chercher à identifier ceux qui pouvaient jouer un rôle dans la spécification des cellules souches pluripotentes dans le lignage épidermique. Parallèlement à ces travaux, j'ai également participé à l'identification de microARNs impliqués dans la spécification neurale des cellules souches pluripotentes à travers une collaboration effectuée avec le Dr Alexandra Benchoua.

RESULTATS

I. Dérivation d'une population pure et homogène de kératinocytes à partir de cellules souches embryonnaires humaines

Titre de l'article: Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study. The Lancet. 2009 Nov 21;374(9703):1745-53. **Auteurs:** Hind Guenou, Xavier Nissan, Frenando Larcher, Jessica Feteira, Gilles Lemaitre, Manoubia Saidani, Marcella Del Rio, Christine C Barrault, François-Xavier Bernard, Marc Peschanski, Christine Baldeschi, Gilles Waksman.

Au cours de la première partie de ma thèse j'ai cherché à élaborer un protocole de différenciation permettant la spécification des cellules hES dans le lignage épithélial. Suite aux travaux publiés par les équipes du Dr Daniel Aberdam (Coraux C et al., 2003 ; Gambaro K et al., 2006 ; Aberdam E et al., 2007 ; Aberdam E et al., 2008), du Dr Howard Green (Green H et al., 2003) et du Dr Sean Palecek (Ji L et al., 2006 ; Metallo CM et al., 2008 ; Metallo CM et al., 2009), nous avons cherché à combiner l'utilisation de la lignée de fibroblastes murins 3T3, initialement mise en évidence par Howard Green pour favoriser la survie et la prolifération des kératinocytes, avec un traitement à la BMP4, décrit dans la littérature pour induire le lignage épithélial *in vitro* et i*n vivo* (Kawasaki H et al., 2000 ; Sassai Y et al., 2001). Ainsi stimulées, nous avons démontré que les cellules hES se différenciaient en une population de kératinocytes fonctionnels capables de générer un épiderme pluristratifié normal aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Cette étude a récemment été publiée dans la revue The Lancet (Guenou H et al., 2009).

A. Etude du potentiel de différenciation des cellules hES in vitro dans le lignage kératinocytaire

Dans la première partie de ce projet, nous avons démontré que les cellules hES engagées dans ce processus de différenciation respectaient la chronobiologie du développement embryonnaire de l'épiderme humain (Figure 1). Ainsi, l'analyse par PCR quantitative du profil d'expression des cellules hES au fur et à mesure de leur différenciation montre que ces dernières perdent dans un premier temps leurs capacités pluripotentes, caractérisées par la diminution d'expression des marqueurs OCT4 et NANOG, pour acquérir transitoirement un phénotype de progéniteurs épithéliaux, exprimant les kératines K8 et K18, avant de s'engager définitivement dans le lignage kératinocytaire et exprimer les kératines K5 et K14 (Figure 2A). Ces données expérimentales ont été confirmées au niveau protéique par une analyse par FACS montrant que près de 60% des cellules expriment la kératine K14 à la fin des 40 jours de différenciation (Figure 2B). A l'inverse, il ne reste plus que 1% de cellules exprimant le marqueur des cellules souches SSEA1 (Figure 2B).

B. Caractérisation phénotypique de la population de kératinocytes dérivés de cellules hES (K-hESC)

Une fois le processus de différenciation terminé, les cellules présentant une morphologie épithéliale ont été isolées et remises en culture dans les conditions définies par les travaux princeps de Rheinwald et Green (Rheinwald JG et al 1975) pour favoriser la prolifération des kératinocytes (Milieu FAD et coculture sur fibroblastes 3T3). Cette population cellulaire, nommées K-hESC pour « kératinocytes dérivés de cellules hES », présentent un phénotype similaire à des kératinocytes adultes humains à la fois d'un point de vue morphologique (Figure 3A) que phénotypique, puisque près de 95% des cellules expriment les kératines K5 et K14 (Figure 3B). Par ailleurs, l'analyse par PCR quantitative des profils d'expression des K-hESC révèle que ces cellules ne présentent aucune différence significative avec des kératinocytes adultes humains (HK). Nous avons ainsi démontré qu'une fois différenciées en kératinocytes, les cellules dérivées de cellules hES surexprimaient à la fois les marqueurs structuraux des kératinocytes basaux que sont les kératines K5 et K14 mais également le facteur de transcription ΔNp63, les intégrines α6 et β4, le collagène de type VII et la laminine 5 (Figure 4A). L'ensemble de ces données ont été confirmées au niveau protéique par une analyse immunocytochimique sur les mêmes marqueurs (Figure 4B). La comparaison phénotypique des K-hESC et des kératinocytes adultes révèle toutefois une différence importante au niveau de leur potentiel immunogène puisque le niveau d'expression des marqueurs de type HLA DR et ABC est inférieur dans les K-hESC que dans les HK (Figure 5). La capacité prolifératives des K-hESC a également été évaluée dans des différentes conditions de culture. Nous avons ainsi démontré que ces cellules pouvaient être cultivées pendant plus de 9 passages (60 doublements) en milieu FAD sur 3T3 sans perdre leur phénotype (Appendix 3) et que comme des kératinocytes adultes, ces dernières maintiennent leur phénotype dans un milieu semi défini (Appendix 5).

C. Reconstruction d'épiderme in vitro et in vivo à partir de kératinocytes dérivés de hES (K-hESC)

Enfin, la dernière partie de ce travail de recherche a consisté à mettre en évidence les propriétés fonctionnelles de ces kératinocytes dérivés de cellules hES en démontrant leurs capacités à générer un épiderme *in vitro*. Pour cela, en collaboration avec la société BioAlternatives, les cellules ont été ensemencées sur un insert de polycarbonate puis placées à l'interface air/liquide pendant 10 jours. Dans ces conditions, les cellules sont capables de générer un épiderme pluristratifié présentant l'ensemble des couches de l'épiderme humain (Figure 6A). L'analyse immunocytochimique des marqueurs des différentes couches de

l'épiderme a permis par ailleurs de démontrer que la kératine K14, la laminine 5, le collagène de type VII et les intégrines α6 et β4 étaient bien exprimés au niveau de la couche basale de cet épiderme généré à partir de K-hESC alors que la kératine K10 l'était dans les couches suprabasales. L'expression de l'involucrine et de la filaggrine au niveau de la couche granuleuse de ces épidermes démontre par ailleurs la capacité de ces kératinocytes à se différencier terminalement (Figure 6B). L'analyse à grande échelle, du niveau d'expression de plusieurs dizaines de gènes impliqués dans l'homéostasie cutanée a été réalisée par « PCR array ». Cette dernière confirme les données obtenues précédemment par PCR quantitative puisqu'aucun des gènes testés ne montre de différence d'expression majeure entre les épidermes générés à partir de K-hESC et de HK (Appendix 6). Parallèlement à la démonstration que ces cellules pouvaient générer un épiderme *in vitro* nous avons évalué leur capacité à générer un épiderme fonctionnel après greffe dans un modèle de souris immunodéficientes. Ce travail a été réalisé au travers d'une collaboration avec l'équipe des Pr. Larcher et Del Rio à Madrid dans un modèle qu'ils ont développé et publié en 2002 (Del Rio M et al., 2002). Selon ce protocole les kératinocytes sont ensemencés sur une matrice de fibrine contenant des fibroblastes humains avant d'être greffés sur la région dorsale de souris SCID. Cinq souris immunodéficientes ont donc ainsi été greffées avec des kératinocytes dérivés de cellules hES. L'analyse histologique de la zone greffée révèle que douze semaines après la greffe, dans ces conditions d'homéostasie, le greffon présente une architecture pluristratifiée similaire à celle d'une peau adulte et exprime l'involucrine humaine au niveau des couches épineuses et granuleuses confirmant à la fois leur différenciation terminale et leur origine humaine. Le faible nombre de keratinocytes basaux exprimant Ki67 montre par ailleurs que, dans des conditions physiologiques, les K-hESC ne sont pas associés à une hyper prolifération cellulaire caractéristique des tumeurs (Figure 7).

L'ensemble de ces résultats est présenté dans l'article qui suit.

D. Conclusion

Au cours de cette étude, nous avons donc élaboré un protocole de différenciation *in vitro* permettant de dériver une population pure et homogène de kératinocytes fonctionnels à partir de cellules hES. La reconstitution d'un épiderme à partir de kératinocytes dérivés de cellules hES représente une avancée thérapeutique majeure à la fois dans un but de modélisation de génodermatoses mais également dans le cadre de stratégie de médecine régénérative innovante. Ainsi, la dérivation de kératinocytes à partir de lignées de cellules hES pathologiques permettrait d'étudier les mécanismes physiopathologiques dans un cadre plus développemental que symptomatique tels que c'est le cas aujourd'hui. Par ailleurs, notre équipe travaille actuellement sur la transposition de ce protocole aux cellules iPS dans le but

de caractériser des pathologies telles que les épidermolyses bulleuses, pour lesquelles des lignées de cellules hES ne sont pas disponibles. Cette nouvelle source inépuisable de keratinocytes dérivés de cellules hES faiblement immunogènes capables de générer un épiderme pluristratifié fonctionnel permet d'envisager leur utilisation dans une démarche clinique pour le traitement des grands brulés. En effet bien que la médecine régénérative soit un domaine en pleine expansion en dermatologie, il existe un réel besoin pour ce type de ressources biologiques potentiellement illimitées capable de régénérer un épiderme. A ce jour le principal traitement disponible pour les patients grands brulés est l'autogreffe d'épiderme, qui consiste à effectuer une biopsie cutanée de quelques mm2 dans une zone saine, d'en isoler les kératinocytes souches, de les amplifier in vitro et finalement reconstruire un épiderme prêt à être greffé. Cette technique de thérapie cellulaire a permis d'améliorer grandement le pronostic vital des patients et permet d'éviter tout risque de rejet. Cependant elle présente l'inconvénient majeur de nécessiter un délai incompressible de trois semaines pour obtenir la quantité suffisante de kératinocytes. Dans cette optique, la possibilité d'utiliser une banque de cellules hES dérivées en kératinocytes prêtes immédiatement à être greffées en tant que pansement biologique temporaire en replacement des peaux de cadavres ,jusqu'ici utilisées, permettrait d'éviter les risques d'infection et de déshydratation pouvant intervenir pendant ce délai de production.

Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study

*Hind Guenou, Xavier Nissan, Fernando Larcher, Jessica Feteira, Gilles Lemaitre, Manoubia Saidani, Marcela Del Rio, Christine C Barrault, François-Xavier Bernard, Marc Peschanski, Christine Baldeschi, Gilles Waksman**

Summary

Background Cell therapy for large burns is dependent upon autologous epidermis reconstructed in vitro. However, the effectiveness of current procedures is limited by the delay needed to culture the patient's own keratinocytes. To assess whether the keratinocyte progeny of human embryonic stem cells (hESCs) could be used to form a temporary skin substitute for use in patients awaiting autologous grafts, we investigated the cells' capability of constructing a pluristratified epidermis.

Methods hESCs from lines H9 and SA01 were seeded at least in triplicate on fibroblast feeder cells for 40 days in a medium supplemented with bone morphogenetic protein 4 and ascorbic acid. Molecular characterisation of cell differentiation was done throughout the process by quantitative PCR, fluorescence-activated cell sorting, and immunocytochemical techniques. Keratinocyte molecular differentiation and functional capacity to construct a human epidermis were assessed in vitro and in vivo.

Findings From hESCs, we generated a homogeneous population of cells that showed phenotypic characteristics of basal keratinocytes. Expression levels of genes encoding keratin 14, keratin 5, integrin α6, integrin β4, collagen VII, and laminin 5 in these cells were similar to those in basal keratinocytes. After seeding on an artificial matrix, keratinocytes derived from hESCs (K-hESCs) formed a pluristratified epidermis. Keratin-14 immunostaining was seen in the basal compartment, with keratin 10 present in layers overlying the basal layer. Involucrin and filaggrin, late markers of epidermal differentiation, were detected in the uppermost layers only. 12 weeks after grafting onto five immunodeficient mice, epidermis derived from K-hESCs had a structure consistent with that of mature human skin. Human involucrin was appropriately located in spinous and granular layers and few Ki67-positive cells were detected in the basal layer.

Interpretation hESCs can be differentiated into basal keratinocytes that are fully functional—ie, able to construct a pluristratified epidermis. This resource could be developed to provide temporary skin substitutes for patients awaiting autologous grafts.

Funding Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, University Evry Val d'Essonne, Association Française contre les Myopathies, Fondation René Touraine, and Genopole.

Lancet 2009; 374: 1745–53

See **Comment** page 1725

INSERM/UEVE U-861, I-STEM, AFM, Institute for Stem Cell Therapy and Exploration of Monogenic diseases, Evry Cedex, France (H Guenou PhD, X Nissan, J Feteira, G Lemaitre PhD, M Saidani, M Peschanski MD, C Baldeschi PhD, Prof G Waksman PhD); **CIEMAT–CIBER-ER, Epithelial Biomedicine Division, Madrid, Spain** (F Larcher PhD, M Del Rio PhD); **and BIOalternatives SAS, Gencay, France** (C C Barrault, F-X Bernard PhD)

*Prof G Waksman died in Sept, 2007

Correspondence to:
Dr Christine Baldeschi, INSERM/UEVE U-861, I-STEM, AFM, Institute for Stem Cell Therapy and Exploration of Monogenic Diseases, 5 rue Henri Desbruères, 91030 Evry Cedex, France
cbaldeschi@istem.genethon.fr

Introduction

For more than two decades, cell therapy has been essential in improving outcomes for patients with large burn injuries, by means of epidermal replacement following in-vitro expansion of the patient's own keratinocyte stem cells. The major drawback of this technique, however, is the 3-week delay needed to obtain the required amount of cells, which puts patients at risk of dehydration and infection.[1] Decellularised cadaver skin has been used to cover wounds during the 3-week period, but the benefit of this temporary skin substitute is hampered by its limited availability. Furthermore, the tissue can be rapidly rejected by an immune reaction. To overcome the problem of accessibility, inert synthetic and biosynthetic matrices have been actively searched for and developed.[2] Up to now, however, these substitutes have not replaced cadaver skin in large burns[3] since they increase the risks of rapid graft rejection and disease transmission because they contain bovine collagen and adult allogenic skin cells.[2]

Human embryonic stem cells (hESCs) might offer another way to meet the challenge of temporary skin replacement because they can be expanded in unlimited amounts and differentiated into any human cell phenotype in vitro, provided the relevant differentiation protocol is developed.[4] The potential of the derivatives of hESCs in cell therapy is currently being explored in applications as diverse as Parkinson's and Huntington's neurodegenerative diseases,[5,6] diabetes mellitus,[7] and cardiac insufficiency following ischaemia.[8] The rapid maturation of these studies has recently been exemplified by the authorisation given by the US Food and Drug Administration for a first clinical trial in patients with spinal trauma.[9]

So far, only one study has reported the formation of a skin equivalent by use of mouse embryonic stem cells.[10] Subsequently, several studies tried to differentiate hESCs along the keratinocyte lineage. Cultured in the form of embryoid bodies or nodules produced in mice with severe combined immunodeficiency disorder, hESCs

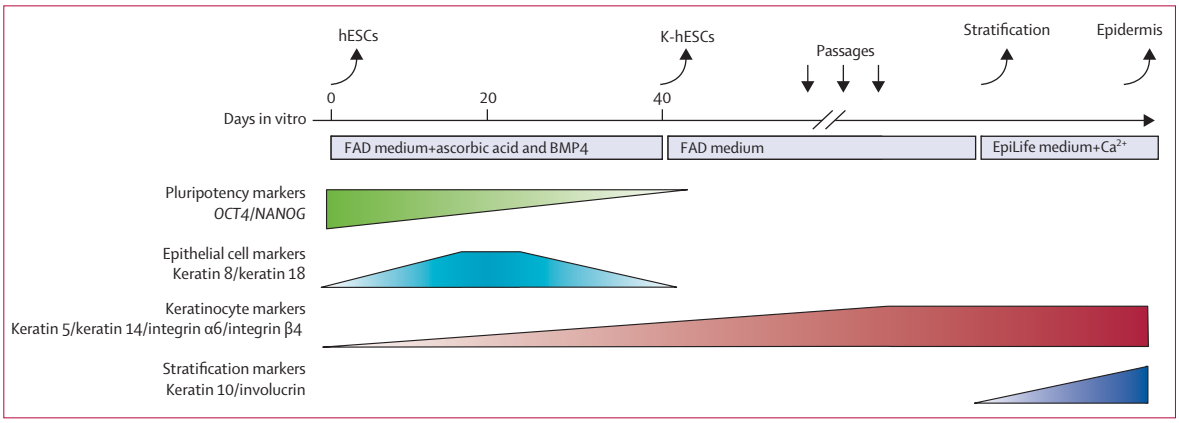


***Figure 1*: Schematic representation of the protocol design for differentiation of hESCs into keratinocytes**
Arrows indicate steps at which particular phenotypes were observed. Expression levels of proteins and genes markers are roughly indicated. hESCs=human embryonic stem cells. K-hESCs=keratinocytes derived from hESCs. BMP4=bone morphogenetic protein 4.

gave rise to epidermal cells, but they showed low proliferative potential.[11] More recently, keratinocytes were derived from hESCs by use of short cytokine induction.[10–14] However, production of a pluristratified epidermis has remained elusive in vitro and in vivo, suggesting that functional basal keratinocytes had not been obtained. We have met that functional challenge by designing a protocol that takes into account the long-term succession of biological steps that lead to epidermis formation during ontogenesis.

Methods

Cell culture

hESCs from two cell lines, SA01 (Cellartis, Götenborg, Sweden) and H9 (Wicell, Madison, WI, USA) were grown on STO mouse fibroblasts, inactivated with 10 mg/mL mitomycin C and seeded at 30 000 per cm², and grown as previously described.[6]

For differentiation, hESC clumps were seeded onto mitomycin-C-treated 3T3 fibroblasts in FAD medium (3:1 mixture of Dulbecco's modified Eagle's medium [DMEM] and Ham's F12 media) and 10% fetal calf serum (FCII, Hyclone, Logan, UT, USA) supplemented with 5 µg/mL insulin, 0·5 µg/mL hydrocortisone, 10^{-10} mol/L cholera toxin, 1·37 ng/mL triiodothyronine, 24 µg/mL adenine, and 10 ng/mL recombinant human epidermal growth factor. Three independent experiments were done with each hESC line. Ectodermal differentiation was induced with 0·5 nmol/L human recombinant bone morphogenetic protein 4 (BMP4; R&D System, Abingdon, UK) and 0·3 mmol/L ascorbic acid (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Cells were grown in the same medium until clones of epithelial cells were observed and isolated, at which time induction was stopped. As a control, primary human keratinocytes (HKs) were grown on mitomycin-C-treated 3T3 fibroblasts in FAD medium. When keratinocytes derived from hESCs (K-hESCs) were grown in a serum-free medium without feeder layer, KGM2 medium (Lonza, Basel, Switzerland) was used in flasks coated with collagen I (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

See Online for webappendix

Characterisation of hESC differentiation was done every 10 days for 40 days by quantitative PCR and fluorescence-activated cell sorting (FACS) analyses.

Molecular characterisation techniques

For quantitative PCR, total RNA was isolated from hESCs, HKs, and K-hESCs with the RNeasy Mini extraction kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), according to the manufacturer's protocol. An on-column DNase I digestion was done to avoid genomic DNA amplification. RNA expression and quality were checked with Nanodrop technology (Wilmington, DE, USA). 500 ng RNA was used for reverse transcription by use of the Superscript III reverse transcription kit (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Quantitative PCR analysis was done with a LightCycler 480 system (Roche, Basel, Switzerland) and SYBR Green PCR Master Mix (Roche) in accordance with the manufacturer's instructions. Quantification of gene expression was based on the Delta Ct method and normalised on 18S expression. Melting curve and electrophoresis analyses were undertaken to control specificities of PCR products and to exclude non-specific amplification. PCR primers are listed in the webappendix p 1. Quantitative PCR arrays were prepared by loading primer mixes (1 µmol/L), in duplicate, in 96-well plates. Quantitative PCR was done as previously described after addition of SYBR Green PCR Master Mix and 12·5 ng complementary DNA.

For immunocytochemistry analysis, cells were fixed in 4% paraformaldehyde (15 min, room temperature) before permeabilisation and blocking in phosphate buffer solution (PBS) supplemented with 0·4% Triton X-100 and 5% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich). Primary antibodies were incubated overnight at 4°C in blocking buffer. Antibodies comprised mouse anti-K18 (Chemicon, Temecula, CA, USA), mouse anti-K14, rabbit anti-K14, and mouse anti-K5 (Novocastra, Newcastle, UK), mouse anti-

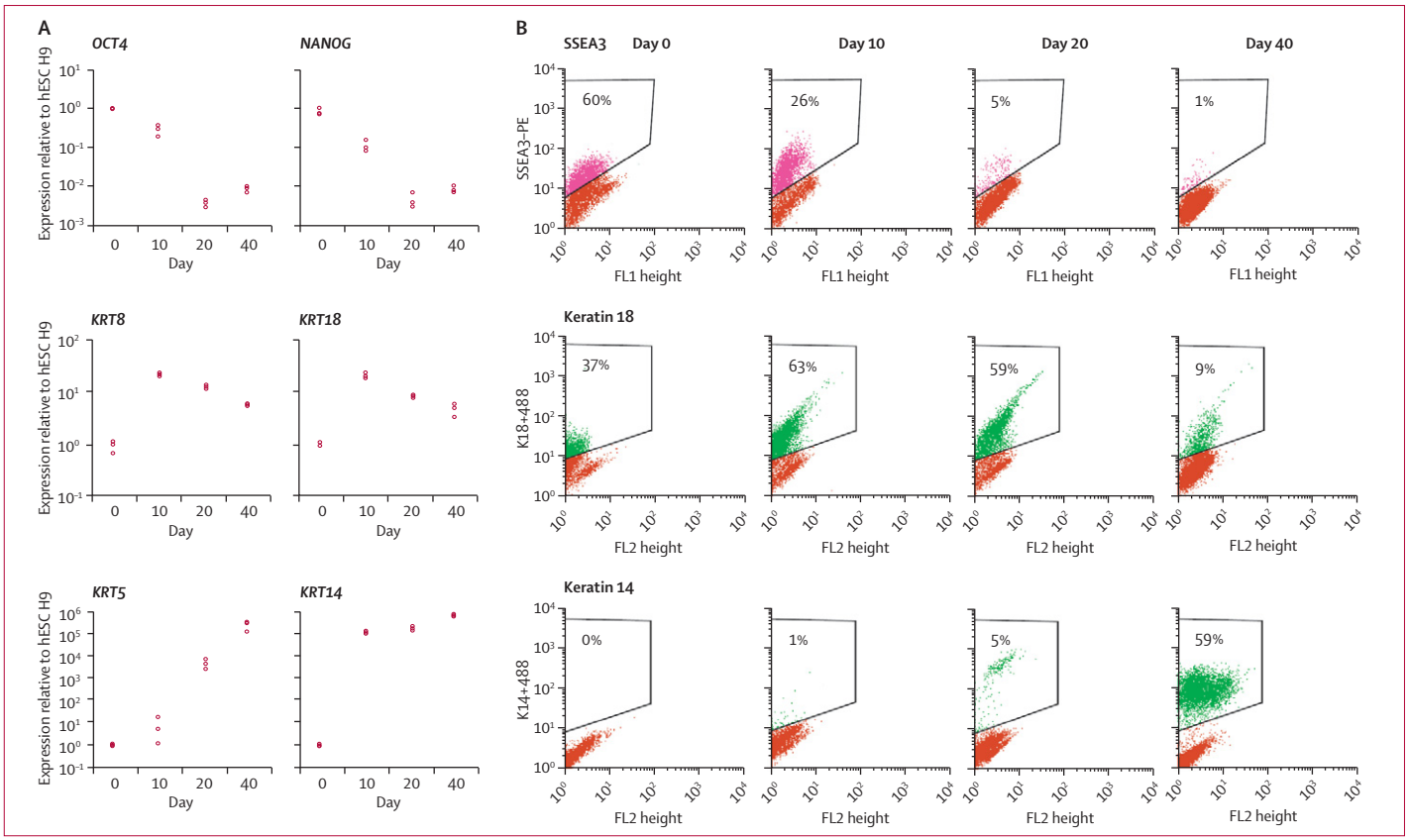


Figure 2: **Establishment of a keratinocyte lineage from hESCs (H9 cell line)**
(A) Quantitative PCR analysis of *OCT4*, *NANOG*, *KRT8*, *KRT18*, *KRT5*, and *KRT14* in cells during the 40 days of differentiation. Scatter plots are shown for three independent experiments. (B) Representative fluorescence-activated cell sorting analysis of SSEA3, keratin 18, and keratin 14 in H9 hESCs during the 40 days of differentiation. FL1 and FL2 correspond to a relative fluorescence average in a specific channel depending on secondary antibody fluorochrome. We used two secondary antibodies: Alexa 488 and phycoerythrin (PE)-conjugated antibodies. For SA01 cell line see webappendix p 2. hESC=human embryonic stem cell.

ColVII, mouse anti-integrin α6, and mouse anti-laminin 5 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and mouse anti-integrin β4 (BD Biosciences). Cells were stained with the species-specific fluorophore-conjugated secondary antibody (Invitrogen; 1 h, room temperature); nuclei were visualised with DAPI (4,6Ł-diamidino-2-phenylindole). Three independent experiments were done with each hESC line.

For FACS analysis, cells were detached from culture plates by use of Trypsin-EDTA (Invitrogen) and fixed in 2% paraformaldehyde (15 min, room temperature). After PBS wash, cells were either permeabilised with 0·1% Saponin (Sigma-Aldrich) or not. Primary antibodies diluted at 1:100 were incubated (1 h, room temperature) in PBS containing 0·1% fetal calf serum. Isotype-specific antibodies or no primary antibody were used in controls. Species-specific secondary antibodies were added (1 h, room temperature) and cells were analysed on a FACScalibur system by use of CellQuest software (BD Biosciences). Detection of MHC class I and II proteins was done as described without addition of secondary antibody, with anti-HLA-ABC and anti-HLA-DR (both from BD Biosciences). 10 000 events were analysed for each experiment. Three independent experiments were done for each hESC line.

Organotypic cultures and grafting onto mice

Organotypic epidermis was generated as previously described[15] on polycarbonate culture inserts (NUNC, Roskilde, Denmark). Cells were maintained for 11 days in EpiLife medium (Invitrogen) supplemented with 1·5 mmol/L calcium chloride and 50 µg/mL ascorbic acid (Sigma-Aldrich) and at the air-liquid interface for 10 days. Experiments were done with H9 (n=3) and SA01 (n=2) cell lines.

For grafting onto immunodeficient mice, bioengineered skin equivalents were generated with fibrin matrix populated with human fibroblasts. K-hESCs from H9 (five samples from one experiment) were seeded on the fibrin matrix, grown immersed to confluence, and then grafted onto the back of 6-week-old female nu/nu mice (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA), as previously described.[16] Implants were harvested 10–12 weeks after grafting, and the tissue specimens fixed in 10% buffered formalin for paraffin embedding. The grafting protocol has been approved and authorised by CIEMAT (Comité

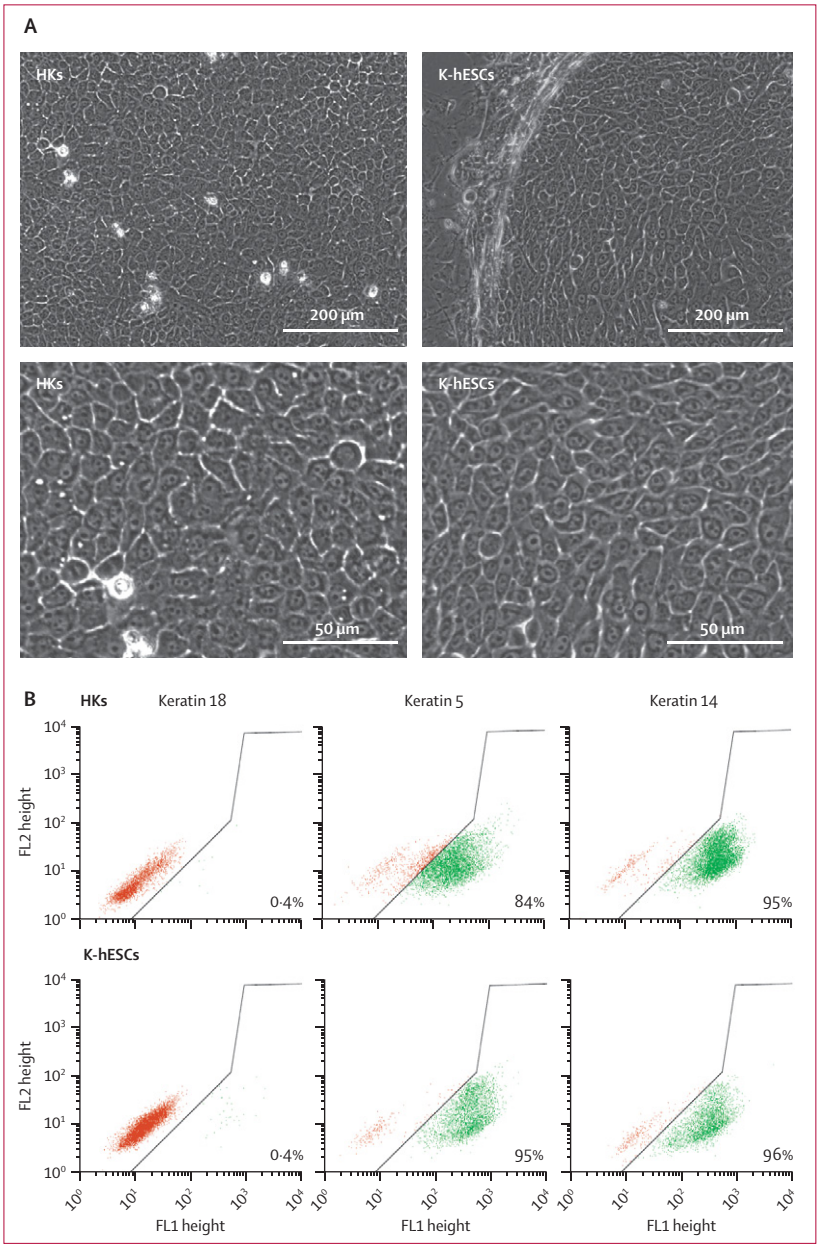


***Figure 3*: Characterisation of a homogeneous population of keratinocytes derived from hESCs**
(A) Microscopy analysis of human primary keratinocytes (HKs), and keratinocytes derived from hESCs (K-hESCs) from H9 cell line. For SA01 cell line see webappendix p 2. (B) Representative fluorescence-activated cell sorting analysis of keratin 18, keratin 5, and keratin 14 in HKs and K-hESCs from H9 cell line. FL1 and FL2 correspond to a relative fluorescence average in a specific channel depending on secondary antibody fluorochrome. For SA01 cell line see webappendix p 2. hESCs=human embryonic stem cells.

de Etica, Experimentación Animal) for the project Novel Biosafe Approaches for Cell and Gene Therapy of Rare Skin Diseases (reference PI081054, approved and granted by the Instituto de Salud Carlos III).

Role of the funding source

The sponsor of the study had no role in study design, data collection, data analysis, data interpretation, or writing of the report. The corresponding author had full access to all the data in the study and had final responsibility for the decision to submit for publication.

Results

Figure 1 shows the experimental design. In differentiating hESCs from both H9 and SA01 cell lines, pluripotency gene markers *OCT4* and *NANOG* decreased rapidly after 5 days, and were undetectable at 20 days (figure 2, webappendix p 2). FACS analysis showed a loss of the undifferentiated state marker SSEA3 at 40 days (figure 2, webappendix p 2).

The succession of epidermal markers during ontogenesis characterised by a strict temporal expression pattern of structural molecules[17–19] was fully replicated in differentiating hESC cultures. FACS analyses showed that expression of *KRT8* and *KRT18* genes that encode keratin 8 and keratin 18, respectively, peaked at 10 days then decreased progressively during the following weeks (figure 2). This time course was paralleled by the transitory expression of keratin 18, which peaked between 10 days and 25 days then decreased to a much reduced basal concentration at 40 days (figure 2, webappendix p 2). Expression of the *KRT5* and *KRT14* genes increased progressively after day 10 (figure 2, webappendix p 2). This was again paralleled by an increase in concentration of keratin 14, which reached a maximum at 40 days of differentiation (figure 2, webappendix p 2).

Induction was stopped after 40 days by withdrawal of BMP4 and ascorbic acid from the medium (figure 1). After selection and isolation, cells with typical pavimentous epithelial morphology spontaneously formed colonies. In those culture conditions, cells proliferated actively for up to nine passages (ie, nine subcultures and amplification) and could be frozen and thawed at will, while maintaining their phenotype (webappendix p 3). We named these cells K-hESCs (keratinocytes derived from human embryonic stem cells; figure 3, webappendix p 2). K-hESC characterisation was done with both H9 (n=3) and SA01 (n=3) cell lines. FACS analysis after four passages showed absence of keratin 18 in K-hESCs with more than 95% of cells expressing keratin 5 and keratin 14 (figure 3, webappendix p 2).

Expression levels of genes in K-hESCs were similar to those in HKs (figure 4, webappendix p 2). Immunostaining for Oct4 and keratin 18 was absent in K-hESCs but present in controls (undifferentiated hESCs and hESCs differentiated for 10 days, respectively; webappendix p 4). Cytoskeletal localisation of keratins 5 and 14 was similar in K-hESCs and HKs (figure 4, webappendix p 2). Keratin 10, a marker of differentiated keratinocytes of suprabasal layers, was absent in K-hESCs but present after stimulation by calcium (webappendix p 4). All data confirmed the phenotypic characterisation of K-hESCs as basal keratinocytes. Additionally, K-hESCs had capacity for adhesion since integrins α6 and β4 were appropriately located at the

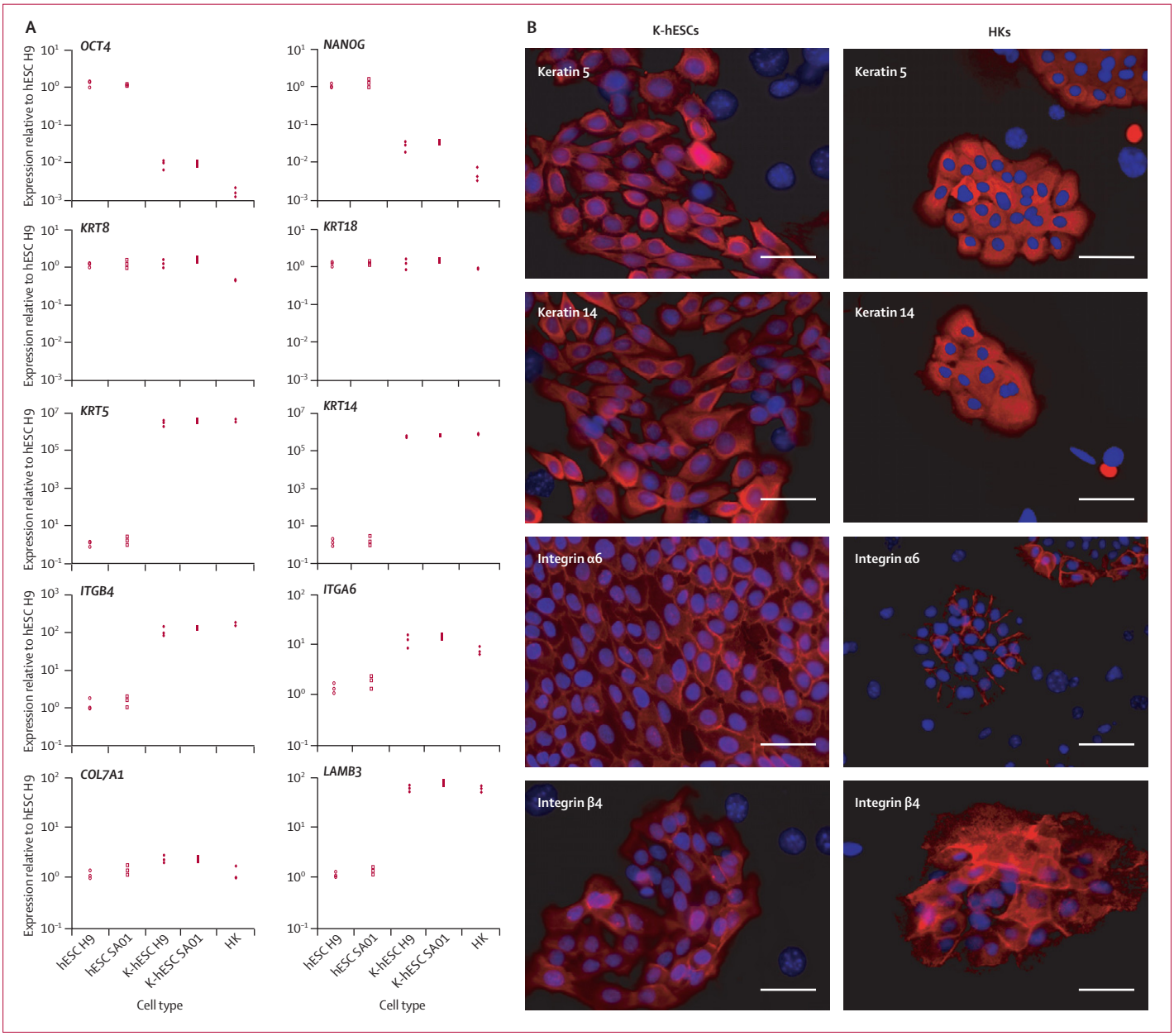


***Figure 4*: Gene and protein expression in keratinocytes derived from hESCs**

(A) Quantitative PCR analysis of *OCT4, NANOG*, *KRT8*, *KRT18*, *KRT5*, *KRT14*, *ITGB4*, *ITGA6*, *Col7A1*, and *LAMB3* in human primary keratinocytes (HKs) and keratinocytes derived from hESCs (K-hESCs) from the two cell lines H9 and SA01. Data are presented as scatter plots for three independent experiments. (B) Immunofluorescence of keratin 5, keratin 14, integrin α6, and integrin β4 in K-hESCs derived from H9 and in HKs. Scale bar is 20 μm. hESCs=human embryonic stem cells.

membrane (figure 4) with collagen VII and laminin 5 in the extracellular matrix (webappendix p 4). However, unlike HKs, K-hESCs showed only very low concentrations of HLA-ABC antigens, and no HLA-DR (figure 5, webappendix p 2).

K-hESCs could also be grown in a serum-free medium without feeder cells. In those conditions, cells showed no alteration in protein expression of keratins 5 and 14, and integrins α6 and β4. K-hESCs maintained in serum-free medium showed similar gene expression for *KRT5* and *KRT14* as those grown in FAD medium with feeder cells (webappendix p 5). Both cell types showed a high proliferative capacity tested up to 40 (H9) and 60 (SA-01) population doublings.

K-hESCs derived from H9 and SA01 lines were similar to HKs not only phenotypically but also in functional terms: reconstituted epidermis could be generated in vitro on an artificial matrix by use of classic techniques.[15] After 10 days of air-liquid differentiation, haematoxylin-eosin staining of cryosection of organotypic K-hESC

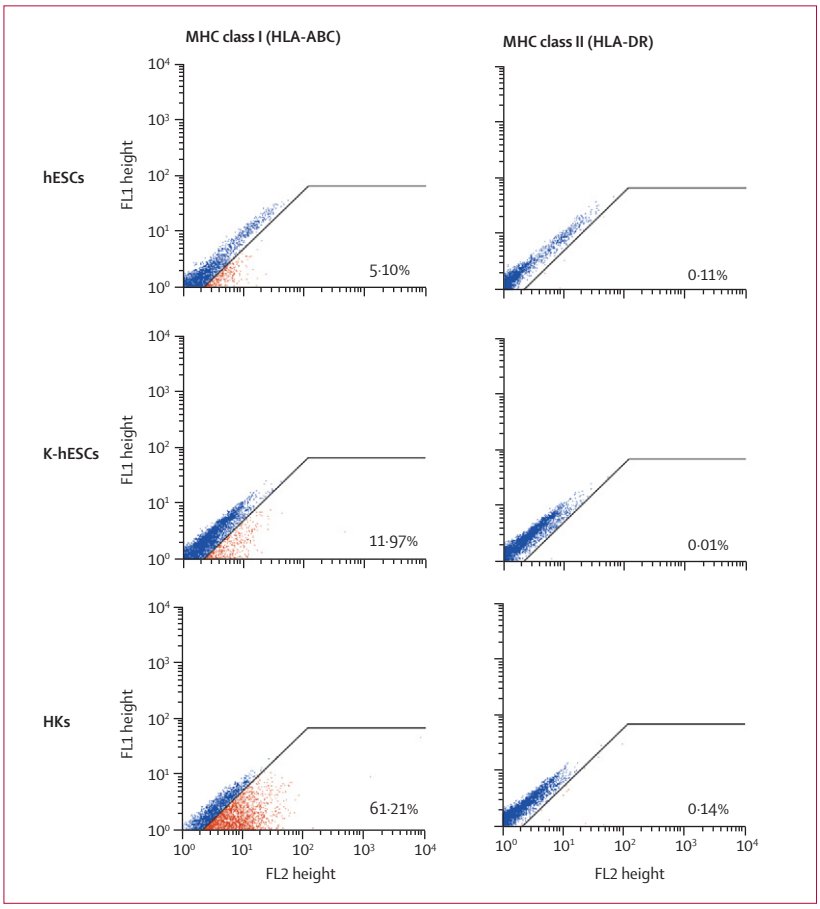


***Figure 5*: Expression of MHC class I (HLA-ABC) and class II (HLA-DR) antigens in hESCs, K-hESCs, and HKs (H9 cell line)**

FL1 and FL2 correspond to a relative fluorescence average in a specific channel depending on secondary antibody fluorochrome. For SA01 cell line see webappendix p 2. hESCs=human embryonic stem cells. K-hESCs=keratinocytes derived from hESCs. HK=human primary keratinocytes.

cultures showed a pluristratified epithelium, with a basal layer, stratum spinosum, stratum granulosum containing keratohyalin granules, and stratum corneum seen as superposed layers of dead squamous enucleated cells (figure 6). Differentiation markers were normally expressed and located in layers (figure 6, webappendix p 6). Keratin-14 immunostaining was seen in the basal compartment and not in the suprabasal layers. Reciprocally, keratin 10 was present only in layers overlying the basal layer. Involucrin and filaggrin, late markers of epidermal differentiation, were detected in the uppermost layers only. Appropriate labelling of proteins involved in cell adhesion was confirmed by the localisation of integrins α6 and β4 at the basal membrane of K-hESCs. Proteins of the basement membrane—laminin 5 and collagen VII—were also seen. PCR array with a panel of epidermal genes confirmed that HK and K-hESC organotypic epidermis had very similar patterns of expression (webappendix p 6).

The capability of K-hESCs to generate self-renewing epithelia was assessed through a stringent in-vivo test. K-hESCs were seeded onto fibrin matrix containing adult human fibroblasts to obtain a confluent epidermal layer in vitro. These organotypic cultures were then grafted onto the dorsal region of five immunodeficient nu/nu mice by orthotopical grafting.[16] After 12 weeks, K-hESC-derived epidermis showed a pluristratified structure, consistent with that of mature native human skin (figure 7 and webappendix p 7). Human involucrin was appropriately located in spinous and granular layers and few Ki67-positive cells were detected in the basal layer (figure 7).

Discussion

We have shown that keratinocytes can be derived from hESCs. K-hESCs can form a pluristratifed epithelium that resembles normal human epidermis in vitro and following grafting in vivo. To obtain these findings, we used a protocol that combined co-culture of hESCs with particular feeder cells and pharmacological treatment over 40 days. Growing human epidermis from hESCs could have clinical relevance as an unlimited resource for temporary skin replacement in patients with large burns awaiting autologous grafts.

Our findings extend previously published results showing acquisition in vitro of phenotypic keratinocyte characteristics by hESC derivatives. Specification of the keratinocyte lineage from hESCs was first shown with a differentiation protocol based upon embryoid bodies, but the proliferative potential of the cells was too low for subsequent tissue development.[11] This protocol has since been avoided. In the absence of direct differentiation of hESCs by use of the pharmacological protocol that they had successfully applied on mouse embryonic stem cells,[10] Medawar and colleagues[20] engineered cells to express p63, a protein that drives keratinocyte differentiation during ontogenesis.[17–19] Expression of p63 is, however, probably not sufficient by itself to induce full functional maturation of keratinocytes because these cells did not enable epidermis reconstruction.[13]

A fairly pure population of keratinocytes was recently obtained from hESCs under defined conditions in two-dimensional culture,[14] although again with no demonstration of reconstruction of a pluristratified epidermis. As with our protocol, this protocol relied on induction by use of BMP4, but differed in that retinoic acid was added instead of ascorbic acid. In most cases, the time schedule of induction was only 6 days instead of 40 days. BMP4 inhibits neural induction and maintains epithelial commitment,[21] which makes it a good candidate for stimulating hESCs along the epidermal lineages during the first steps of the differentiation protocol. How and whether it might act later on in the process is not known. Ascorbic acid was specifically added in our protocol because it stimulates full keratinocyte differentiation in the absence of retinoic acid.[22,23] Our protocol involved the continuous

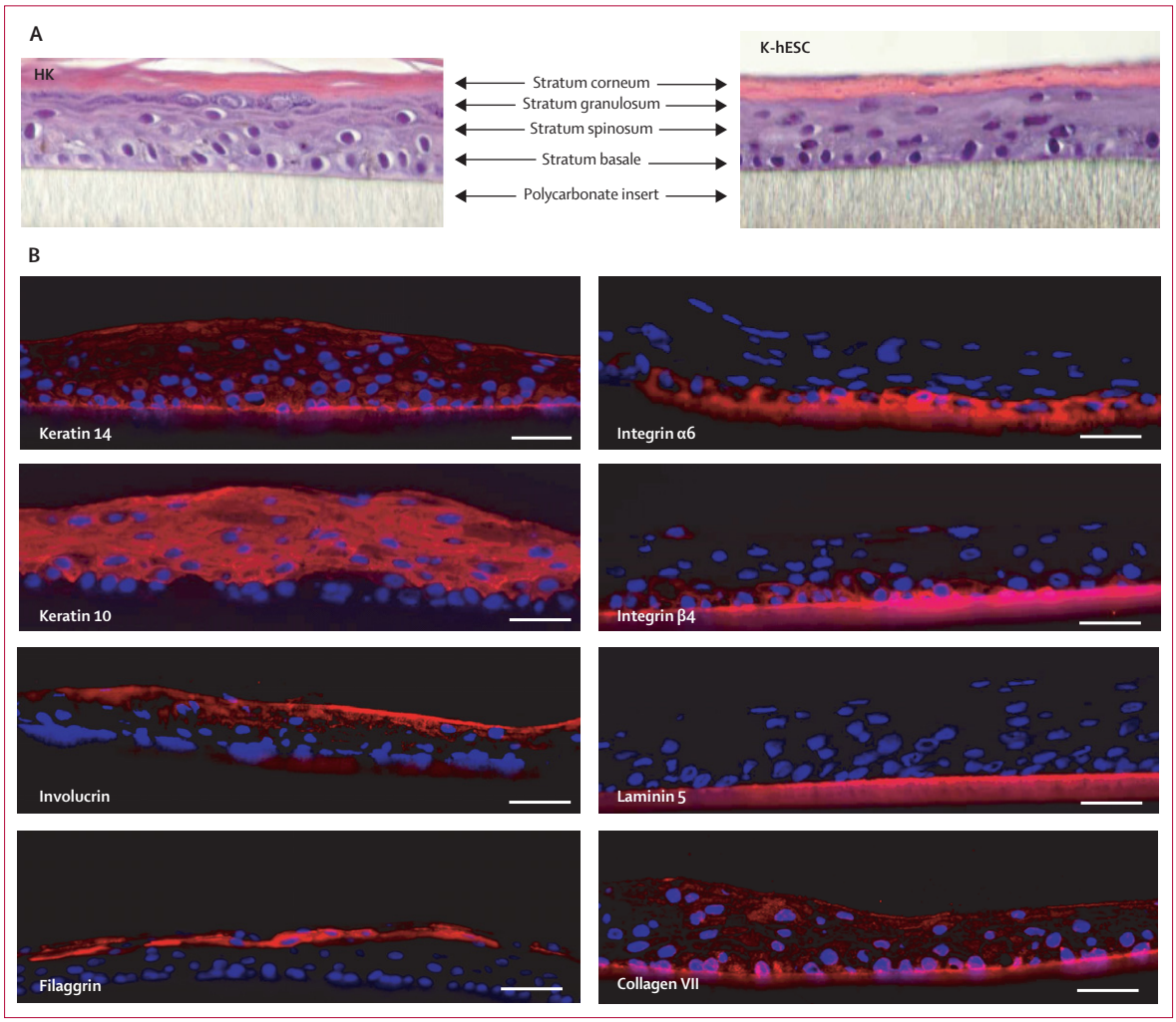


***Figure 6*: Reconstruction of a pluristratified epidermis with K-hESCs (SA01 cell line)**
(A) Haematoxylin-eosin staining of organotypic cultures of human primary keratinocytes (HKs) and keratinocytes derived from human embryonic stem cells (K-hESCs). (B) Immunofluorescence analysis of the expression and localisation of keratin 14, keratin 10, involucrin, filaggrin, integrin α6, integrin β4, laminin 5, and collagen VII in the K-hESC organotypic epidermis. Scale bar is 50 μm.

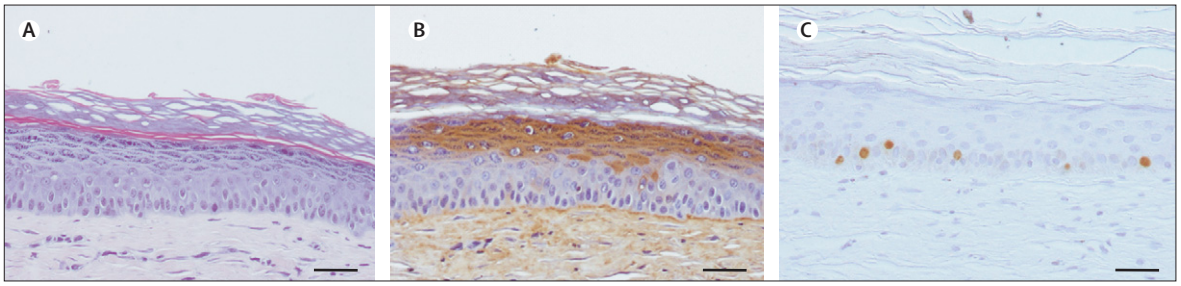


***Figure 7*: Long-term in-vivo human epidermal regeneration following xenografting to immunodeficient mice (H9 cell line)**
(A) Haematoxylin-eosin staining of artificial skin implants grafted in mice with keratinocytes derived from human embryonic stem cells (K-hESCs). Scale bar is 50 μm. (B) Immunoperoxidase staining with mAb SY-5 directed against human involucrin on artificial skin implants grafted with K-hESCs. Note its appropriate location in spinous and granular layers. Scale bar is 50 μm. (C) Immunoperoxidase staining for Ki67 on artificial skin implants grafted with K-hESCs. Scale bar is 50 μm.

application of the pharmacological treatment until full differentiation of basal keratinocytes (40 days), whereas other investigators used much shorter induction times. This time schedule is in keeping with the chronobiological processes of epidermis formation during embryonic development.

Cell therapy for large burns makes use of autologous epidermis reconstructed in vitro. However, during the

3-week delay for culture of the patient's own keratinocytes for autograft, allografts, which are in most cases obtained from cadaver skin, are used as a temporary cover for full thickness burns. To keep disease transmission to a minimum, the cadaver skin is decellularised and cryopreserved,[24] but this does not prevent rejection.[25] Access to cadaver skin is also a major concern, since this resource has limited availability.[26] There are other clinically useful, semisynthetic products composed of bovine collagen, allogenic fibroblasts, or keratinocytes that can establish a basement membrane, allowing the reconstruction of the dermal–epidermal junction. However, these biosynthetic substitutes are less protective than cadaver skin for large burns and can also induce rapid immune rejection since they contain adult donor cells.[27]

The epidermis reconstructed by K-hESCs could meet some criteria of a complementary skin substitute. Combination protocols involving dermis and epidermis replacement might be considered and analysed. Accessibility should not be a problem because of the full in-vitro preparation of the epidermis from immortal cell lines. Furthermore, the differentiated K-hESCs can support a large number of subcultures, opening for further expansion. Infectious risks could be constrained by industrialisation of the production process. K-hESCs also produce and release components needed to form an epidermal–dermal junction. Finally, because of their early developmental stage, K-hESCs express little antigen, if any of the MHC, suggesting a low immunogenicity of the skin substitute during the 3-week period of use in patients. As recently reviewed,[28] progression of such an hESC-derived cell therapy product requires several steps be taken to ensure (1) the quality of the product, produced in Good Manufacturing Practice conditions at all stages starting from derivation, (2) its consistency and genomic stability, and (3) its safety, in particular, the absence of any tumorigenic capacity. Since these issues are common to all uses of hESC-derived cell therapy products, the first clinical trial of such a product, being undertaken by Geron (Menlo Park, CA, USA), will likely set the ground for others.[9]

Whether this 3-week period can eventually be extended, and K-hESCs used for permanent allografts when no autologous graft is possible—eg, for patients with genodermatoses—needs further investigation. Normal maturation of K-hESCs should eventually be accompanied by expression of a full set of MHC antigens. Notably, skin cells obtained from aborted fetuses, which also express very low levels of MHC class I antigens, were successfully used for long-term treatment and showed no sign of rejection up to 21 months.[29] K-hESC allografts might also benefit from banks containing cell lines with appropriately selected haplotypes from rare donors that are triple homozygous for HLA-A, HLA-B, and HLA-DR. Less than 100 cell lines would then be sufficient to cover 90% of the Japanese population,[30] with ten lines covering about 50% of people in the UK.[31]

Contributors

GW was principal investigator of the project. CB coordinated the experiments. HG designed the protocol of differentiation to obtain K-hESCs. XN, JF, GL, MS, and CB isolated and characterised the K-hESC populations. XN undertook molecular characterisation of the K-hESC differentiation process and statistical analyses. JF undertook the FACS analyses. MS and CB did the immunocytochemistry. CCB and F-XB undertook organotypic cultures in vitro. MDR and FL did the in-vivo studies. CB, HG, GL, and MP prepared the manuscript. All authors saw and approved the final version of the manuscript.

Conflicts of interest

We declare that we have no conflicts of interest.

Acknowledgments

We thank G Meneguzzi and L Gagnoux for providing biological resources, M Martin for constant support, and C Hechard for managing partnerships of this project. This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), University Evry Val d'Essonne (UEVE), Association Française contre les Myopathies (AFM), Fondation René Touraine, and Genopole.

References

1 Gallico GG, O'Connor NE, Compton CC, Kehinde O, Green H. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N Engl J Med* 1984; **311:** 448–51.

2 Metcalfe AD, Ferguson MW. Bioengineering skin using mechanisms of regeneration and repair. *Biomaterials* 2007; **28:** 5100–13.

3 Alsbjorn B. In search of an ideal skin substitute. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1984; **18:** 127–33.

4 Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 2001; **19:** 193–204.

5 Perrier AL, Tabar V, Barberi T, et al. Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101:** 12543–58.

6 Aubry L, Bugi A, Lefort N, Rousseau F, Peschanski M, Perrier AL. Striatal progenitors derived from human ES cells mature into DARPP32 neurons in vitro and in quinolinic acid-lesioned rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **5:** 16707–12.

7 Baetge EE. Production of beta-cells from human embryonic stem cells. *Diabetes Obes Metab* 2008; **10** (suppl 4)**:** 186–94.

8 Tomescot A, Leschik J, Bellamy V, et al. Differentiation in vivo of cardiac committed human embryonic stem cells in postmyocardial infarcted rats. *Stem Cells* 2007; **25:** 2200–05.

9 Geron. Geron receives FDA clearance to begin world's first human clinical trial of embryonic stem cell-based therapy. http://www.geron.com/media/pressview.aspx?id=1148 (accessed Sept 29, 2009).

10 Coraux C, Hilmi C, Rouleau M, et al. Reconstituted skin from murine embryonic stem cells. *Curr Biol* 2003; **13:** 849–53.

11 Iuchi S, Dabelsteen S, Easley K, Rheinwald JG, Green H. Immortalized keratinocyte lines derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103:** 1792–97.

12 Green H, Easley K, Iuchi S. Marker succession during the development of keratinocytes from cultured human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100:** 15625–30.

13 Aberdam D. Epidermal stem cell fate: what can we learn from embryonic stem cells? *Cell Tissue Res* 2008; **331:** 103–37.

14 Metallo CM, Ji L, de Pablo JJ, Palecek SP. Retinoic acid and bone morphogenetic protein signaling synergize to efficiently direct epithelial differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 2008; **26:** 372–80.

15 Poumay Y, Dupont F, Marcoux S, Leclercq-Smekens M, Herin M, Coquette A. A simple reconstructed human epidermis: preparation of the culture model and utilization in in vitro studies. *Arch Dermatol Res* 2004; **296:** 203–11.

16 Del Rio M, Larcher F, Serrano F, et al. A preclinical model for the analysis of genetically modified human skin in vivo. *Hum Gene Ther* 2002; **13:** 959–68.

17 Byrne C, Tainsky M, Fuchs E. Programming gene expression in developing epidermis. *Development* 1994; **120:** 2369–83.

18 Fuchs E. Epidermal differentiation and keratin gene expression. *J Cell Sci Suppl* 1993; **17:** 197–208.

19 Turksen K, Troy TC. Epidermal cell lineage. *Biochem Cell Biol* 1998; **76:** 889–98.

20 Medawar A, Virolle T, Rostagno P, et al. DeltaNp63 is essential for epidermal commitment of embryonic stem cells. *PLoS ONE* 2008; **3:** e3441.

21 Stottmann RW, Berrong M, Matta K, Choi M, Klingensmith J. The BMP antagonist Noggin promotes cranial and spinal neurulation by distinct mechanisms. *Dev Biol* 2006; **295:** 647–63.

22 Bamberger C, Pollet D, Schmale H. Retinoic acid inhibits downregulation of DeltaNp63alpha expression during terminal differentiation of human primary keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2002; **118:** 133–38.

23 Catani MV, Savini I, Rossi A, Melino G, Avigliano L. Biological role of vitamin C in keratinocytes. *Nutr Rev* 2005; **63:** 81–90.

24 Blome-Eberwein S, Jester A, Kuentscher M, Raff T, Germann G, Pelzer M. Clinical practice of glycerol preserved allograft skin coverage. *Burns* 2002; **28** (suppl 1)**:** S10–12.

25 Burd A, Chiu T. Allogenic skin in the treatment of burns. *Clin Dermatol* 2005; **23:** 376–87.

26 Metcalfe AD, Ferguson MW. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. *J R Soc Interface* 2007; **4:** 413–37.

27 Kearney JN. Clinical evaluation of skin substitutes. *Burns* 2001; **27:** 545–51.

28 Carpenter MK, Frey-Vasconcells J, Rao MS. Developing safe therapies from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2009; **2:** 606–13.

29 Hohlfeld J, de Buys Roessingh A, Hirt-Burri N, et al. Tissue engineered fetal skin constructs for paediatric burns. *Lancet* 2005; **366:** 840–42.

30 Nakatsuji N, Nakajima F, Tokunaga K. HLA-haplotype banking and iPS cells. *Nat Biotechnol* 2008; **26:** 739–40.

31 Taylor CJ, Bolton EM, Pocock S, Sharples LD, Pedersen RA, Bradley JA. Banking on human embryonic stem cells: estimating the number of donor cell lines needed for HLA matching. *Lancet* 2005; **366:** 2019–25.

THE LANCET

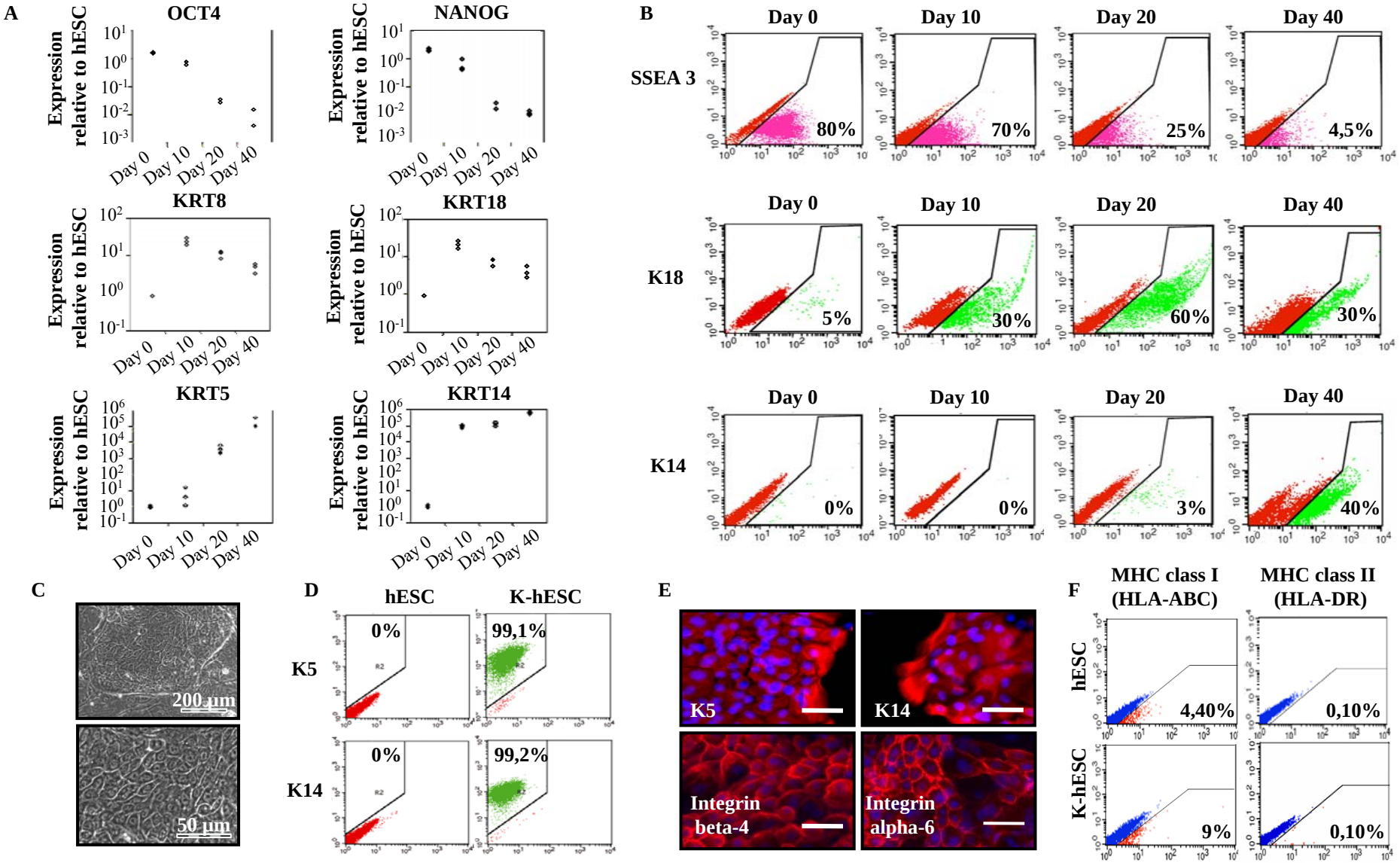
Supplementary webappendix

This webappendix formed part of the original submission and has been peer reviewed. We post it as supplied by the authors.

Supplement to: Guenou H, Nissan X, Larcher F, et al. Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study. *Lancet* 2009; **374:** 1745–53.

Gene Name	Ref	Amplicon length (bp)	Forward primer	Reverse primer
18S	NM_022551.2	146	GAGGATGAGGTGGAACGTGT	TCTTCAGTCGCTCCAGGTCT
NANOG	NM_024865.2	158	CAAAGGCAAACAACCCACTT	TCTGCTGGAGGCTGAGGTAT
OCT4	NM_002701.4	169	CTTGCTGCAGAAGTGGGTGGAGGAA	CTGCAGTGTGGGTTTCGGGCA
KRT18	NM_199187.1	129	GAGTATGAGGCCCTGCTGAACATCA	GCGGGTGGTGGTCTTTTGGAT
KRT8	NM_002273	69	GATCGCCACCTACAGGAAGCT	ACTCATGTTCTGCATCCCAGACT
KRT14	NM_000526.3	79	GGCCTGCTGAGATCAAAGACTAC	CACTGTGGCTGTGAGAATCTTGTT
KRT5	NM_000424.3	74	ATCTCTGAGATGAACCGGATGATC	CAGATTGGCGCACTGTTTCTT
LAMB3	NM_000228.2	241	GACAGGACTGGAGAAGCGTGTG	CCATTGGCTCAGGCTCAGCT
COL7A1	NM_000094.3	198	GATGACCCACGGACAGAGTT	ACTTCCCGTCTGTGATCAGG
ITGA6	NM_000210.2	112	GCTGGTTATAATCCTTCAATATCAATTGT	TTGGGCTCAGAACCTTGGTTT
ITGB4	NM_000213.3	220	CTGTACCCGTATTGCGACT	AGGCCATAGCAGACCTCGTA

Appendix 1: Table 1: sequence of primers



Appendix 2: Establishment and characterization of a keratinocyte lineage derived from hESC (SA-01)

(A) Quantitative PCR analysis of OCT4/NANOG, KRT8/KRT18, KRT5/KRT14 in cells during the 40 days of differentiation. Data are presented with scatter plots for 3 independent experiments.

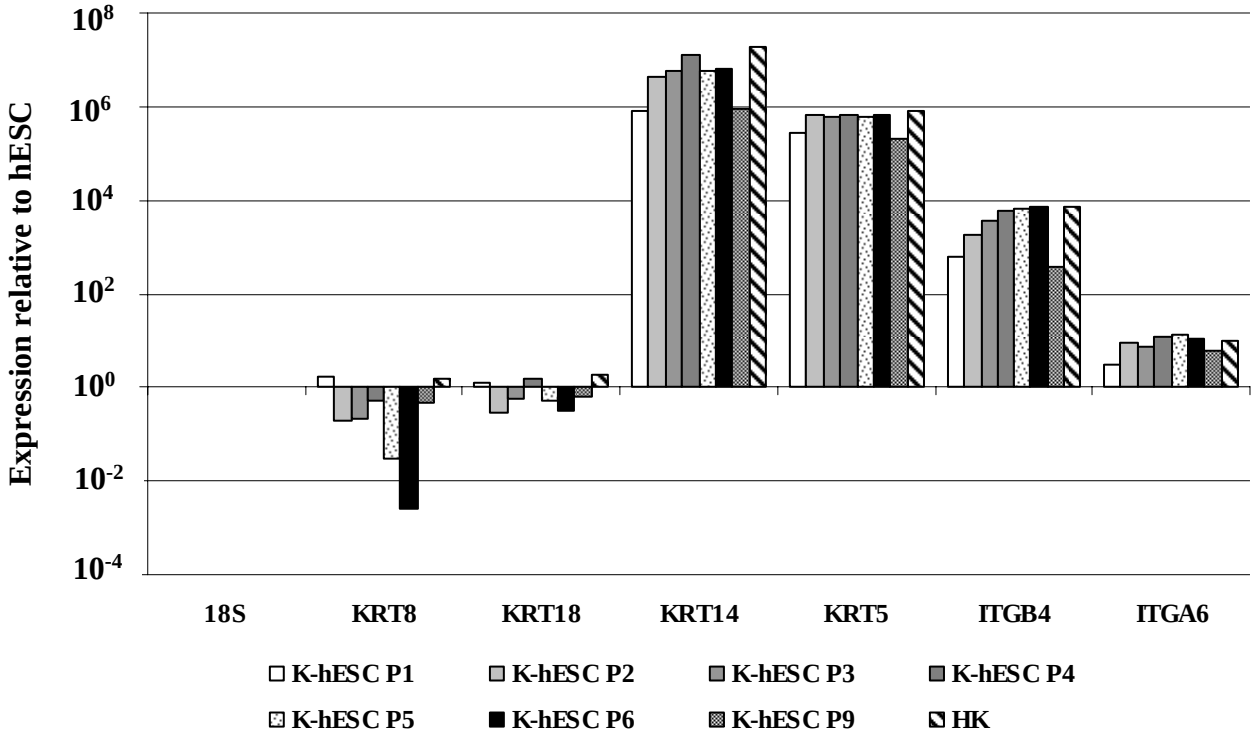
(B) Representative FACS analysis of SSEA3, keratins 18 and 14 (K18, K14) during the 40 days of differentiation.

(C) Microscopy analysis of human primary keratinocytes K-hESC.

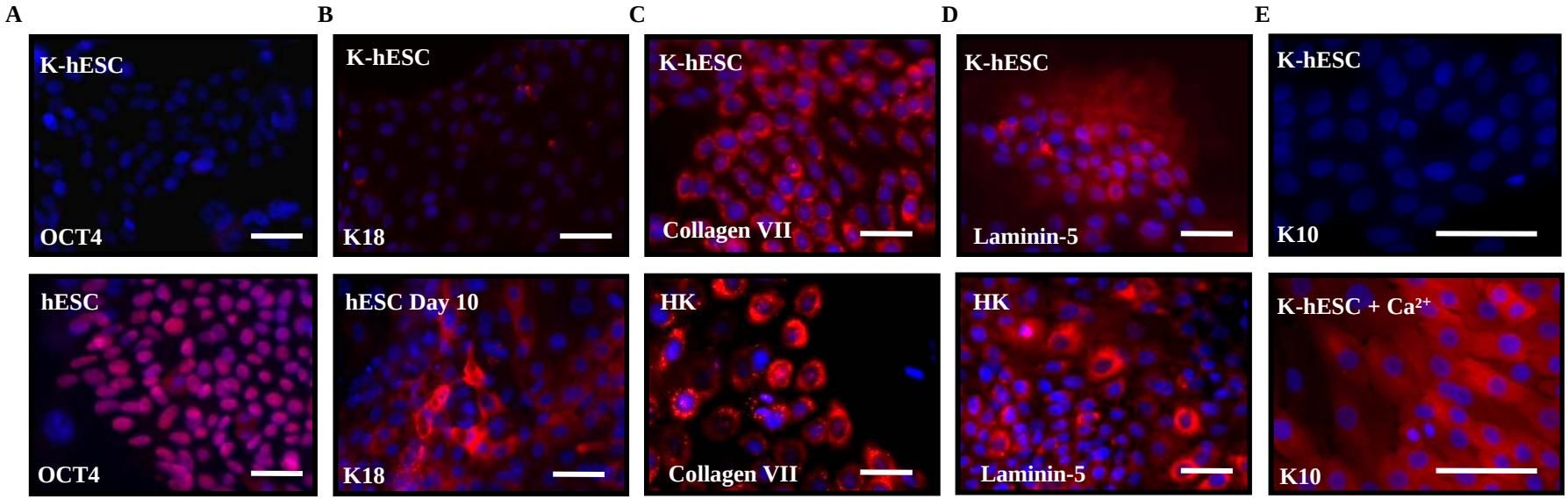
(D) Representative FACS analysis of keratins 5 and 14 (K5, K14) in h ESC and K-hESC.

(E) Immunofluorescence of K5, K14, integrins alpha-6 and beta-4 in K-hESC. Scale bar is 20 µm.

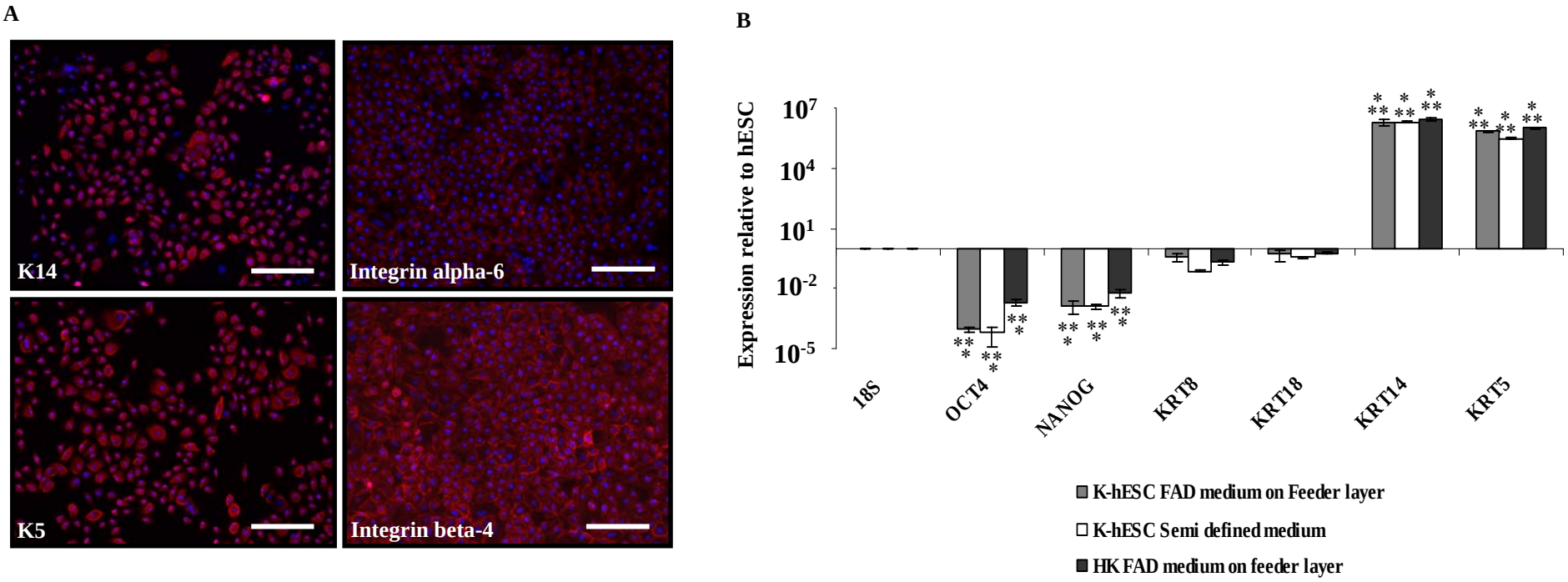
(F) Representative FACS analysis of MHC class I (HLA-ABC) and class II (HLA-DR) antigens in hESC and K-hESC.



Appendix 3: Stable phenotype of K-hESC up to nine passages (SA-01).
Representative quantitative PCR analysis of KRT5, KRT14, ITGA6 and ITGB4 in K-hESC at successive passages, up to 9.

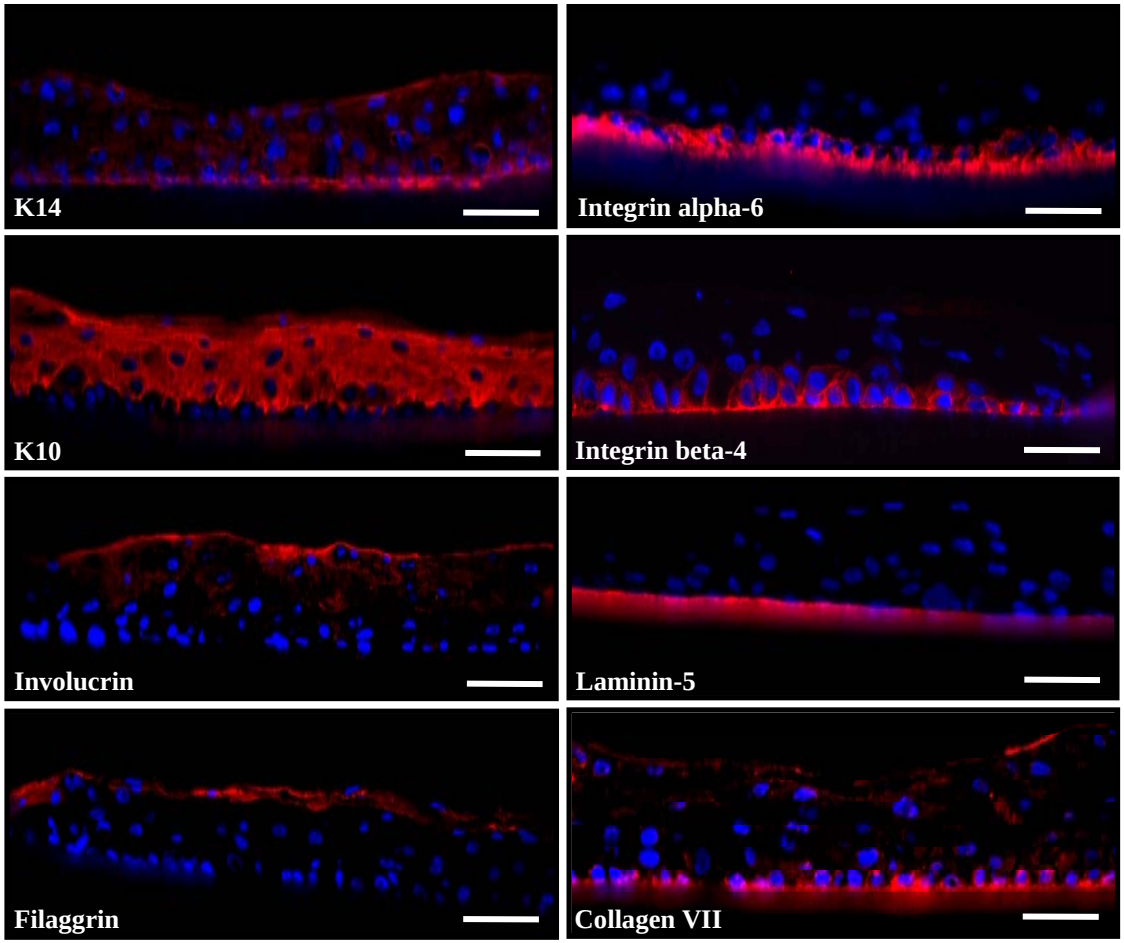


Appendix 4: Characterization of a homogenous population of keratinocytes derived from hESC (H9).
Immunofluorescence analysis using:
(A) Oct4 staining in K-hESC and undifferentiated hESC.
(B) K18 staining in K-hESC and hESC differentiated for 10 days.
(C) Collagen VII staining in K-hESC and HK.
(D) Laminin 5 staining in K-hESC and HK.
(E) K10 staining in K-hESC and in K-hESC stimulated by calcium.
Scale bar is 20µm

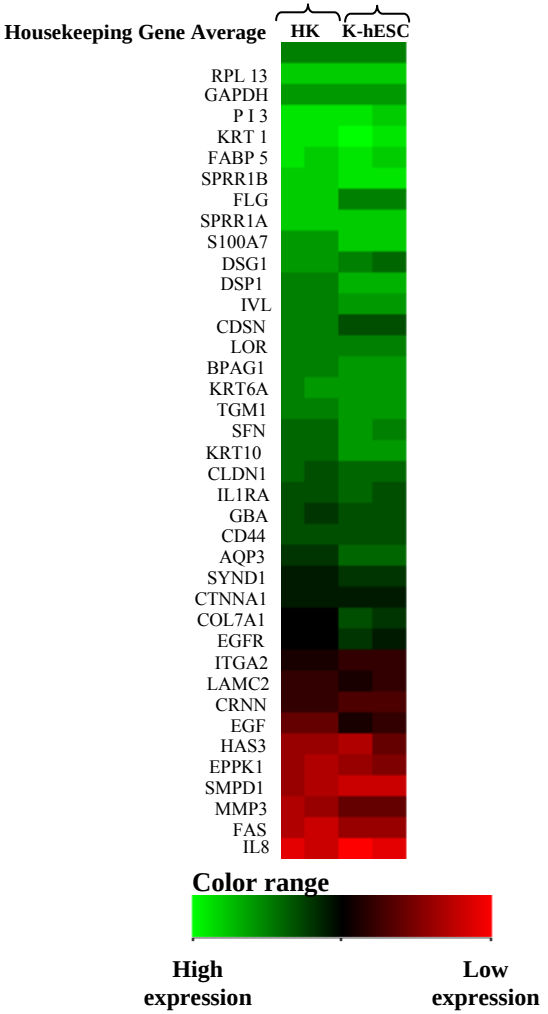


Appendix 5: Homogenous profile of K-hESC in semi-defined serum-free medium.
(A) Immunofluorescence showing expression of keratins 5, 14 and integrins alpha-6 and beta-4 in K-hESC derived from SA-01 growing without feeders. Scale bar is 50µm.
(B) Expression of the transcripts of keratin 5 and 14 (KRT5 and KRT14) in K-hESC maintained either in semi-defined serum-free medium, or in FAD medium with feeder cells using Q-PCR. Data are presented as a mean ± SD of 3 independent experiments for each of the two cell lines H9 and SA-01, and analysed using a Wilcoxon non-parametric test, *** (p value ≤ 0,001).

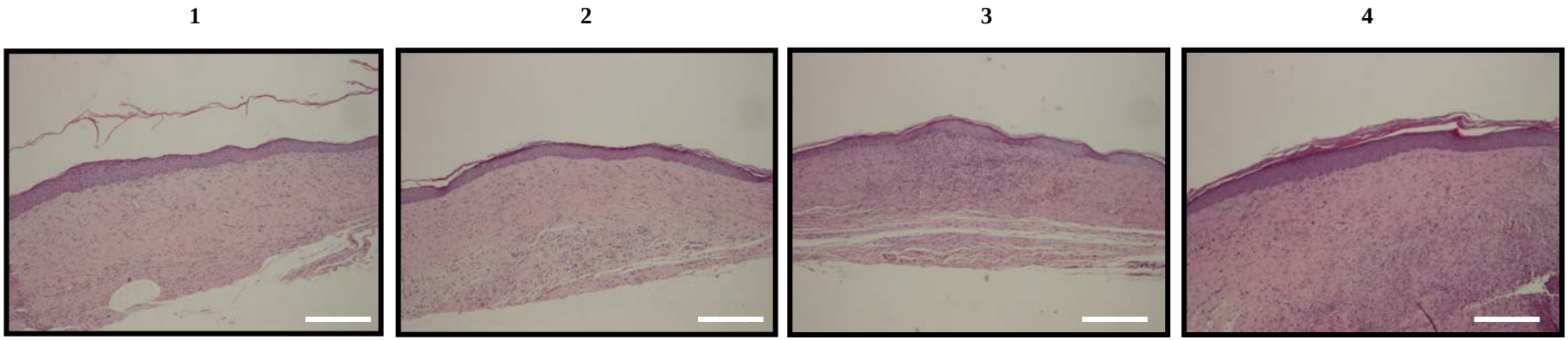
A



B



Appendix 6: Expression profile of epidermis markers in organotypic epidermis derived from HK and K-hESC.
(A) Control immunofluorescence (HK) showing the distribution of keratin 14, integrins alpha-6, beta-4 in the basal layer, keratin 10 in all differentiated layers, involucrin and filaggrin exclusively in the upper most layers, and laminin-5 and collagen VII at the dermal-epidermal junction. Scale bar is 50µm.
(B) PCR Array on organotypic HK and K-hESC (SA-01) epidermis using a large panel of epidermis genes. Data were collected using home made keratinocyte focused primer Q-PCR arrays and heat map analysis performed on Array Assist software.



Appendix 7: Long-term *in vivo* human epidermal regeneration following xenografting to 4 immunodeficient mice (H9).
Haematoxylin-eosin staining of artificial skin implants grafted with K-hESC. Scale bar is 100mm.

II. Différenciation de cellules souches pluripotentes humaines en mélanocytes

Titre de l'article: Derivation of a pure and homogeneous population of melanocytes from pluripotent stem cells

Auteurs: Xavier Nissan, Lionel Larribere, Manoubia Saidani, Jessica Feteira, Gilles Lemaitre, Marc Peschanski, Christine Baldeschi.

Parallèlement à la mise au point d'un protocole d'induction kératinocytaire, nous avons cherché à définir les conditions expérimentales permettant la différenciation de cellules souches pluripotentes (hES et iPS) en une population pure et homogène de mélanocytes. A ce jour, deux équipes ont démontré possible la différenciation de cellules mES, celles du Dr Takahiro Kunisada (Yamane T et al., 1999) et du Dr Lionel Larue (Pla P et al., 2004) en mélanocytes, en mettant en avant le rôle majeur de l'endothéline 3 et la voie Wnt/β-caténine. La transposition de ce type de protocole aux cellules hES a été réalisée en 2006 par l'équipe du Dr Meenhard Herlyn qui démontra l'importance de la voie Wnt/β-caténine et plus particulièrement le Wnt3A dans ce processus de différenciation (Fang D et al., 2006). Bien que la spécificité et le rôle de ces facteurs dans le lignage mélanocytaire aient préalablement été décrit *in vivo*, (pour revue Uong A et al., 2010) ces différentes études ont toutes nécessité la formation de corps embryoides pour induire les premières étapes de la différenciation. Le projet sur lequel j'ai travaillé repose sur l'engagement des cellules souches pluripotentes dans le lignage ectodermique induit par la BMP4 (Guenou et al., 2009). Nous avons ainsi démontré que ce traitement à la BMP4 permettait l'engagement dans le lignage mélanocytaire d'une fraction de cette population cellulaire d'origine ectodermique. Une fois ces cellules isolées, nos travaux ont consisté à caractériser ces cellules autant d'un point de vue morphologique que phénotypique jusqu'à la démonstration que ces cellules étaient capables de produire de la mélanine et de la transférer à des kératinocytes *in vitro*. Les résultats de cette étude ont donné lieu à un dépôt de brevet (Annexe 1) et à une publication en cours de soumission.

A. Engagement des cellules hES dans le lignage mélanocytaire

Dans cette étude, nous avons travaillé sur des cellules souches pluripotentes humaines d'origine embryonnaire ou reprogrammées à partir de fibroblastes selon la méthode décrite par Shinya Yamanaka (Takahashi K and Yamanaka *S*, 2006). Dans un premier temps, les cellules hES et iPS ont été placées dans les mêmes conditions que préalablement décrites pour induire leur engagement dans le lignage épithélial (Guenou et al., 2009). En effet, dans cette précédente étude nous avions démontré, qu'après 40 jours de différenciation, seule 60% des cellules avaient été engagées dans le lignage kératinocytaire, les 40% restant étant d'origine ectodermique mais de phénotypes indéterminés. Au delà des 40 jours de différenciation nous

avons observé qu'une partie des cellules non kératinocytaires dérivées de cellules hES et iPS présentaient un phénotype pigmenté qui augmentait avec le temps (Figure 1A et Sup1). Partant de l'hypothèse que ces cellules pouvaient être soit des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (RPE) soit des progéniteurs mélanocytaire, les profils d'expression de ces cellules ont été étudiés par PCR quantitative. Ainsi, l'analyse de cette étude révèle que ces cellules pigmentées expriment à la fois les gènes impliqués dans la mélanogénèse (TRP1, Tyrosinase) mais également les marqueurs caractéristiques des cellules dérivées de la crête neurale (PAX3 et SOX10) et des cellules dérivées du tube neural (PAX6) (Figure 1B et Sup4A). Ces marqueurs ne pouvant être simultanément exprimés par les mêmes cellules, ces données suggèrent la présence d'un lignage cellulaire rétiniens et d'un lignage mélanocytaire. Dans le but d'isoler des mélanocytes de ce mélange cellulaire, les cellules pigmentées ont été placées dans un milieu permettant la survie et la culture des mélanocytes humains (Milieu 254CF, Invitrogene). Au cours de la première remise en culture, deux types cellulaires présentant des morphologies très différentes ont clairement pu être identifiés. La première (et majoritaire) est une population de cellules cuboïdales (Sup 2A) exprimant la protéine RPE-65 (Sup 2C) mais également les marqueurs OTX2, Bestrophine et l'isoforme D de MITF (MITF-D), tous caractéristiques des cellules RPE. La seconde est une population de cellules dendritiques présentant, autant d'un point de vue morphologique que moléculaire, un phénotype similaire à des cultures primaires de mélanocytes adultes humains (HEM) (Figure 2). Les cellules présentant cette morphologie dendritique et ce profil d'expression mélanocytaire ont respectivement été nommées mel-hESC (mélanocytes dérivées de cellules hES) et mel-iPSC (mélanocytes dérivées de cellules iPS).

B. Caractérisation moléculaires des mélanocytes dérivés de hES (mel-hESC) et de cellules iPS (mel-iPSC)

Dans un deuxième temps, ces mélanocytes dérivés de cellules souches pluripotentes différenciées avec ce protocole d'induction ont été caractérisées. Cette population cellulaire présente une morphologie similaire à des mélanocytes adultes humains (Figure 2A et Sup 4B) et exprime également le même niveau d'expression des gènes codant pour les enzymes impliqués dans la mélanogénèse (TRP1 et Tyrosinase) mais également l'isoforme M de MITF (MITF-M), spécifique des mélanocytes. A l'inverse nous avons démontré que ces cellules n'exprimaient pas les marqueurs de la pluripotence (OCT4, NANOG, SOX2 et TRA1-81) neuraux (PAX6) et rétiniens (OTX2, MITF-D) (Figure 2B, et Sup 4C). L'analyse immunocytochimique de ces cultures cellulaires confirme l'ensemble de ces données en révélant par ailleurs les localisations nucléaires de Mitf et cytoplasmiques des protéines Trp1 et Tyrosinase (Figure 2C). Cette étude révèle également la présence au niveau des dendrites

des melanocytes de la protéine Rab27a, impliquée dans le transport des mélanosomes. L'analyse par FACS démontre par ailleurs que ces deux populations cellulaires présentent une homogénéité comparable à celle d'une culture primaire de melanocytes adultes humains puisque plus de 90% des mel-iPSC et mel hESC expriment la protéine Trp1 et plus de 80% la protéine Mitf (Figure 3 et Sup 4D). Nous avons également évalué les capacités prolifératives des mel-hESC et des mel-iPSC *in vitro* et observé que ces cellules pouvaient être cultivées au delà de 12 passages (soit environ 50 doublements) et cryoconservées sans modification de leur phénotype (Sup 3).

C. Caractérisation fonctionnelle des mélanocytes dérivés de hES (mel-hESC) et de cellules iPS (mel-iPSC)

Enfin la dernière partie de cette étude a consisté à démontrer les capacités fonctionnelles des mel-iPSC et des mel-hESC. Pour cela, des cocultures de ces mélanocytes dérivés de cellules souches pluripotentes avec des kératinocytes adultes ont été réalisées. Après 72h de coculture nous avons ainsi observé que plus de 20% des kératinocytes présentent un marquage Trp1 dans leur compartiment périnucléaire suggérant un transfert de melanosomes entre les types cellulaires (Figure 4A et Sup5A).

L'ensemble des résultats obtenus est présenté dans l'article qui suit.

D. Conclusion

Ce travail de recherche nous a permis de définir les conditions expérimentales permettant de dériver une population homogène de mélanocytes à partir de cellules souches pluripotentes sans passer par la formation de corps embryoides. Nous avons démontré que cette population cellulaire présentait une morphologie et un profil d'expression similaire à des mélanocytes adultes humains et que ces cellules étaient capables de produire de la mélanine. Finalement l'observation d'un marquage Trp1 dans les kératinocytes adultes placés en coculture avec ces mélanocytes nous a permis d'évaluer leur capacité à transférer leurs mélanosomes. Ces mélanocytes dérivés des cellules pluripotentes peuvent être maintenue en culture pendant 12 passages soit un nombre de passages équivalent à des cultures primaires de mélanocytes adultes humains et peuvent être cryoconservées en maintenant leurs phénotypes ouvrant la possibilité de créer une banque de cellules différenciées. Grace aux capacités de prolifération illimitées des cellules souches pluripotentes, un tel protocole de différenciation représente une source potentiellement inépuisable de mélanocytes à fort potentiel pour l'industrie et la recherche académique. En effet nous envisageons d'évaluer la possibilité d'utiliser ces cellules comme ressource biologique pour les études de criblages à haut début ou de

phototoxicologie autant dans un contexte normal que pathologique en utilisant des lignées porteuses de mutation entrainant des anomalies de la pigmentation. Par ailleurs partant du principe que de nombreux gènes impliqués dans le développement mélanocytaires le sont également dans la formation de mélanomes (pour revue Uong A et al., 2010), la mise en place d'un tel protocole d'induction *in vitro* ouvre de nouvelles perspectives de recherche pour l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la formation de ces formes grave, et souvent fatales, de cancer de la peau.

TITLE:
Establishment of a pure and homogeneous population of melanocytes from pluripotent stem cells

AUTHORS:
Xavier NISSAN [1], Lionel LARRIBERE [1], Manoubia SAIDANI [1], Jessica FETEIRA [2], Gilles LEMAITRE [2], Marc PESCHANSKI [2], Christine BALDESCHI [2*]

[1] CECS, I-STEM, AFM, Institute for Stem cell Therapy and Exploration of Monogenic diseases, 5 rue Henri Desbruères, 91030 Evry cedex, France

[2] INSERM/UEVE U-861, I-STEM, AFM, Institute for Stem cell Therapy and Exploration of Monogenic diseases, 5 rue Henri Desbruères, 91030 Evry cedex, France

[*] To whom correspondence should be addressed. Email: cbaldeschi@istem.fr

ACKNOWLEDGEMENTS:
We thank Cecile Denis, Mathilde Girrard, Michel Cailleret and Yacine Laabi for providing biological resources, Yves Maury for technical support on ArrayScan platform, Christine Varela and Nathalie Lefort for cytogenetic expertise. This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), University Evry Val d'Essonne (UEVE), Association Française contre les Myopathies (AFM) and Genopole.

INTRODUCTION

Melanocytes are pigment-producing cells responsible for coloration of skin, eyes, and hair. In vertebrate development, melanocytes originate from the neural crest and undergo a complex process of fate-specification, proliferation, migration, survival, and differentiation before finally residing in the epidermis. Pigmentation is achieved by the highly regulated manufacture of the melanin pigment in specialized organelles called melanosomes. Through this process called melanogenesis, melanosomes are transported along the dendrites and transferred to growing hair, or surrounding keratinocytes to play a critical role in protecting human skin from the deleterious effects of sun's light ultraviolet (UV) radiations that cause DNA damages and skin cancer. Over the past 10 years, several genes have been associated with pigmentary disorders involving melanocytes. Those disorders can be classified in 3 types. First, diseases affecting the development of melanocytes from the neural crest (piebaldism, Waardenburg syndrome and dyschromatosis symmetrica hereditaria), second, diseases with defects in melanin synthesis (albinism) and third, disorders of melanosome maturation or transfer (Hermansky-Pudlak syndrome, Chediak-Higashi syndrome and Griscelli syndrome). Interestingly, although a lot of efforts have been made to better understand about the function and regulation of mature melanocytes, very little is known with regard to the molecular and cellular mechanisms involved in melanocyte development and differentiation from embryonic precursors in the Human.

Transformation of somatic cells with a set of embryonic transcription factors produces cells with the pluripotent properties of embryonic stem cells (hESCs). These induced pluripotent stem (hiPSCs) cells have the potential to differentiate into any cell type, making them a potential source from which to produce cells as a therapeutic platform for the treatment of a wide range of diseases. As a proof of concept of the therapeutic benefits of those cells, Hanna et al. demonstrated that hiPSCs-derived bone marrow cells could reverse the sickle cell anemia phenotype in a suitable humanized mouse model. Induction of melanocytes in vitro was first reported by Yamane et al (1999), who cocultured mouse Es cells on monolayers of the stromal cell line ST2 during 21 days in medium containing SCF, EDN3, TPA and dexamethasone. More recently Herlyn laboratory (fang et al , 2006) have shown that melanocytes can be derived from hEScCs using human embryoid bodies in the absence of feeder cells using a combination of Wnt3a, endothelin-3 and SCF.

In this report, we showed that iPS reprogramming cells are able to generate pure and functional populations of melanocytes from hiPSC and hESC. These cells were obtained following a directed 2D protocol of epidermal induction on feeder cells in a FAD medium, supplemented with BMP4 and ascorbic acid. These melanocytes derived from pluripotent stem cells express all major markers of melanocytes, develop melanosomes and synthesize melanin capable to migrate into keratinocytes

RESULTS

Establishment of a melanocytic lineage

Previously we developed a protocol from hESC that respected the chronobiology of epidermis formation during human ontogenesis to generate a homogenous population of cells exhibiting all phenotypic characteristics of basal keratinocytes (Guenou et al).In this process at 40 days of differentiation only 60 % of the cells are keratinocytes (Guenou et al) allowing the establishment of others ectormal derived cell types. .iPS reprogramming cells using Thomsom and Yamanaka factors (IMR90 and PolyF) and undifferentiated hESC (SA-01 and H9) and were seeded on mitomycin-treated 3T3 feeder cells in FAD medium, supplemented with BMP4 (0.5 nM) and ascorbic acid (0.3 nM) following the protocol of epidermal induction for more than 40 days.

Interestingly, a gradual pigmentation was detectable a few weeks later in the areas surrounding keratinocytes derived from iPSC and hESC (Sup Fig 1). To confirm that these pluripotent stem cells-derived pigmented populations contain cells committed to the melanocyte lineage, we performed a molecular characterization all along the differentiation process by quantitative PCR (qPCR). For this, expression profiles were analyzed in iPSC and hESC samples at different time points such as undifferentiated state (step A), before (step B) and after pigmentation (step C) and purified pigmented cells (step D) (Fig 1A). First, time course qPCR analysis demonstrated a decrease in the transcription of pluripotency gene markers OCT4, NANOG and SOX2 that rapidly reached an undetectable level, comparable to the one of human adult melanocytes (NHEM) (Fig 1B, sup fig2). Moreover, genes encoding for the regulators of melanin synthesis such as TRP1, TYROSINASE and MITF increased progressively during pigmented cells enrichment in culture (Fig 1D). Interestingly, in parallel of the increase of the levels of neural crest-derived cells markers, such as SOX10 and PAX3, and we also observed an increase of neural tube derived cells markers PAX6 (Fig 1C).

These datas suggest the formation of several pigmented phenotypes derived from the ectodermal layer including neural crest derived pigmented cells and neural tube derived pigmented cells.

Characterization of a homogenous and pure population of melanocytes derived from pluripotent stem cells.

After isolation and subculture of these pigmented cells, two different morphologies were clearly distinguishable. The first one presented a typical epithelial morphology similar to Retinal Pigmentary Epithelium (RPE) (Sup Fig 2A) and expressed all the characteristic markers of RPE cells such as OTX2, BEST, RPE-65 and MITF-D isoform in addition to genes controlling melanin synthesis such as TRP1 and TYR (Sup Fig 2B). In addition, we showed by immunostaining the expression of TRP1, RPE-65 and PAX6 proteins (Sup Fig 2C). The second pigmented population exhibited, after isolation and two passages, a morphology similar to human adult melanocytes (HEM) (Fig 3A) which was clearly distinguishable from the first one. These cells were named mel-iPSC for melanocytes derived from iPSC. qPCR analysis of mel-iPSC showed that expression of key genes involved in melanocyte's biology as SOX10, PAX3, MITF-M isoform, TRP1 and TYR pointed similar expression patterns to HEM (Fig. 3B). Indeed we observed a decrease in the expression of all genes characteristic of pluripotency and self renewal (OCT4, NANOG, SOX2) or in the expression of PAX6 and OTX2, confirming that this pigmented cell population was not RPE. Immunostaining analysis confirmed the absence of OCT4, TRA1-81 and PAX6 expression in the mel-iPSC nucleus as well as a correct nuclear localization of PAX3 and MITF and a cytoplasmic expression of TRP1, TYROSINASE (TYR) and Rab27 (Fig 3C).

Furthermore, FACS analysis after four passages revealed an absence of SSEA4 and TRA1-81 expression in mel-iPSC compared to the control undifferentiated mel-iPS. This analysis also showed that more than 80% of mel-iPSC were TRP1 and MITF positives just like the control culture of adult melanocytes (Fig. 4).

Under those culture conditions, cells proliferated actively up to twelve passages and could be frozen and thawed at will, maintaining their morphology (Sup Fig 3A) and their phenotype (Sup Fig 3B) .

In parallel, we were able to reproduce the same results starting from hESC, and we showed a constant upregulation of melanocytes markers by qPCR during the process of pigmentation (Sup Fig 4A). The cell population we obtained was pure and had similar morphology to HEM (Sup Fig 4B). In a same manner, we showed a conservation of the expression profile of undifferentiation genes and pigmentation markers (Sup Fig 4C) and a conserved homogeneity of the cells by FACS analysis (Sup Fig D).

Melanocytes derived from pluripotent stem cells can produce and transfer melanosomes in keratinocytes

To demonstrate their ability to produce and secrete melanin, melanosome transfer was evaluated by coculturing mel-iPSC or HEM with human adult keratinocyte (HK). After three days of coculture, melanosome transfers were detected into keratinocytes by a coimmunostaining of the protein TRP1 (expressed at the melanosomal membrane) and the keratin 14 (specifically expressed in keratinocytes) (Fig 5A). Arrayscan analysis showed that melanosomes were detectable in 20% of keratinocytes cultivated with mel-iPSC and 45% with HEM, whereas no TRP1 staining was detectable in HK cultivated without melanocytes, (Fig 5A and 5B). Interestingly, after their transfer, melanosomes localization was in the peri-nuclear compartment of keratinocytes as it is expected to protect their DNA from ultraviolet radiations. Similar results were obtained with mel-hESC where 20% of melanized keratinocytes were detectable after three days of coculture (Sup Fig 5).

DISCUSSION

The main result of this study is the generation of functional cell lines of melanocytes derived from pluripotent stem cells (iPSC and hESC) since they have the capacity to transfer melanosomes into keratinocytes *in vitro*.

In vitro modelling of human melanocytic development

Setting up new models of human development appear to be extremely important to explore yet unknown molecular mechanisms that control melanocyte differentiation. In vertebrates melanocytes are derived from a group of migratory embryonic cells referred to as the neural crest. Neural crest specification of primitive ectodermal cells is induted at least in part by BMP signaling pathway (Kanzier et al 200). Neural crest derivatives are extensive, indicating that the stem cells which emerge during embryogenesis are truely multipotent but undergo gradual lineage restriction (Erickson and Reedy 1998).

The molecular mechanisms and genetic pathways involved in melanocyte development have been described in mouse or chicken models through the studies of transgenic animals but almost nothing is known about those mechanisms in the Human. Thus it was demonstrated that Slug, EDNRB and ckit play a crucial role in the control of neural crest migration, melanoblast specification or migration respectively. Moreover, mice knock-out for any of those three genes present a partial

loss of melanocytes or a dilution of pigmentation in the skin and the fur, demonstrating their key involvement I nmelanocyte outcome (Wehrle-Haller, Cano et al., 2000, Weston, 1995 and Lee et al., 2003).

Moreover, it was also described in the mouse that MITF played a crucial role in melanoblast survival (Hornyak et al.,2001) through the increase of the anti-apoptotic gene bcl2 (McGill et al., 2002). Indeed, mice with mutations on MITF are white with red eyes (Hodgkinson 1993).

In 1999, a first model of melanocyte differentiation from mouse ES has been proposed to study these mechanisms in vitro (Kunisada et al., 1999). This work was done with ST2 stromal cells as feeders and required SCF, EDN3, TPA, and dexamethasone. In order the better understand those mechanisms in the Humans, Fang et al. proposed in 2006 a protocol to derivate melanocytes like cells from hESC through the formation of embryoid bodies stimulated by SCF, END3 and Wnt3a (Fang et al. 2006). Here we propose a protocol permitting to generate functional melanocytes from pluripotent stem cells (hIPSCs as well as hESCs) using a 2D directed differentiation method in FAD medium supplemented by BMP4 and cultivated on 3T3 feeder layer. We previously showed that this protocol allows 60% of cells to specifically differentiate into keratinocytes after 40 days of differentiation, whereas the other 40% were neither engaged in mesodemal nor endodermal lineages (Guenou et al 2009), suggesting the production of other ectodermal cells types. In the present work we identified that at least a part of these cells were engaged in the melanocytic lineage probably due to the intrinsic capacities of BMP4 to induce ectodermal differentiation and fibroblasts feeder cells to secrete crucial cytokines such as Wnt3a, SCF (Tianqing Li et al). Because of the strict respect of the human development chronobiology, we also hypothetize that other cells, from ectodermal origin and generated during this differentiation process, could participate to the maturation of melanocytes as it is the case during development. In fact it is already well established that keratinocytes presented the capacity to produce alpha MSH in the epidermis under UV exposure and thus can regulate MITF expression via a paracrine way (Hearing review 2005)

iPSC-derived melanocytes as a new tool for pigmentation disorder therapy

Disorders of pigmentation were among the first genetic diseases ever recognized because of their visually striking clinical phenotypes, resulting from defects of pigmentary melanocytes. Lots of progresses have been made in understanding these

diseases, largely as a result of the systematic parallel study of human patients and inbred mice with similar phenotypes. However mouse models are always limited by the anatomical differences of the skin between mice and humans. In vitro human models like ours bring the new opportunity to use the iPS technology for a potential patient-specific cell therapy.

Another interest of such a protocol is that melanoma formation shares many characteristics with melanocyte development and regeneration and a better comprehension of these mechanisms could raise new therapeutic strategies. Clinical challenges to treating melanoma still remain, and prognosis for patients with metastatic melanoma continues to be very poor. Thus we believe that future findings of molecular targets in melanoma, or more efficient therapeutic compounds will come thru the use of in vitro model systems similar to ours.

Indeed, genetic screens can be used to identify possible enhancers and suppressors of melanoma, RNAi screens are also powerful tools for loss-of-function genetic analysis in cells (Boutros and Ahringer, 2008) and chemical screens are useful for finding compounds that may target melanoma or prevent melanoma formation.

MATERIALS & METHODS

hESC culture and melanocytes differentiation

hESC from two cell lines, SA-01 (Cellartis, Götenborg Sweden) and H9 (Wicell, Madison WI) and iPSC derived using retroviruses infection of the OCT4, NANOG, SOX2, CMYC were grown on STO mouse fibroblasts, inactivated with 10 mg/ml mitomycin C, seeded at 30,000/cm² and grown as previously described (guenou et al., 2009).

For differentiation, hESC and iPSC clumps were seeded onto mitomycin C-treated 3T3 fibroblasts in FAD medium composed of 2/3 DMEM, 1/3 HAM:F12 and 10% of fetal calf serum (FCII, Hyclone, Logan, UT, USA) supplemented with 5µg/ml insulin, 0.5µg/ml hydrocortisone, 10^{-10}M cholera toxin, 1.37ng/ml triodothyronin, 24µg/ml adenine and 10ng/ml recombinant human EGF. Three independent experiments were performed using each pluripotent cell lines. Induction of ectodermal differentiation was realized using 0.5nM of human recombinant BMP-4 (R&D, UK) and 0.3mM ascorbic acid (Sigma-Aldrich). Cells were grown in the same medium until clones of pigmented populations were observed and isolated. After isolation pigmented cells were dissociated using trypsin 0,05% (Invitrogen) and seeded as single cells in melanocytes specific medium 254CF supplemented with growth factors (Invitrogen). After 1 week of culture in these conditions, cells presenting a morphology similar to melanocytes were mechanically isolated based on their morphology and amplified separately in the same medium during at least 12 passages.

Keratinocytes and melanocytes culture

As a control, primary human keratinocytes (HK) were cultured on mitomycin C treated 3T3 fibroblasts in FAD medium and primary human epidermal melanocytes (HEM) in 254CF medium supplemented with growth factors (Invitrogen).

Quantitative RT-PCR (Q-PCR).

Total RNA was isolated from hESC, HK and K-hESC using RNeasy Mini extraction kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's protocol. An on-column DNase I digestion was performed to avoid genomic DNA amplification. RNA level and quality were checked using the Nanodrop technology. A total of 500 ng of RNA was used for reverse transcription using the Superscript III reverse transcription

kit (Invitrogen). Q-PCR analysis was performed using a LightCycler 480 system (Roche,BaselSwitzerland) and SYBR Green PCR Master Mix (Roche) following the manufacturer's instructions. Quantification of gene expression was based on the DeltaCt Method and normalized on 18S expression. Melting curve and electrophoresis analysis were performed to control PCR products specificities and exclude non-specific amplification. PCR primers are listed in supplemental Table1. Q-PCR arrays were prepared by loading of primer mixes (1 μM) in duplicate, in 96 well plates. Q-PCR was performed as above after addition of SYBR Green PCR Master Mix and 12.5 ng cDNA.

Immunocytochemistry

Cells were fixed in 4% paraformaldehyde (15 minutes, room temperature) before permeabilization and blocking in PBS supplemented with 0.4% Triton X-100 and 5% BSA (Sigma-Aldrich). Primary antibodies were incubated overnight at 4°C in blocking buffer. Antibodies included mouse anti-MITF (DAKO), mouse anti-TRP1 (Abcam), rabbit anti-tyrosinase (Abcam), mouse anti-Rab27 (BD pharmingen), mouse anti-SSEA3/4 (R&D), mouse anti-TRA1-81 (eBioscience), mouse anti-RPE 65 (Abcam), rabbit anti-K14 (Novacastra) rabbit anti-PAX6 (Covance) and mouse anti-PAX3 (Santa Cruz). Cells were stained with the species specific fluorophore-conjugated secondary antibody (Invitrogen) (1 hour, room temperature); nuclei were visualized with DAPI. Three independent experiments were performed using each hESC line. Pictures were taken using a Zeiss microscope equipped with epifluorescence illumination.

FACS analyses

Cells were detached from culture plates using Trypsin-EDTA (Invitrogen) and fixed in 2% paraformaldehyde (15 minutes, room temperature). After PBS wash, cells were either permeabilized with 0.1% Saponin (Sigma-Aldrich) or not. Primary antibodies diluted at 1:100 were incubated (one hour, room temperature) in PBS containing 0.1% FCS. Controls were made with isotype specific or no primary antibody. Species specific secondary antibodies were added (1 hour, room temperature) and cells analyzed on a FACScalibur using CellQuest software (BD Biosciences). The number of events analysed for each experiment was 10,000. Three independent experiments were performed for each cell line.

Melanosome transfer quantification

Human keratinocytes (HK) and melanocytes from primary culture or derived from pluripotent stem cells were cocultured at 1:3 ratio for three days in epilife medium supplemented with growth factors. 3 days later, immunostaining was performed with anti-TRP1 antibody to visualize melanosomes and with anti-keratin-14 antibody which is specific to keratinocytes. Fluorescence was then observed with a Zeiss fluorescence microscope. The number of melanized keratinocytes was quantified using ArrayScan (Cellomics) by the detection of keratinocytes expressing the keratin 14 and presenting TRP1 positive vesicles in their cytoplasm.

Supplemental Table 1

Gene Name	Reference	Forward primer	Reverse primer
18S	NM_022551.2	GAGGATGAGGTGGAACGTGT	TCTTCAGTCGCTCCAGGTCT
NANOG	NM_024865.2	CAAAGGCAAACAACCCACTT	TCTGCTGGAGGCTGAGGTAT
OCT4	NM_002701.4	CTTGCTGCAGAAGTGGGTGGAGG AA	CTGCAGTGTGGGTTTCGGGCA
SOX2	NM_003106.2	TCGGCATCGCGGTTTTT	ACAGCAAATGACAGCTGCAAA
S0X10	NM_006941.3	AGCCCAGGTGAAGACAGAGA	ATAGGGTCCTGAGGGCTG AT
PAX3	NM_181458	CTGGAACATTTGCCCAGACT	GCTGTCGGTTCCTAGTCCAG
PAX6	NM_001604.4	GCCAGCAACACACCTAGTCA	TGTGAGGGCTGTGTCTGTTC
KRT14	NM_000526.3	GGCCTGCTGAGATCAAAGACTAC	CACTGTGGCTGTGAGAATCTTGTT
MITF Total	NM_198159.1	CCGGGTGCAGAATTGTAACT	GGACAATTTTGGCATTTTGG
MITF-M	NM_000248.2	GCTCACAGCGTGTATTTTTCC	TCTCTTTGGCCAGTGCTCTT
MITF-D	NM_006722.1	TTCCGCTCCATCTCTGAAGT	TAGCTCGTGGGAAAACCACT
TRP1	NM_000550.2	AGCAGTAGTTGGCGCTTTGT	TCAGTGAGGAGAGGCTGGTT
TYROSINASE	NM_000372.4	TTGTACTGCCTGCTGTGGAG	CAGGAACCTCTGCCTGAAAG
PMEL17	NM_006928.3	TGGACAGAAGCCCAGAGACT	GCAATACCTTTTGGCTTCCA
OTX2	NM_172337.1	AGCTCGGGAAGTGAGTTCAG	AGGAGGTGGACAAGGGATCT
BEST	NM_004183.3	GTCAGAGGCTCCTCCTTCCT	TCTGCTCCACCAGTGTTCTG
RPE65	NM_000329.2	GATGCTTACGTACGGGCAAT	AAAGCACAGGTGCCAAATTC

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Characterization of iPSC pigmentation process

(A) Microscopy analysis of iPSC during the differentiation process, (A) undifferentiated iPSC, (B) unpigmented cells derived from iPSC (Day 40), (C) pigmented cells derived from iPSC (Day 60) (D) purified pigmented iPSC (Day 60). Scale bar is 50µm.

(B) Quantitative PCR (qPCR) analysis of pluripotence and self renewal genes OCT4, NANOG, and SOX2 during iPSC pigmentation process.

(C) Quantitative PCR analysis of melanogenesis related genes TRP1, TYROSINASE and MITF during iPSC pigmentation process.

(D) Quantitative PCR analysis of markers of neural cells lineage (PAX6) and neural crest lineage (SOX10 and PAX3) during iPSC pigmentation process.

Datas are normalized against 18S and expressed as relative expression to undifferentiated iPSC.

Figure 2: Characterization of a homogenous population of melanocytes derived from iPSC.

(A) Microscopy analysis of human primary epidermal melanocytes (HEM), and iPSC derived melanocytes (mel-iPSC) after subsequent culture. Scale bar is 50 µm.

(B) Quantitative PCR analysis of OCT4, NANOG, SOX2, PAX6, OTX2, SOX10, PAX3, the isoform M of MITF, TRP1 and TYROSINASE in HEM and mel-iPSC. Datas are normalized against 18S and expressed as relative expression to undifferentiated iPSC. Boxed histogram correspond to the ratio of the isoforms M and D of MITF

(C) Immunofluorescence analysis of pluripotency and self renewal markers OCT4, TRA1-81, neural lineage marker PAX6 and melanocytes markers PAX3, MITF, TRP1, TYROSINASE and RAB27 in HEM and mel-iPSC. Scale bar is 50µm.

Figure 3: Establishment of a pure population of melanocytes derived from iPSC (mel-iPSC)

FACS analysis of SSE3/4, TRA1-81, TRP1 and MITF in undifferentiated iPSC, mel-iPSC and HEM.

Figure 4: Functional characterization of iPSC derived melanocytes.

(A) Immunofluorescence analysis of Keratin 14 and TRP1 in keratinocytes after 3 days of coculture or not with melanocytes (HEM or mel-iPSC). Scale bar is 50µm.

(B) ArrayScan quantification of the percentage of melanized keratinocytes expressing the keratin 14 and containing at least one melanosome (TRP1 positif) after 3 days of coculture with melanocytes

(C) Reconstruction of melanised epidermis with human primary keratinocytes (HK) and melanocytes (HEM and mel-iPSC)

Sup figure 1: iPSC pigmented cells after 60 days of differentiation

Sup figure 2: Characterization of Retinal pigmentary epithelial cells in the mixte population of pigmented cells

(A) Microscopy analysis of RPE cells derived from iPSC (RPE-iPSC). Scale bar is 50 µm.

(B) Quantitative PCR analysis of OCT4, NANOG, OTX2 BEST, RPE65, MITF-D isoform, TRP1 and TYROSINASE in RPE derived from iPSC (RPE-iPSC). Datas are normalized against 18S and expressed as relative expression to undifferentiated iPSC.

(C) Immunofluorescence analysis of PAX6, RPE65 and TRP1 in RPE derived from iPSC (RPE-iPSC). Scale bar is 50µm.

Sup figure 3: Maintain of mel-iPSC phenotype after cryoconservation

(A) Microscopy analysis of iPSC derived melanocytes (mel-iPSC) before and after freezing. Scale bar is 50 µm.

(B) Quantitative PCR analysis of OCT4, NANOG, SOX2, MITF-M isoform, TRP1 and TYROSINASE in undifferentiated iPSC, mel-iPSC before freezing and mel-iPSC after thawing. Datas are normalized against 18S and expressed as relative expression to undifferentiated iPSC.

Sup figure 4: Establishment of a pure population of melanocytes derived from hESC (mel-hESC)

(A) Quantitative PCR (qPCR) analysis of pluripotence and self renewal genes OCT4, and NANOG, melanogenesis related genes TRP1 and TYROSINASE, neural crest cells lineage marker SOX10 and MITF-M isoform during hESC pigmentation process (A) undifferentiated hESC, (B) unpigmented cells derived from hESC (Day 40), (C) pigmented cells derived from hESC (Day 60) (D) purified pigmented hESC (Day 60)

(B) Microscopy analysis of human primary epidermal melanocytes (HEM), and hESC derived melanocytes (mel-hESC) after subsequent culture. Scale bar is 50 µm

(C) Quantitative PCR analysis of OCT4, NANOG, SOX2, PAX6, OTX2, SOX10, PAX3, the isoform M of MITF, TRP1 and TYROSINASE in HEM and mel-iPSC. Datas are normalized against 18S and expressed as relative expression to undifferentiated iPSC.

(D) FACS analysis of SSE3/4, TRA1-81, TRP1 and MITF in undifferentiated iPSC, mel-iPSC and HEM.

Sup figure 5: Functional characterization of hESC derived melanocytes.

(A) Immunofluorescence analysis of Keratin 14 and TRP1 in keratinocytes after 3 days of coculture with melanocytes (HEM or mel-hESC) or cultured alone. Scale bar is 50µm.

(B) ArrayScan quantification of the percentage of melanized keratinocytes expressing the keratin 14 and containing at least one melanosome (TRP1 staining) after 3 days of coculture with melanocytes

REFERENCES

[1] Embryonic stem cells: meeting the needs for cell therapy.
Mitjavila-Garcia MT, Simonin C, Peschanski M.
Adv Drug Deliv Rev. 2005 Dec 12;57(13):1935-43. Epub 2005 Oct 27

[2] Embryonic stem cells as a model for studying melanocyte development.
Zabierowski SE, Herlyn M.
Methods Mol Biol. 2010;584:301-16.

[3] Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells.
Rheinwald JG, Green H.
Cell. 1975 Nov;6(3):331-43.

[4] 15-year quest in search for MITF target genes.
Cheli Y, Ohanna M, Ballotti R, Bertolotto C.
Pigment Cell Melanoma Res. 2009 Nov 25.

[5] Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional retinal pigment epithelium cells.

Idelson M, Alper R, Obolensky A, Ben-Shushan E, Hemo I, Yachimovich-Cohen N, Khaner H, Smith Y, Wiser O, Gropp M, Cohen MA, Even-Ram S, Berman-Zaken Y, Matzrafi L, Rechavi G, Banin E, Reubinoff B.
Cell Stem Cell. 2009 Oct 2;5(4):396-408.

[6] Mitf-D, a newly identified isoform, expressed in the retinal pigment epithelium and monocyte-lineage cells affected by Mitf mutations.
Takeda K, Yasumoto K, Kawaguchi N, Udono T, Watanabe K, Saito H, Takahashi K, Noda M, Shibahara S.
Biochim Biophys Acta. 2002 Feb 20;1574(1):15-23.

[7] Identification of a distal enhancer for the melanocyte-specific promoter of the MITF gene.
Watanabe K, Takeda K, Yasumoto K, Udono T, Saito H, Ikeda K, Takasaka T, Takahashi K, Kobayashi T, Tachibana M, Shibahara S.
Pigment Cell Res. 2002 Jun;15(3):201-11.

[8] A family of Rab27-binding proteins. Melanophilin links Rab27a and myosin Va function in melanosome transport.
Strom M, Hume AN, Tarafder AK, Barkagianni E, Seabra MC.
J Biol Chem. 2002 Jul 12;277(28):25423-30.

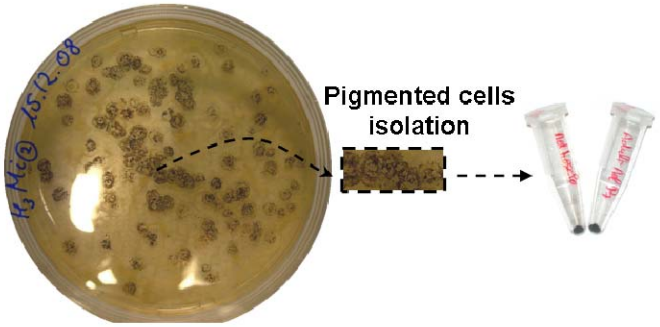
[9] The reconstructed epidermis with melanocytes: a new tool to study pigmentation and photoprotection.
Cario-André M, Bessou S, Gontier E, Maresca V, Picardo M, Taïeb A.
Cell Mol Biol 1999 Nov;45(7):931-42.

[10] Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study.
Guenou H, Nissan X, Larcher F, Feteira J, Lemaitre G, Saidani M, Del Rio M, Barrault CC, Bernard FX, Peschanski M, Baldeschi C, Waksman G.
Lancet. 2009 Nov 21;374(9703):1745-53.

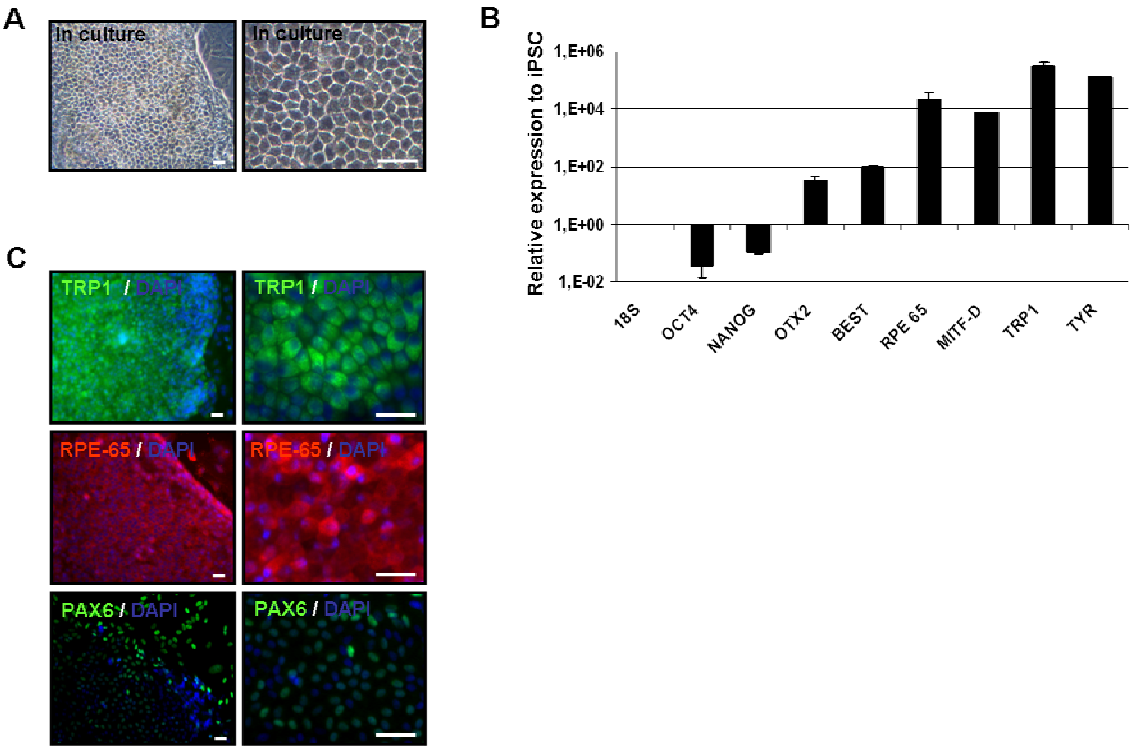
[11] Defining the conditions for the generation of melanocytes from human embryonic stem cells.
Fang D, Leishear K, Nguyen TK, Finko R, Cai K, Fukunaga M, Li L, Brafford PA, Kulp AN, Xu X, Smalley KS, Herlyn M.
Stem Cells. 2006 Jul;24(7):1668-77. Epub 2006 Mar 30.

[12] Pigmentary disorders.
Rose PT.
Med Clin North Am. 2009 Nov;93(6):1225-39.

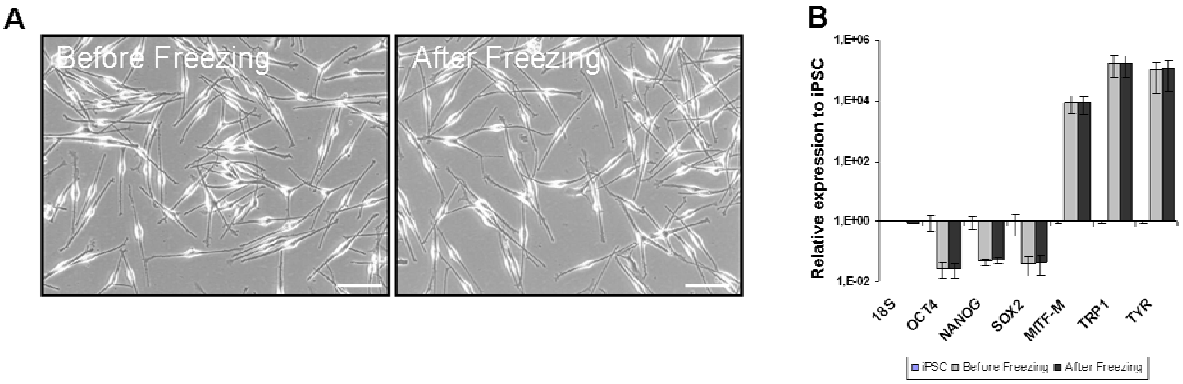
Sup 1


Pigmented cells
isolation

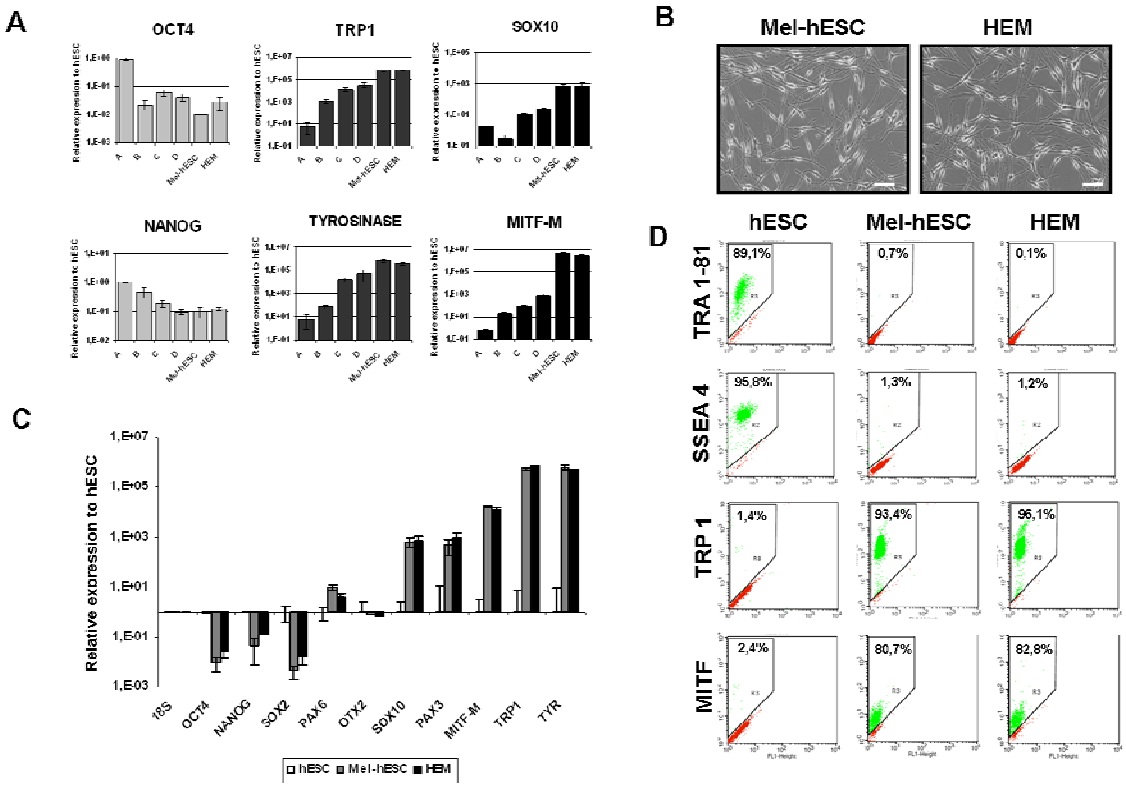
Sup 2


A
In culture
In culture
B
Relative expression to iPSC
1,E+06
1,E+04
1,E+02
1,E+00
1,E-02
18S
OCT4
NANOG
OTX2
BEST
RPE 65
MITF-D
TRP1
TYR
C
TRP1 / DAPI
TRP1 / DAPI
RPE-65 / DAPI
RPE-65 / DAPI
PAX6 / DAPI
PAX6 / DAPI

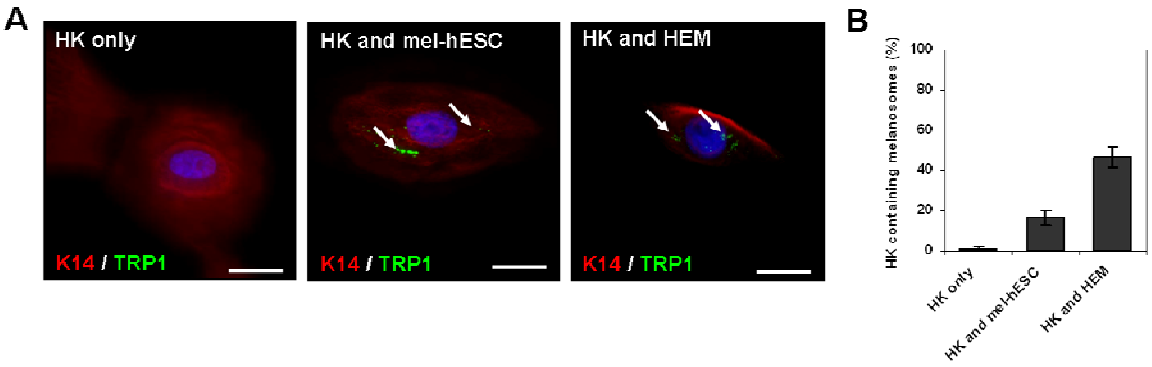
Sup 3


A
Before Freezing
After Freezing
B
Relative expression to iPSC
1,E+06
1,E+04
1,E+02
1,E+00
1,E-02
18S
OCT4
NANOG
SOX2
MITF-M
TRP1
TYR
iPSC
Before Freezing
After Freezing

Sup 4


A
OCT4
TRP1
SOX10
NANOG
TYROSINASE
MITF-M
B
Mel-hESC
HEM
C
Relative expression to hESC
1,E+07
1,E+05
1,E+03
1,E+01
1,E-01
1,E-03
18S
OCT4
NANOG
SOX2
PAX6
OTX2
SOX10
PAX3
MITF-M
TRP1
TYR
hESC
Mel-hESC
HEM
D
hESC
Mel-hESC
HEM
TRA 1-81
SSEA 4
TRP 1
MITF
89,1%
0,7%
0,1%
95,8%
1,3%
1,2%
1,4%
93,4%
96,1%
2,4%
80,7%
82,8%

Sup 5


A
HK only
K14 / TRP1
HK and mel-hESC
K14 / TRP1
HK and HEM
K14 / TRP1
B
HK containing melanosomes (%)
100
80
60
40
20
0
HK only
HK and mel-hESC
HK and HEM

III. Mise en évidence du rôle de miR-203 dans la différenciation de cellules hES en kératinocytes

Titre de l'article : miR-203 is a key regulator of keratinocytes differentiation during human development

Auteurs : Xavier Nissan, Jérôme Denis, Manoubia Saidani, Gilles Lemaitre, Marc Peschanski, Christine Baldeschi.

Parallèlement à la mise en place de ces protocoles de différenciation, nous avons cherché à étudier le rôle des microARNs dans la différenciation des cellules hES au fur et à mesure de leur engagement dans le lignage épithélial. Pour cela nous avons utilisé les conditions expérimentales préalablement décrites dans l'article publié par Guenou et al en 2009 et réalisé une étude d'expression à grande échelle de microARNs. Ces travaux, actuellement en cours de publication, ont permis de mettre en évidence que les cellules hES engagées dans le lignage épithélial exprimaient un set de microARNs spécifiques composés de miR-200a/b, miR-203, miR-205 et miR-429. Par la suite l'étude fonctionnelle réalisée in vitro a permis de démontrer que miR-203 régulait l'ensemble du processus de différenciation chez l'homme, depuis l'induction épithéliale jusqu'à la différenciation terminale des kératinocytes.

A. Evolution du miRnome au fur et à mesure de l'engagement des cellules hES dans le lignage épithélial

Selon le protocole publié par notre groupe en 2009, les cellules hES ont été ensemencées sur un tapis de cellules nourricières 3T3 en milieu FAD supplémenté avec de la BMP4 et de l'Acide Ascorbique. Ainsi stimulées, les cellules s'engagent progressivement dans le lignage épithélial tout en respectant la chronobiologie du développement embryonnaire (Guenou H et al., 2009). Afin d'étudier le rôle des microARNs au moment de la prise de décision nous avons donc cherché à déterminer la fenêtre temporelle durant laquelle les cellules s'engageaient dans ce lignage. Pour cela nous avons suivi l'expression des marqueurs de la pluripotence (OCT4 et NANOG) épithéliaux, (K8 et K18) et kératinocytaires (ΔNp63 et K14) (Figure 1) parallèlement à celle des marqueurs du lignage neural (PAX6 et SOX1) (Sup Figure 1). Ces données montrent que, dès le 3ème jour de différenciation, les cellules hES commencent à exprimer les marqueurs épithéliaux mais pas encore la kératine K14, cette dernière augmentant à partir du 8ème jour. Au 25 ^{ème} jour de différenciation les cellules n'expriment plus les kératines 8 et 18 mais expriment un niveau important de ΔNp63 et K14 (Figure 1) pour finalement atteindre celui des kératinocytes adultes à la fin du processus de différenciation. Nous avons donc choisi d'étudier l'expression et la fonction des microARNs

à ces temps clés du processus de différenciation (Figure 2A). Ainsi, l'étude comparative de l'évolution des miRnomes (Profils d'expression globaux de microARNs) a dans un premier temps permis de mettre en évidence que les microARNs relatifs au caractère pluripotent des cellules hES (miR-302, miR-367 miR-371 et miR-373) étaient graduellement diminués jusqu'à atteindre leur niveau basal d'expression (Figure 2B). Ces données ont été confirmées sur d'autres types cellulaires dérivés de cellules hES tels que les NPC-hESC (Neural progenitor cells derived from hES cells) ou les MSC-hESC (mesenchymal stem cells derived from hES cells). Dans un deuxième temps ces résultats ont permis de mettre en évidence un set de quatre microARNs spécifiquement surexprimés au fur et à mesure du processus de différenciation épithélial et pas dans les autres lignages : miR-200a, miR203, miR-205 et miR-429 (Figure 2C). Ces données, confirmées par PCR quantitative, démontrent par ailleurs qu'une fois le processus de différenciation terminé, les K-hESC présentent le même niveau d'expression pour ces quatre microARNs que des kératinocytes adultes humains (HK). Finalement l'analyse comparative globale des miRnomes des K-hESC dérivées de 2 lignées (H9 et SA01) et des HK démontre une importante corrélation d'expression (R^2=0,922), deux fois plus importante que celle observée avec les cellules hES indifférenciées (R^2=0,458) (Figure 3).

B. Rôle de miR-203 dans l'engagement épithélial

Nous avons donc déterminé par cette étude d'expression à grande échelle que seuls 4 microARNs étaient spécifiquement surexprimés dans les cellules hES engagées dans le lignage kératinocytaire. La deuxième partie de cette étude a donc consisté à évaluer la fonction de ces candidats au moment de la prise de décision par une étude de perte et de gain de fonction. Pour cela les cellules hES ont été différenciées durant 8 jours dans les conditions décrites précédemment. A ce stade précoce de la différenciation épithéliale, les cellules ont été transféctées avec des premiR (gain de fonction) et des antimiR (perte de fonction) et leur phénotype évalué après 72h. Ces résultats démontrent que seule l'extinction de miR-203 est suffisante pour induire une modification d'expression de ΔNp63 et K14 (Figure 4a), les autres microARNs candidats miR-200a, miR-205 et miR-429 n'ayant aucun effet sur le processus de différenciation. Afin d'évaluer l'effet de miR-203 sur la prise de décision des cellules hES au cours de la différenciation, nous avons par la suite mesuré le niveau d'expression des marqueurs caractéristiques des autres lignages cellulaires en présence de l'antimiR ou du premiR-203 (Figure 4b). Ces résultats démontrent que le traitement à l'antimiR-203 n'induit pas seulement l'augmentation d'expression des marqueurs kératinocytaires (ΔNp63, K5 et K14) mais également la diminution d'expression des marqueurs de la pluripotence (OCT4 et NANOG), neuraux (PAX6) et de la crête neurale (SOX10) (Figure 4c). Ces résultats

suggèrent donc que miR-203 joue un rôle majeur dans le contrôle de ce processus de différenciation et que son extinction à l'aide un antimiR est suffisant pour induire l'engagement des cellules hES dans le lignage épithélial.

C. Rôle de miR-203 dans la différenciation terminale des kératinocytes

Enfin la dernière partie de ce travail de recherche a consisté à étudier le rôle de miR-203 durant le processus de différenciation terminal des kératinocytes. Pour cela des kératinocytes ont été mis en condition de stratification dans un modèle de culture organotypique permettant la génération d'un épiderme pluristratifié *in vitro*. Nous avons ainsi démontré que parallèlement à l'augmentation d'expression de la kératine K10 et de l'involucrine (Figure 5A), les kératinocytes surexpriment également miR-203 après leur passage à l'interface air liquide (Figure 5B). De façon intéressante, cette augmentation d'expression correspond à celle observée dans des échantillons de peaux fœtales humaines. En effet ces échantillons de peaux fœtales ont été récupérés à des temps clés du développement embryonnaire de l'épiderme (8, 20, 26 et 33 semaines de gestation) et nos résultats démontrent que, *in vivo* miR-203 est surexprimé, de la même manière qu'*in vitro*, au moment de l'induction de la stratification (8 semaines de gestation) (Figure 5C). De la même manière que pour la validation fonctionnelle de miR-203 durant l'engagement des cellules hES dans le lignage kératinocytaire nous avons réalisé des études de gain de fonction et de perte de fonction *in vitro* et démontré que la surexpression de miR-203 dans les kératinocytes en culture entraine une augmentation de leur niveau d'expression des marqueurs de différenciation terminale (K10 et involucrin) (Figure 5D) parallèlement à une diminution de leurs capacités à générer un épiderme pluristratifié (Figure 5E) dans un modèle de culture organotypique.

L'ensemble des résultats obtenus est présenté dans l'article qui suit.

D. Conclusion

Dans cette étude, nous avons observé dans un premier temps que la différenciation des cellules hES était associée à une évolution du miRnome caractéristique du type cellulaire produit. L'identification des microARNs spécifiquement modulés durant l'engagement des cellules hES dans le lignage épithélial nous a permis d'identifier miR-203 comme étant potentiellement un facteur régulateur de ce processus. Nous avons par la suite effectué une étude fonctionnelle et démontré que l'extinction de miR-203, à un instant clé de la différenciation en kératinocytes, avait pour conséquence de modifier l'engagement cellulaire des cellules hES dans ce lignage. Enfin dans un troisième temps, nous avons démontré que ce

dernier pouvait également contrôler les propriétés prolifératives des kératinocytes en modifiant leur capacité à reconstruire un épiderme *in vitro*.

TITLE:

MiR-203 is a key regulator of keratinocytes differentiation during human development

AUTHORS

Xavier NISSAN[1], Jérôme DENIS[2], Manoubia SAIDANI[1], Gilles LEMAITRE[2], Marc PESCHANSKI [2], Christine BALDESCHI[2*]

[1] CECS, I-STEM, AFM, Institute for Stem cell Therapy and Exploration of Monogenic diseases, 5 rue Henri Desbruères, 91030 Evry cedex, France

[2] INSERM/UEVE U-861, I-STEM, AFM, Institute for Stem cell Therapy and Exploration of Monogenic diseases, 5 rue Henri Desbruères, 91030 Evry cedex, France

[*] To whom correspondence should be addressed. Email: cbaldeschi@istem.fr

ACKNOWLEDGEMENT:

The authors thank Geneviève Piétu for providing biological resources. We thank Cecile Martinat and Walter Habeler for their scientific expertises and constant support. This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), University Evry Val d'Essonne (UEVE), Association Française contre les Myopathies (AFM) and Genopole.

INTRODUCTION

Formation of the epidermis during ontogeny involves two major developmental steps, first the differentiation of keratinocyte stem cells from primitive ectodermal precursors, and second the establishment of the pluristratified epithelium by a combined process of proliferation of those keratinocyte stem cells and migration of their progressively maturing post-mitotic progeny. Molecular mechanisms underlying the second series of processes have been readily accessible in the adult, including the Human, as post-mitotic keratinocytes are continuously produced and all strata of epidermis above the basal layer are fully renewed in about 4 weeks (Blanpain C et al., 2009). A major role has been attributed in those phenomena to the transcription factor p63, a member of the p53 oncogene family (Truong AB et al., 2006). Keratinocyte differentiation and epidermal stratification may be regulated by p63 through the transactivation of the Notch ligand JAGGED-1 (Okuyama R et al., 2008) and the control of IKK□ (IkB kinase-□) expression (Candi E et al., 2006). Recently, miRNAs have also been implicated in the regulation of mouse skin development (Yi R et al., 2006). Thus, miR-203 has been identified specifically in keratinocytes (Yi R et al., 2006) and its role in skin morphogenesis emphasized by it repressive activity on p63 expression (Lena AM et al., 2008).

Molecular mechanisms of the earlier developmental steps leading to keratinocyte stem cells specification remain more elusive (Aberdam D et al., 2007). In the mouse, a role for p63 has been pointed to as its knock out provokes the absence of epidermis and epithelial appendages (Mills AA et al., 1999). BMP-4 treatment has also been shown, in mouse embryonic stem cells, to induce both an ectodermal fate and a specific isoform of p63, deltaNP63, which is needed for the transition between epithelial progenitor cells and keratinocytes (Lena AM et al., 2008) To our knowledge, nothing is known in the Human besides the observation that mutations of the p63 gene (TrP63) are linked to ectodermal dysplasia syndromes (Rinne T et al., 2008).

We have taken advantage of our recent development of a protocol that permits to derive fully functional keratinocyte stem cells from human embryonic stem cells (Guenou H et al., 2009). –i.e. capable of forming a pluristratified epidermis- to explore more precisely the molecular mechanisms involved in the earlier steps of their differentiation, focusing most particularly on p63 and miRNAs. Human embryonic stem cells (hESC) are increasingly used to model *in vitro* human embryogenesis as they are pluripotent, amenable to differentiation along any cell lineage, and their unlimited self renewal allows procurement of any required amount of cells. Recent studies have, for example, provided important clues concerning the role of various families of transcription factors in neural induction (Chambers SM et al., 2008). or in the progression toward the hematopoietic lineage (Navarro F et al., 2009).

Using our protocol for epidermal differentiation, we demonstrate here that the p63-regulator miR-203 is a key actor not only in the final differentiation of the pluristratified epidermis as

previously demonstrated, but also in the ectodermal to keratinocyte transition during human skin embryogenesis.

RESULTS

Human embryonic stem cells differentiation into keratinocytes was carried out using the previously described protocol (Guenou H et al., 2009) (Fig 1A). This process is characterized by a sequence of events in which, first, the pluripotency markers OCT4 and NANOG decrease gradually, then cells express temporarily the markers of epithelial progenitors Keratin 8 (KRT8) and Keratin 18 (KRT18), and finally terminal differentiation is demonstrated by expression of keratinocytes specific markers, deltaNP63 and Keratin14 (KRT14) (Fig. 1B). As a control of the epithelial lineage commitment specificity, expression profiles of hESC-derived-epithelial cells were compared to mesenchymal stem cells (MSC-hESC) and Neural Progenitor cells- (NPC-hESC) derived from the same hESC line.

After 40 days of differentiation K-hESC present a morphology similar to human keratinocytes (HK) (Fig 1C) and are characterized by their expression of keratinocytes specific proteins (Keratins 5 and 14) (Fig. 1C).

miRNAs profiling of hESC engaged into epithelial commitment.

miRNAs expression profiles (miRnomes) were systematically analyzed during the same time-course using TaqMan Array (Fig 2A). miRNAs distributions using a clustering self organizing map clearly showed two highly distinguishable clusters, a first one related to pluripotency and self renewal and a second one related to epithelial cells engagement. In the first cluster miRNAs that have been associated with the pluripotent stage miR-367, miR-371 and miR-373, gradually decreased non-specifically during cell differentiation (Fig 2B). A miRNA associated to neural differentiation, miR-9, was transiently expressed at day 3 (sup Fig 1). A set of 4 miRNAs, namely miR-200a, miR-203, miR-205 and miR-429, specifically increased during the differentiation along the keratinocyte lineage (Fig 2C). Time course analyses distinguished two different profiles of expression among them. The miR-203 and miR205 expression increased early on during the differentiation process, as soon as cells engaged into the epithelial lineage. Their expression continued to progress over time up to a maximum in fully differentiated K-hESC after 40 days of treatment. In contrast, miR-200a and miR-429 increased only later, as revealed at day 25, but then immediately reached a level that remained unchanged up to full differentiation.

miRNAs expression profiles were compared in undifferentiated hESC, keratinocytes derived from hESC (K-hESC) and human adult keratinocytes (HK). In K-hESC miRnome appeared very similar to that observed in adult human keratinocytes (HK) (Fig 3A), with a coefficient of linearity of 0.92, taking hESC as baseline (0.46) (Fig 3B). Expression profiles comparison showed miR-200a, miR-203, miR-205 and miR-429 in the top 10 most upregulated miRNAs in

both K-hESC and HK (Supplemental Table 1). Conversely, miR-302, miR-371, miR-367 and miR-373 were undetectable in HK and K-hESC (Supplemental Table 2).

Functional analysis of the four miRNAs associated to keratinocyte differentiation was carried out using specific AntimiRs and PremiRs. After 72 hours of treatment, there was more than 80% efficient knockdown of miRNAs or a 200 fold overexpression after transfection with AntimiRs or PremiRs, respectively (datas not shown). Only changes in the expression of miR-203 were accompanied by alteration in the cell phenotype as only miR-203 knockdown gave rise to an increased expression of DeltaNP63 and KRT14 (Fig 4A), whereas variations in the other three miRNAs were not consequential in keratinocyte differentiation. In order to characterize the miR-203 effect on hESC differentiation towards the keratinocyte lineage, quantitative PCR analysis was performed to quantify key genes of other lineages (Fig 4B). In antagomiR-203-treated-cells, the increase of keratinocyte markers (DeltaNP63, KRT5 and KRT14) was associated with a decrease of the self renewal and pluripotency markers (OCT4 and NANOG), of the neural crest-specific marker (SOX10) and of the neural-specific marker (PAX6). (Fig 4C). Immunostaining for Keratin 14 (Fig 4D) confirmed its increase at the protein level after AntimiR-203 treatment.

miR-203 expression during pluristratified epidermis formation

A comparative analysis of expression of miRNAs associated to keratinocytes during the formation of the pluristratified epidermis was made between results obtained *in vitro* with the ES cell-derived progenies and during human development. In the unstratified epidermis, keratinocytes overexpressed the basal keratinocyte marker DeltaNP63 *in vitro* at 2 days in the epidermis reconstruction assay as well as *in vivo* at 8 weeks of development (Fig 5A). Conversely, a high expression level of the suprabasal keratinocytes marker KRT10 and of the granular keratinocytes marker (IVL) was observed in the stratified epidermis, after the emersion phase *in vitro* and during development between 20 and 33 weeks (Fig 5A). miR-203 was highly expressed during these two different periods *in vitro* and *in vivo* (Fig 5B and Fig 5C).

The functional role of miR-203 was evaluated during epidermis stratification using specific AntimiR and PremiR. Keratinocytes overexpressing miR-203 exhibited a significant increased expression of KRT1 and KRT10, i.e. miR-203 strongly promoted the differentiation of basal keratinocyte stem cells into more mature phenotypes (Fig 5D). This effect was correlated with the results of the reconstructed epidermis assay that showed a reduction of the stratification for the epidermis generated from keratinocytes overexpressing miR-203 (Fig 5E). In contrast, treatment of keratinocytes with the AntimiR-203 had apparently no effect on either the maturation of keratinocytes or the stratification of the epidermis (Fig 5D and 5E).

DISCUSSION

The main result of this study is the demonstration that, in the Human, one miRNA –miR-203- controls the commitment of hESC to the keratinocyte lineage. Together with previous data showing that the same miRNA plays a key role during the formation of the pluristratified epidermis by basal keratinocyte stem cells, this result identifies a specific association of miR-203 with the development of epidermis at all of its stages. This concurs with recently published results to suggest the key role of a small subset of tissue-specific miRNA during development.

miR-203 controls the early commitment of ES cells to the keratinocyte lineage in the Human

We were able to decipher molecular pathways occurred in the earliest stages of commitment of embryonic stem cells to the keratinocyte lineage by taking the opportunity of the recently published highly robust and homogeneous protocol that leads to the production of a population of basal keratinocyte stem cells. This protocol, based upon the treatment of hESC with BMP4 and ascorbic acid, induces cells to mimic the succession of differentiation stages observed in the embryo over a period of 40 days Thus, by recapitulating the entire chronobiology of ontogenesis, we were able to reconstitute a pluristratified ES-derived epidermis comparable to that produced by adult basal keratinocytes (Guenou H et al., 2009). By opening a way to analyze systematically the expression of miRNAs, it allowed us to point to miR-203 as a candidate actor in that differentiation. In a recent study in which mouse embryonic stem cells were guided toward epithelial commitment through the forced expression of P63, Lena and collaborators (Lena AM et al., 2008) suggested that miR-203 may play such a key role because its expression increased in parallel to the differentiation. By decreasing the expression of the miRNAs by exogenous means, we bring here evidence for such a key role of miR-203 during the early stages of epidermal differentiation, as it does exert a potent regulatory function on the expression of key markers of keratinocyte differentiation, DeltaNP63 and KRT14.

Quite interestingly this did not appear to be the case for the three other miRNAs, the expression of which was associated with keratinocyte differentiation, namely miR-200a and miR-429 (of the miR-200 family) and miR-205 in our study in the Human, as in the mouse (Yi R et al., 2006). For those miRNAs, exogenously induced expression changes failed to alter DeltaNP63 and KRT14. miR-203 thus display an association with keratinocyte differentiation at an early stage which is not only potent but also specific. The functions of the other three miRNAs during this differentiation process is a matter of speculation at this stage. It may be interesting to mention, however, that they have been associated with several different epithelial phenotypes (Sand et al., 2009) as this may reveal a less specific action on the keratinocyte differentiation than for miR-203. Rather, a role of all three miRNAs has been suggested in cell adhesion through the regulation of ZEB1, ZEB2, and E cadherin (Sossey-Alaoui K et al., 2009)

and migration through WAVE3 (Gregory PA et al., 2008). miR-205 was also shown to control apoptosis in corneal keratinocytes through affecting Akt signaling pathway via SHIP2 inhibition (Yu J et al., 2008). The miR-200 family also regulates epithelial differentiation during Epithelial Mesenchymal Transition (Korpal M et al., 2008). Altogether, these data suggest a role of miR-205 and the miR-200 family in the maintenance of an epithelial phenotype.

miR-203 is a key actor at all stages of keratinocyte differentiation in the Human

As concerns the second stage of differentiation of the epidermis, i.e. the formation of a pluristratified epithelium, our results with miR-203 are in concordance with those obtained in the mouse by Yi and colleagues (Yi R et al., 2006). During epidermis development in the mouse, miR-203 was indeed specifically expressed in the suprabasal layer and continuously up-regulated. Its functional role was established *in vivo* as transgenic mice overexpressing miR-203 under a K14 promoter exhibited a significantly thinner pluristratified epidermis than wild-type. It was further demonstrated that this skin-specific miRNA promotes epidermal differentiation *in vitro* by restricting the proliferative potential of keratinocytes and inducing cell cycle exit through the control of P63 expression (Yi R et al., 2006). Human primary keratinocytes overexpressing miR-203 were also characterised by a lower proliferation potential, as revealed by a significant decrease of their clonogenic capacities (Lena AM et al., 2008). We have confirmed all those results using our pluristratifed epidermis reconstruction assay based on hES cell progenies. Overexpression of miR-203 indeed led to increased expression of differentiation markers (Keratins 1 and 10) and a reduced stratification, indicating that this miRNA controls negatively the stemness of basal keratinocytes. Molecular mechanisms involved in this control in the Human have not been specifically sought. In the mouse, however, Lena and colleagues have demonstrated that miR-203 represses stemness in keratinocytes through a direct negative regulation of DeltaNP63 (Lena AM et al., 2008).

miR-203 belongs to a subset of miRNAs that are tissue-specific developmental regulators

Our demonstration that miR-203 is a key regulator of the entire process between the early steps of epithelial cell fate commitment up to terminal keratinocyte differentiation in the epidermis comes along with similar description of key roles in specific tissue development for a small subset of miRNAs. Regulatory functions of miRNAs during development have been acknowledged since their earliest studies in invertebrates. Lin-4 and Let-7 were thus shown to control timing of larval development in Caenorhabditis elegans (Lee RC et al., 2001) as mutations in those miRNAs led to the reiteration of larval cell fates and delayed final differentiation of several cell types. In the same organism, miR-16 and miR-84 affect vulva development through the regulation vav and ras (Jannot G et al., 2006 and Johnson SM et al.,

2005) and miR-273 participates in the establishment of left-right asymmetry in the ASE chemosensory neurons (Hobert O et al., 2006). Similar results were obtained in Drosophila melanogaster in which miR-2, miR-6 and miR-14 modulate tissue growth through the regulation of cell apoptosis (Leaman D et al., 2005 and Brennecke J et al., 2003) and two miRNAs encoded by the iab-4 locus control transformation of halters to wings through the regulation of Ultrabithorax (Ronshaugen M et al., 2005).

Recent results also point to the existence of a small number of tissue-specific miRNAs that are key players during development in vertebrates. A general demonstration was provided by studies in which proteins involved in miRNAs biogenesis, such as Dicer or DGCR8, were knocked down in mice resulting in major developmental defects leading to early embryonic lethality (Bernstein E et al., 2003 and Wang Y et al., 2007). miRNAs controlling several processes of development in the mouse have been described from analyses of knock-down or gene knock-out experiments. As an example, miR-124 was shown to regulate neuronal development (Makeyev EV et al., 2007) by controlling key factors of neuronal differentiation like the RE1-silencing transcription factor (REST) (Visvanathan J et al., 2007) and the neuronal-polypyrimidine-tract-binding protein (nPTB) (Boutz PL et al., 2007). Muscle formation is controlled by miR-1 and miR-133 (Chen JF et al., 2006) and hematopoietic differentiation by miR-155 and miR-181 (Neilson JR et al., 2007). Similar strategies have already been instrumental to reveal the function of some miRNAs in the Human, such as miR-1 and miR-133 in the regulation of myocardial differentiation (Takaya T et al., 2009) or miR-375 in endodermal differentiation through the control of TIMM8A expression (Hinton A et al., 2009). Further refined mechanistic analyses have been performed in Xenopus (Martello G et al., 2007) in which miR-15 and miR-16 negatively regulate Notch signaling by reducing the expression of one of its receptors, Acvr2a. The knockdown of these miRNAs restored dorsal mesoderm induction of embryos in which Wnt-betacatenin signaling was suppressed, suggesting their direct regulation of Wnt and Nodal signaling pathways.

MiR-203 clearly belongs to this small group of miRNAs which are discretely involved in early developmental functions. Our results make miR-203, however, particular even within this group as, to our knowledge, it is the only one for which a specific association has been demonstrated at all stages of differentiation of a particular tissue, from the early commitment of embryonic stem cells down to ultimate differentiation. Such a very specific link –paralleled by that of the transcription factor DeltaNP63- may bear significance from an evolutionary point of view, and it would be interesting to determine whether the acquisition of miR-203 is associated to the appearance of the mammalian epidermis.

MATERIALS & METHODS

hESC culture

The human ES cell lines H9 (WA09, WiCell Research Institute) and SA01 (Cellartis, Sweden), were used in this study. Cells were maintained on a feeder layer of mitomycin C-inactivated murine STO (Sim's Thioguanine Ouabaine Resistant) fibroblasts in Knock-Out (KO)-DMEM supplemented with 20% of KO Serum Replacement (KSR), 1mM L-glutamine, 0.1% penicillin /streptomycin, 1% non-essential amino acids (NEAA) and 4ng/ml FGF_2 (all from Invitrogen, Cergy, France). Culture medium was changed by half daily, supplemented by 10 ng/ml FGF2. For passages, cells were manually cut and placed into new dishes every 5-6 days with a 1:4 ratio.

hESC Differentiation into Keratinocytes

To engage hESC toward epithelial lineage, clumps were seeded onto mitomycin C-treated 3T3 fibroblasts in FAD medium as previously described by Guenou and colleagues (Guenou H et al., 2009). The induction of ectodermal differentiation is induced by the treatment of 0.5nM of human recombinant BMP-4 (R&D Systems Europe, UK) and 0.3mM ascorbic acid (Sigma). Cells were grown in the same medium until clones of epithelial cells were isolated. The latter were then seeded in the same feeder layer in FAD medium devoid of BMP4 and ascorbic acid. As a control, primary human keratinocytes (HK) were grown on mitomycin C treated 3T3 fibroblasts in FAD medium.

hESC Differentiation into MSCs

Mesenchymal differentiation was induced by plating $2x10^4$ hES cells/cm2 on 0.1% gelatine-coated dishes in the presence of KO-DMEM medium supplemented with 20% of Fetal Bovine Serum (FBS), 1mM L-glutamine, 1% non-essential amino-acid, 1% penicillin-streptomycin and 0.1mM β-mercaptoethanol (all from Invitrogen) as adapted from literature (Mateizel I et al., 2008)..

hESC Differentiation into NPCs

Neural progenitor cells derived from hESC (NPC-hESC) were obtained using a protocol adapted from literature (Perrier AL et al., 2004). hESC cells were dissociated from STO by manual dissociation and plated in a density of approximately 10^3 cells per cm² on a confluent layer of mitotically inactivated murine stromal feeder (MS5). Cells were cultured in KSR medium (Knock-out Serum Replacement, 15 % SR; 1% Glutamax; 1% NEAA and 0.1% BM, all from GIBCO) for 14-16 DIV (Days *in vitro*), replaced by Neurobasal medium, N2 (DMEM-F12 + Glutamax, 1% N2 supplement and 1% P/S) until DIV21. Cells were harvested at DIV21 using TrypLE Express (GIBCO) and about 5.10^6 cells were suspended in PBS -2% Fetal Calf Serum containing 1% of 7-amino-actinomycin D (7AAD) from Sigma and then incubated with IgG1κ Direct conjugated Phyco-erythrin (PE) monoclonal anti human Neural Cell Adhesion Molecules (hNCAM) antibody diluted 1/10 provided by BD Biosciences

Pharmingen™. This antibody recognizes an extracellular immunoglobulin-like domain common to three molecular weight forms –Mr 120, 140 and 180 kilodaltons –of the NCAM protein. The cell sorting was performed by MoFlow Cell Sorter Cytometer from Cytomation and alive positive and negative fractions were collected in 1mL of N2 medium with 1% P/S.

Human keratinocytes Culture

Human keratinocytes (HK) were isolated from human foreskin cultured on confluent feeder layers of lethally irradiated mouse J2-3T3 fibroblasts in keratinocyte FAD medium Cells were passed each week using trypsinization and seeded at 5 000 cells/ cm2 into 100mm petri dishes

Epidermis Reconstruction assay

Organotypic epidermis was generated as detailed elsewhere (Poumay Y et al., 2004 and Guenou H et al., 2009) Keratinocytes cultures were performed on polycarbonate culture inserts (NUNC). These cells were maintained for 13 days in Epilife medium (fabricant) supplemented with 1.5mM CaCl2 and 50µg/ml ascorbic acid. The cells were exposed to the air-liquid interface by removing the culture medium after 2 days for 10 days.

Cell transfection

Cells were transfected by Lipofectamine RNAimax according to the manufacturer's protocols (Invitrogen) using AntimiR or PremiR (Ambion) at 100nM each.
Transfection medium was removed after 6 hours and replace by adequate culture medium.

mRNAs extraction and qPCR

Total RNA was isolated from samples using RNeasy extraction kits (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. Purity and concentration of RNA were checked using the Nanodrop technology (Agilent). Reverse transcription was performed using the Superscript III reverse transcription kit (Invitrogen).

Real time RT-PCR was performed using a LC480 real time system (Roche Diagnostics) and SYBR Green PCR Master Mix (Roche Diagnostics) following the manufacturer's instructions. Quantification of gene expression was based on the Ct (Cycle threshold) value calculated using the LC1.5 software. Melting curve and electrophoresis analysis were performed to control PCR products specificities and exclude non-specific amplification. PCR Primers were designed using Primer3 software and are listed in supplementary Table 3. Samples were normalized against 18S.

MicroRNAs extraction and TaqMan assay

MicroRNAs were extracted using miRVana extraction kit (Applied biosystem) according to the manufacturer's protocol after phenol-chloroform and column purification.
Individual TaqMan microRNA assay were performed on ABI 7900 (Applied biosystems) with a no UNG no Amperase master mix (Applied biosystem) according to the

manufacturer's protocol. Results were normalized against RNU 48 a small nucleolar RNAs (snoRNAs)

TaqMan Low Density Array

MicroRNAs profile analysis was performed using TaqMan® Array encoding the human microRNA panel V1.0 (Applied biosystem).

80 ng of total RNA were reverse transcribed in a multiplex RT consisting of eight pre-defined RT primer pools containing up to 48 RT primers each. All the 365 miRNA targets were reverse-transcribed in eight separate RT reactions and each RT reaction was pipetted into one of the eight filling ports on the TaqMan® Array. Real time PCR was performed using no UNG no Ampersase TaqMan master mix (Applied biosystem) on ABI 7900 and results were normalized against RNU 48.

Immunocytochemistry

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 min at room temperature before blocking and permeabilizing with PBS 2%, Bovine Serum Albumin, 0,1% Saponin. Primary antibodies were incubated overnight at 4°C in blocking buffer. Cells were then stained with the appropriate fluorophore-conjugated secondary antibody.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Establishment of a keratinocyte lineage

(A) Schematic representation of the protocol design permitting the differentiation of human Embryonic Stem Cells (hESCs) into keratinocytes (K-hESC) using FAD medium supplemented with Ascorbic Acid (AA) and Bone Morphogenic protein 4 (BMP4) . After 40 days of induction, these cells can be isolated, amplified, cryoconservated and used to generate a reconstructed epidermis in vitro. Arrows indicate steps at which particular phenotypes were observed.

(B) Quantitative PCR analysis of OCT4/NANOG, KRT8/KRT18, KRT5/KRT14 along the process of differentiation from hESC to K-hESC. Samples were analyzed at 0 (hESC), 3, 8, 25, and 40 days (K-hESC) of differentiation in comparison to hESC differentiated into other lineages (NPC-hESC and MSC-hESC). Human keratinocytes (HK) are used as positive control and results are expressed in relative expression to hESC. Data are normalized on 18S and are presented as a mean ± SD of 3 independent experiments.

(C) Immunofluorescence of OCT4, Keratin 5 (K5) and Keratin 14 (K14) in K-hESC. Nuclei staining were done with DAPI (in blue). Scale bar is 20 □m.

Figure 2: miRNAs profiling of hESC engagement into epithelial lineage

(A) TaqMan array of 367 miRNAs during hESC differentiation into epithelial commitment at 0 (hESC), 3, 8 and 25 days of differentiation and into fully differentiated cell type such as keratinocytes (K-hESC), neural progenitor cells (NPC-hESC) and mesenchymal stem cells (MSC-hESC). human keratinocytes (HK) are used as positive control of keratinocyte lineage. Data were normalized on RNU48 and Array Assist 4.1 software (Stratagen) was used to achieve the clustering distribution following a "self organizing organisation" and using a Euclidian distance metric.

(B) Quantitative PCR analysis of hESC-specific miRNAs miR-302, miR-371, miR-373 and miR-367. Results are expressed in relative expression to hESC. Data are normalized on RNU48 and are presented as a mean ± SD of 3 independent experiments.

(C) Quantitative PCR analysis of miRNAs specifically increased in epithelial commitment: miR-203, miR205, miR200a and miR-429. Results are expressed in relative expression to hESC. Data are normalized on RNU48 and are presented as a mean ± SD of 3 independent experiments.

Figure 3: miRNAs expression profiles of Keratinocytes derived from hESC (K-hESC)

(A) TaqMan array analysis of miRNAs expression profiles of hESC and K-hESC differentiated from two different cell lines (H9 and SA-001) in comparison to primary keratinocytes (HK). Data are normalized on RNU48 and represented using Array Assist 4.1 software (Stratagen) to achieve the clustering distribution following a "self organizing organisation" and using a Euclidian distance metric.

(B) Comparative scatter plot analysis of miRNAs expression profiles of hESC, K-hESC and HK. Data are expressed in Log_2(DCT) normalised on RNU48.

(C) Heat map representation of the 25 most downregulated miRNAs in K-hESC compared to hESC. Data are normalized on RNU48 and represented using Array Assist 4.1 software (Stratagen)

(D) Heat map representation of the 25 most Upregulated miRNAs in K-hESC compared to hESC. Data are normalized on RNU48 and represented using Array Assist 4.1 software (Stratagen)

Figure 4: Role of miR-203 in epithelial cells differentiation

(A) Quantitative PCR analysis of DeltaNP63 and KRT14 expression of 10 days differentiated hESC transfected with PremiRs and AntimiRs specific of miR-203, miR-205, miR-200a and miR-429. Samples were collected and analyzed 72 hours after transfection. Results are expressed in relative expression to hESC. Data are normalized on 18S and are presented as a mean ± SD of 3 independent experiments.

(B) Schematic representation of hESC fate choice during epithelial engagement induced by BMP4 stimulation

(C) Quantitative PCR analysis of the effect of miR-203 knockdown using AntimiR-203 on pluripotency markers OCT4 and NANOG, neural progenitor marker PAX6, neural crest progeny markers SOX10 and keratinocyte lineage markers deltaNP63, KRT14 and KRT5 expression in hESC committed along epithelial lineage. Results are expressed in relative expression to hESC. Data are normalized on 18S and are presented as a mean ± SD of 3 independent experiments.

(D) Immunofluorescence of Keratin 14 in 10 days differentiated hESC derived from H9 transfected with the AntimiR-203. Nuclei staining were done with DAPI (in blue). Scale bar is 100 □m

Figure 5: Role of miR-203 in skin embryogenesis

(A) Quantitative PCR analysis of DeltaNP63, KRT10 and IVL expression during air/liquid protocol to generate *in vitro* stratified epidermis. State A correspond to the liquid phase of the protocol (unstratified epidermis), state B to the induction of the stratification process after putting human keratinocytes (HK) at the air/liquid interphase. Results are expressed in relative expression to HK. Data are normalized on 18S and are presented as a mean ± SD of 3 independent experiments.

(B) and (C) Quantitative PCR analysis of miR-203 during *in vitro* (B) and *in vivo* (C) epidermis formation. State A correspond to unstratified epidermis, state B to pluristratified epidermis. Results are expressed in relative expression to HK. Data are normalized on RNU48 and are presented as a mean ± SD of 3 independent experiments.

(D) Quantitative PCR of antimiR-203 and premiR-203 treated HK for undifferentiated (deltaNP63, KRT14) and differentiated (KRT1, KRT10 and IVL) markers of keratinocytes. Samples were analyzed 72 hours after transfection. Results are expressed in relative expression to HK. Data are normalized on 18S and are presented as a mean ± SD of 3 independent experiments.

miR-203 expression after AntimiR or PremiR treatment is represented in the boxed area. Results are expressed in relative expression to HK. Data are normalized on RNU48 and are presented as a mean ± SD of 3 independent experiments.

(E) Haematoxylin-eosin staining of organotypic epidermis constructed with untreated, PremiR-203 and AntimiR-203 treated HK

Sup Figure 1: Expression of neural mRNAs and miRNAs during epithelial differentiation

(A) Quantitative PCR analysis of PAX6 and SOX1 expression during hESC differentiation into epithelial commitment at 0, 3, 8 and 25 days of differentiation and into fully differentiated cell type such as keratinocytes (K-hESC), neural progenitor cells (NPC-hESC) and mesnchymal stem cells (MSC-hESC). Results are expressed in relative expression to hESC. Data are normalized on 18S and are presented as a mean ± SD of 3 independent experiments.

(B) Quantitative PCR analysis of neural specific miRNA miR-9. Results are expressed in relative expression to hESC. Data are normalized on RNU48 and are presented as a mean ± SD of 3 independent experiments.

Supplementary table 1: Upregulated microRNAs through hESC differentiation into Keratinocytes

List of the 25 most upregulated miRNAs in K-hESC compared to hESC. Results are expressed in relative expression to hESC. Data are normalized on RNU48 and are presented as a mean ± SD of 3 independent experiments.

Supplementary table 2: Downregulated microRNAs through hESC differentiation into Keratinocytes

List of the 25 most downregulated miRNAs in K-hESC compared to hESC. Results are expressed in relative expression to hESC. Data are normalized on RNU48 and are presented as a mean ± SD of 3 independent experiments.

Supplementary table 3: Quantitative PCR primers

REFERENCES

Aberdam D, Gambaro K, Rostagno P et al. (2008). Key role of p63 in BMP-4-induced epidermal commitment of embryonic stem cells. Cell Cycle 6:291-4

Bernstein E, Kim SY, Carmell MA et al. (2003). Dicer is essential for mouse development. Nat Genet 35:215-7

Blanpain C, Fuchs E (2009). Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. Nat Rev Mol Cell Biol 10:207-17

Boutz PL, Chawla G, Stoilov P et al. (2007). MicroRNAs regulate the expression of the alternative splicing factor nPTB during muscle development. Genes Dev 21:71-84

Brennecke J, Hipfner DR, Stark A et al. (2003). Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila. Cell 113:25-36

Candi E, Terrinoni A, Rufini A et al. (2006). p63 is upstream of IKK alpha in epidermal development. J Cell Sci 119:4617-22

Chambers SM, Fasano CA, Papapetrou EP et al. (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. Nat Biotechnol 27:275-80

Chen JF, Mandel EM, Thomson JM et al. (2006).The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. Nat Genet 38:228-33

Gregory PA, Bert AG, Paterson EL et al. (2008). The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. Nat Cell Biol 10:593-601

Guenou H, Nissan X, Larcher F et al. (2007). Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study. Lancet 374:1745-53

Hinton A, Afrikanova I, Wilson M et al. (2009). A Distinct MicroRNA Signature for Definitive Endoderm Derived From Human Embryonic Stem Cells. Stem Cells Dev Oct 6 [Epub ahead of print]

Hobert O (2006). Architecture of a microRNA-controlled gene regulatory network that diversifies neuronal cell fates. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 71:181-8

Jannot G, Simard MJ (2006). Tumour-related microRNAs functions in Caenorhabditis elegans.

Johnson SM, Grosshans H, Shingara J et al. (2005). RAS is regulated by the let-7 microRNA family. Cell 120:635-47

Korpal M, Lee ES, Hu G et al. (2008). The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. J Biol Chem 283:14910-4

Leaman D, Chen PY, Fak J et al. (2005). Antisense-mediated depletion reveals essential and specific functions of microRNAs in Drosophila development. Cell 121:1097-108

Lee RC, Ambros V (2001). An extensive class of small RNAs in Caenorhabditis elegans. Science 294:862-4

Lena AM, Shalom-Feuerstein R, Rivetti di Val Cervo P et al. (2008). miR-203 represses 'stemness' by repressing DeltaNp63. Cell Death Differ 15:1187-95

Makeyev EV, Zhang J, Carrasco MA et al. (2007). The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. Mol Cell 27:435-48

Martello G, Zacchigna L, Inui M et al. (2007). MicroRNA control of Nodal signalling. Nature 449:1

Mateizel I, De Becker A, Van de Velde H et al. (2008). Efficient differentiation of human embryonic stem cells into a homogeneous population of osteoprogenitor-like cells. Reprod Biomed Online 16:741-53

Mills AA, Zheng B, Wang XJ et al. (1999). p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis. Nature 398:708-13

Navarro F, Gutman D, Meire E et al. (2009). miR-34a contributes to megakaryocytic differentiation of K562 cells independently of p53. Blood 114:2181-92

Neilson JR, Zheng GX, Burge CB et al. (2007).Dynamic regulation of miRNA expression in ordered stages of cellular development. Genes Dev 21:578-89

Okuyama R, Tagami H, Aiba S (2008). Notch signaling: its role in epidermal homeostasis and in the pathogenesis of skin diseases. J Dermatol Sci 49:187-94

Oncogene 25:6197-201

Perrier AL, Tabar V, Barberi T et al. (2004). Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 101:12543-8

Poumay Y, Dupont F, Marcoux S et al. (2004). A simple reconstructed human epidermis: preparation of the culture model and utilization in *in vitro* studies. Arch Dermatol Res 296:203-11

Rinne T, Brunner HG, van Bokhoven H (2007). p63-associated disorders., Cell Cycle 6:262-8

Ronshaugen M, Biemar F, Piel J et al. (2005). The Drosophila microRNA iab-4 causes a dominant homeotic transformation of halteres to wings. Genes Dev 19:2947-52

Sand M, Gambichler T, Sand D et al. (2009). MicroRNAs and the skin: tiny players in the body's largest organ. J Dermatol Sci 53:169-75

Sossey-Alaoui K, Bialkowska K, Plow EF (2009). The miR200 family of microRNAs regulates WAVE3-dependent cancer cell invasion. J Biol Chem 284:33019-29

Takaya T, Ono K, Kawamura T et al. (2009). MicroRNA-1 and MicroRNA-133 in spontaneous myocardial differentiation of mouse embryonic stem cells. Circ J 73:1492-7

Truong AB, Kretz M, Ridky TW et al. (2006). p63 regulates proliferation and differentiation of developmentally mature keratinocytes. Genes Dev 20:3185-97

Visvanathan J, Lee S, Lee B et al. (2007). The microRNA miR-124 antagonizes the anti-neural REST/SCP1 pathway during embryonic CNS development. Genes Dev 21:744-9

Wang Y, Medvid R, Melton C et al. (2007). DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. Nat Genet 39:380-5

Yi R, O'Carroll D, Pasolli HA et al. (2006). Morphogenesis in skin is governed by discrete sets of differentially expressed microRNAs. Nat Genet 38:356-62

Yi R, Poy MN, Stoffel M et al. (2008). A skin microRNA promotes differentiation by repressing 'stemness'. Nature 452:225-9

Yu J, Ryan DG, Getsios S et al. (2008). MicroRNA-184 antagonizes microRNA-205 to maintain SHIP2 levels in epithelia. Proc Natl Acad Sci U S A 105:19300-5

FIGURE 1

NISSAN et al.

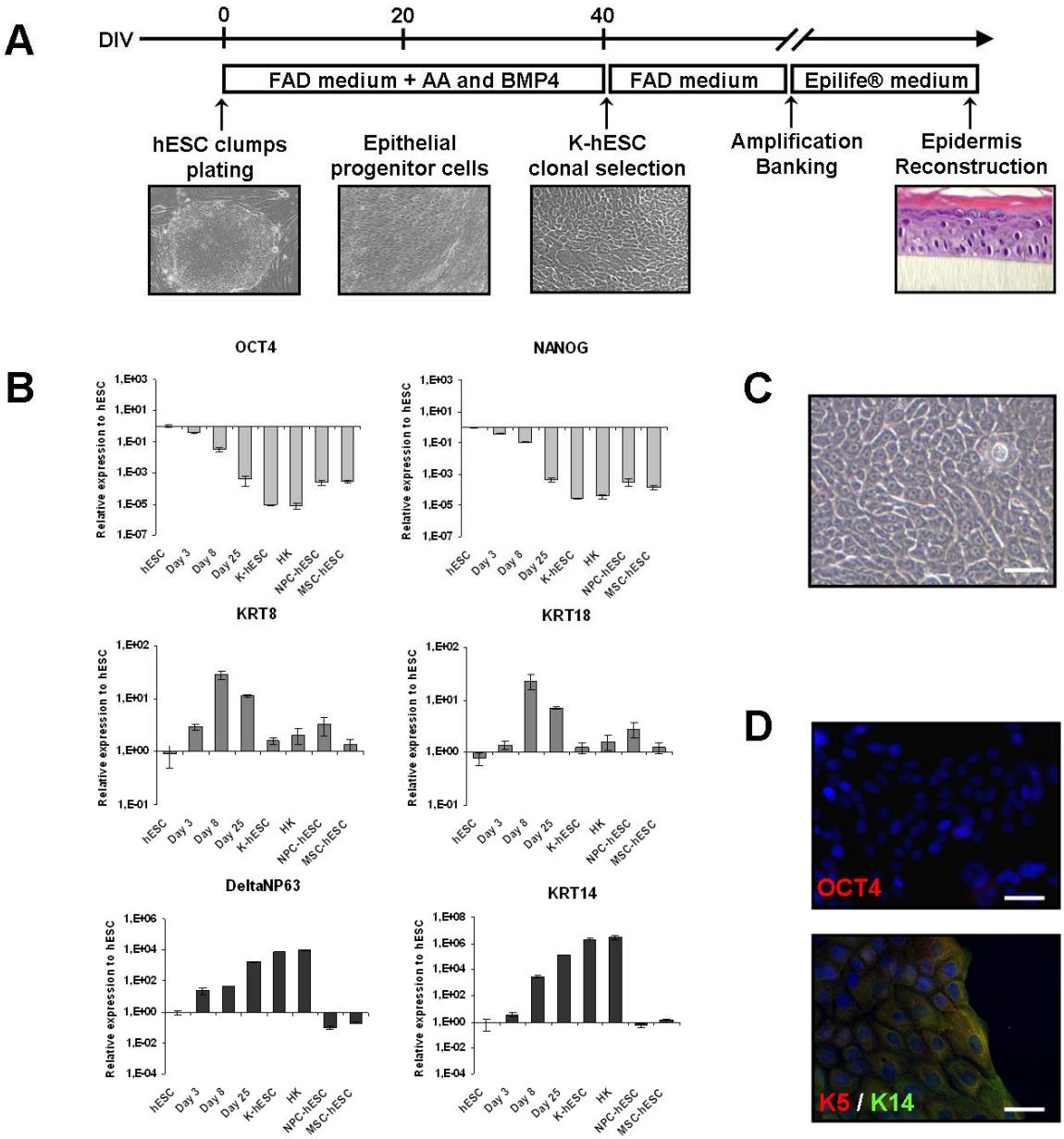


FIGURE 2

NISSAN et al.

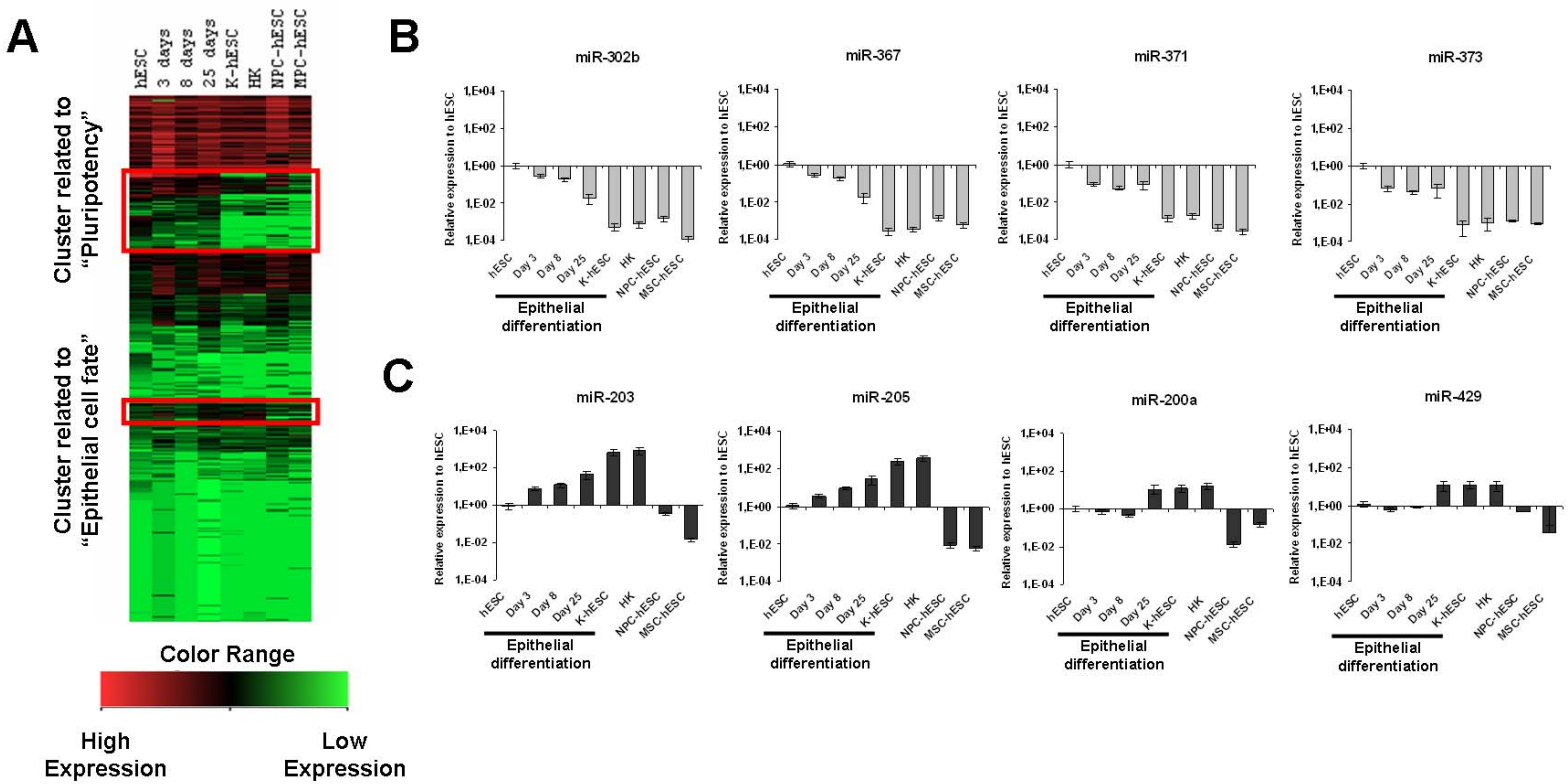


FIGURE 3

NISSAN et al.

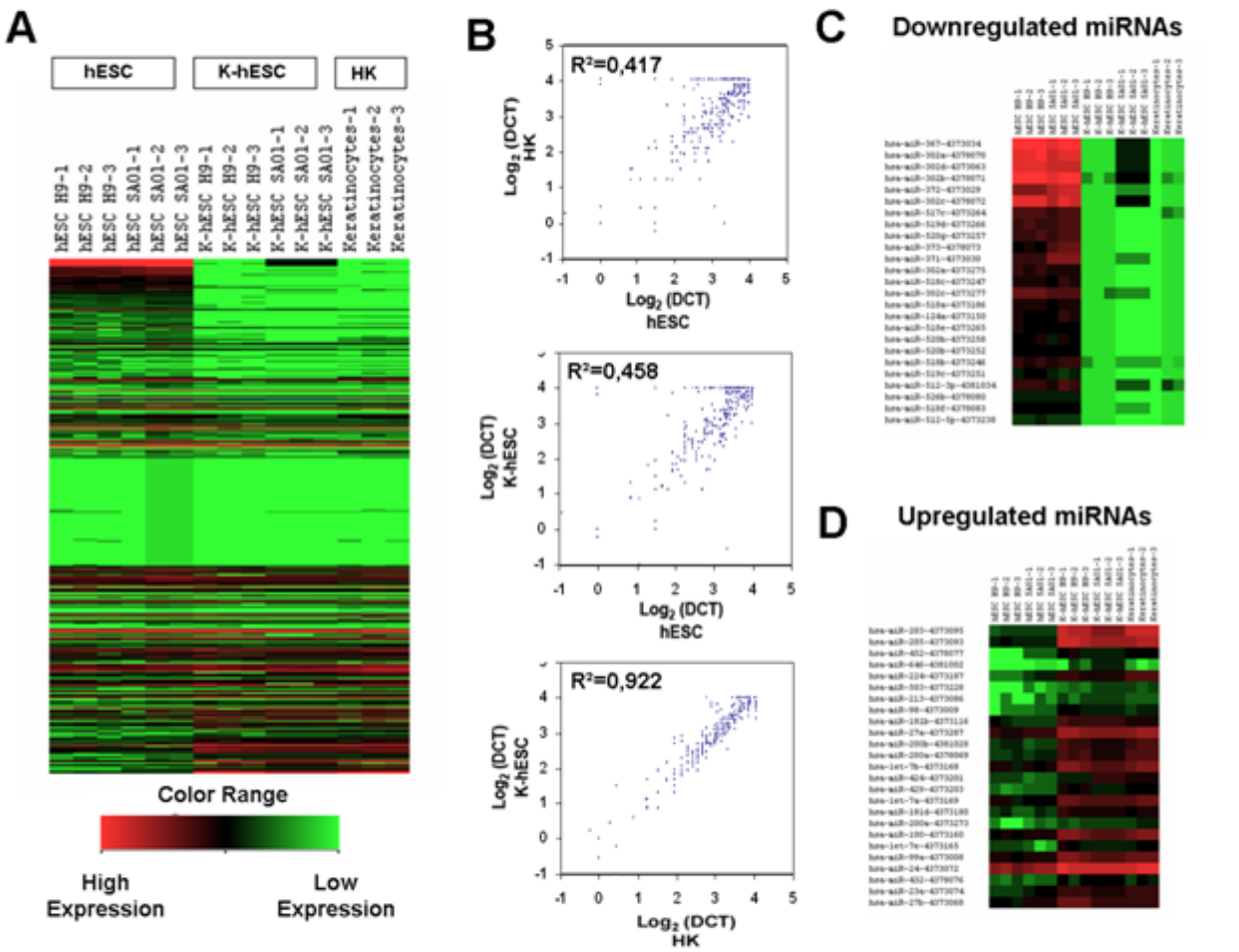


FIGURE 4

NISSAN et al.

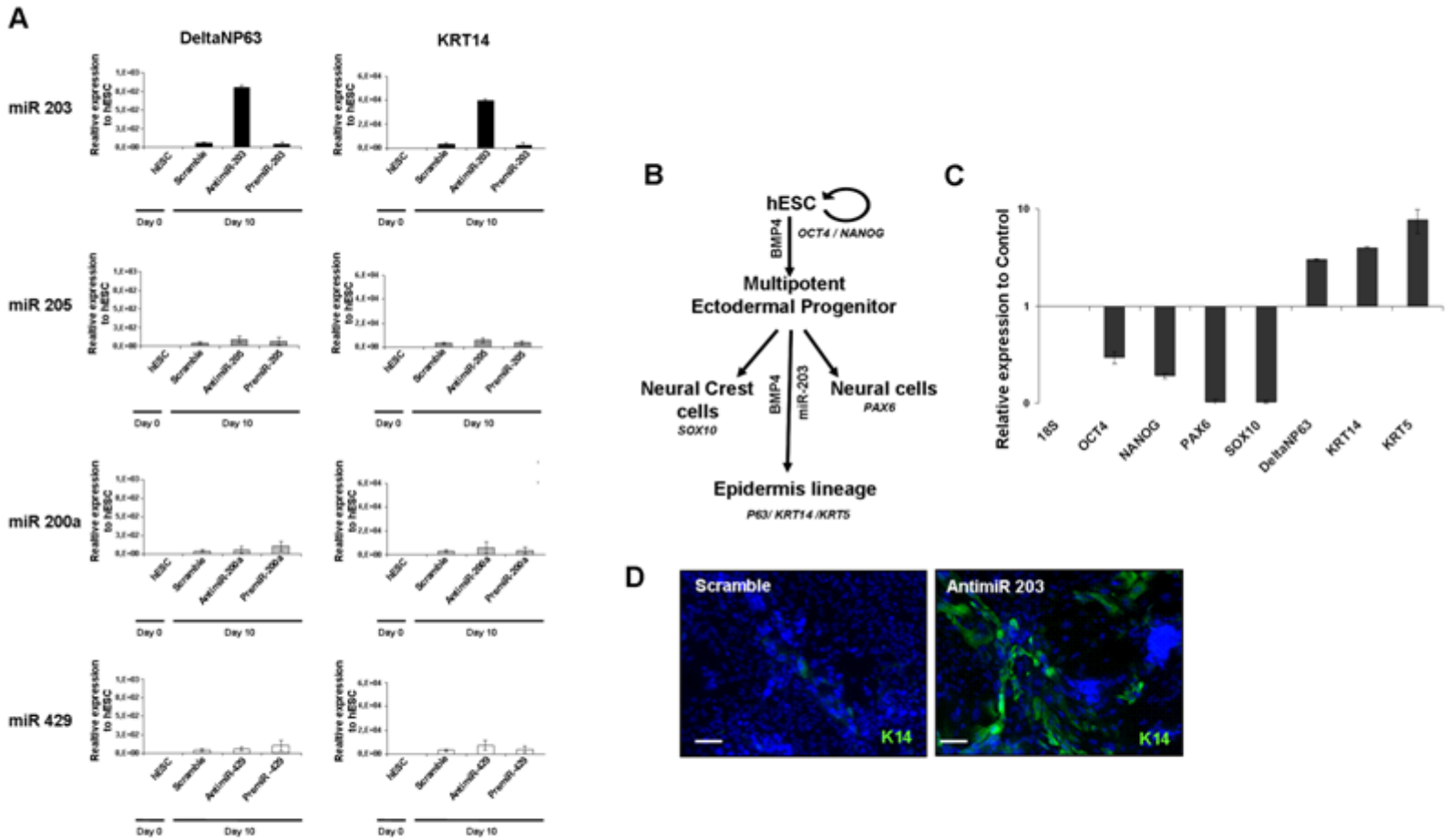
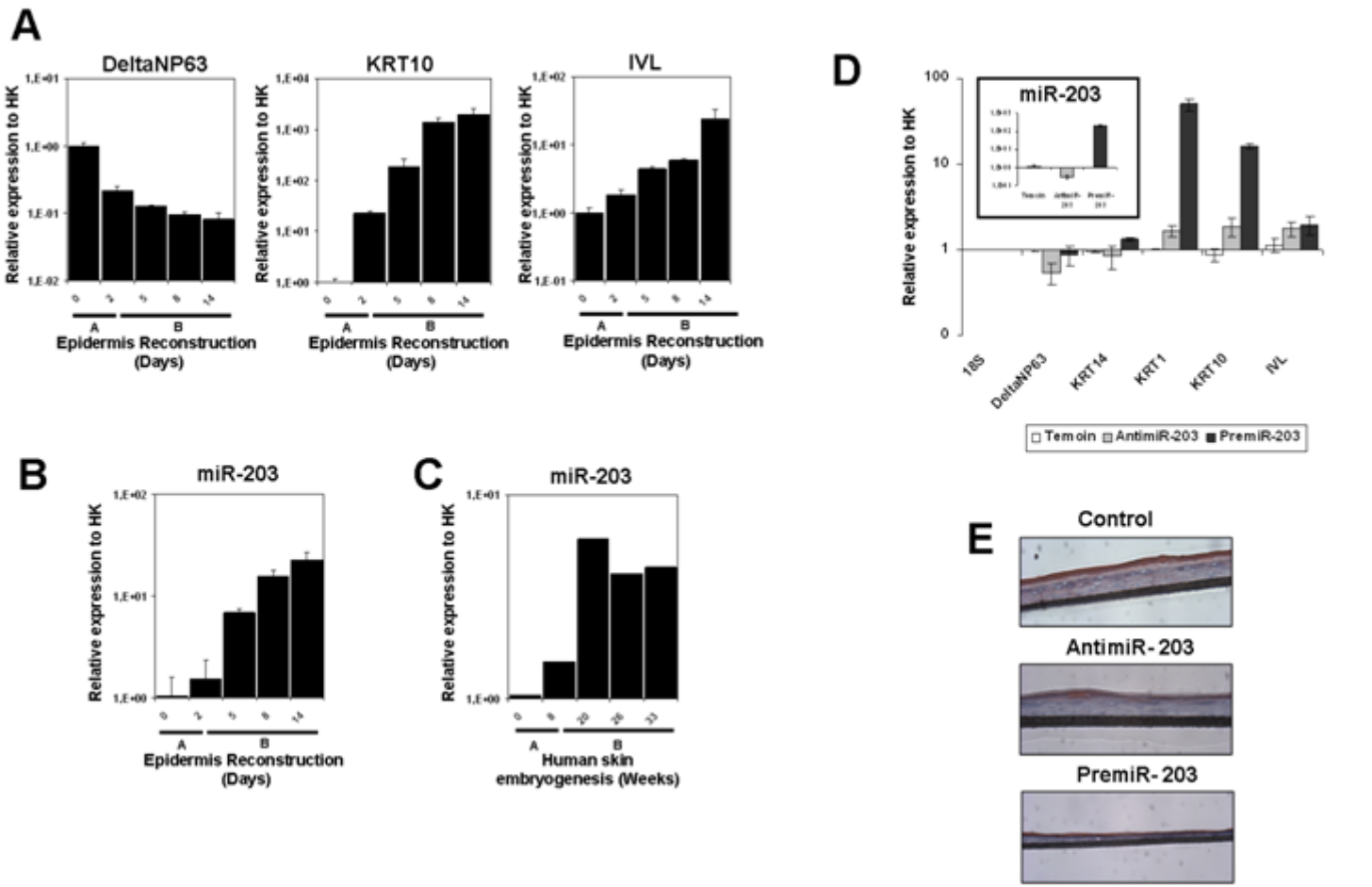


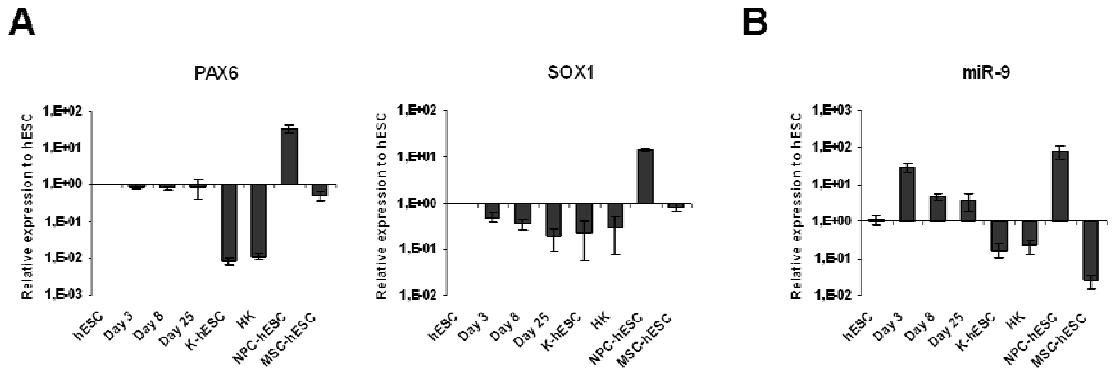
FIGURE 5

NISSAN et al.



SUP FIGURE 1

NISSAN et al.



SUP TABLE 3

NISSAN et al.

Gene Name	Ref	Forward primer	Reverse primer
18S	NM_022551.2	GAGGATGAGGTGGAACGTGT	TCTTCAGTCGCTCCAGGTCT
NANOG	NM_024865.2	CAAAGGCAAACAACCCACTT	TCTGCTGGAGGCTGAGGTAT
OCT4	NM_002701.4	CTTGCTGCAGAAGTGGGTGGAGGAA	CTGCAGTGTGGGTTTCGGGCA
KRT18	NM_199187.1	GAGTATGAGGCCCTGCTGAACATCA	GCGGGTGGTGGTCTTTTGGAT
KRT8	NM_002273	GATCGCCACCTACAGGAAGCT	ACTCATGTTCTGCATCCCAGACT
KRT14	NM_000526.3	GGCCTGCTGAGATCAAAGACTAC	CACTGTGGCTGTGAGAATCTTGTT
KRT5	NM_000424.3	ATCTCTGAGATGAACCGGATGATC	CAGATTGGCGCACTGTTTCTT
PAX6	NM_000280.3	GCCAGCAACACACCTAGTCA	TGTGAGGGCTGTGTCTGTTC
SOX1	NM_005986.2	GATGCACAACTCGGAGATCA	GTCCTTCTTGAGCAGCGTCT
DeltaNP63	NM_001114980.1	GGAAACAATGCCCAGACTC	GTGGAATACGTCCAGGTGGC
KRT1	NM_006121.3	GATGAAATCAACAAGCGGACAA	TGGTAGAGTGCTGTAAGGAAATCAATT
KRT10	NM_000421.3	TGGTTCAATGAAAAGAGCAAGGA	GGGATTGTTTCAAGGCCAGTT
IVL	NM_005547.2	ACCCATCAGGAGCAAATGAAA	GCTCGACAGGCACCTTCTG

SUP TABLE 1

NISSAN et al.

miRNAs upregulated upon hESC differentiation into Keratinocytes

	hESC H9		hESC SA01		K-hESC H9		K-hESC SA01		HK		NPC	MSC
miRNAs ID	Average	SD	Average	SD	Average	SD	Average	SD	Average	SD	Average	Average
hsa-miR-203	1	0	1	0	706	44	128	3	1110	62	0	0
hsa-miR-205	1	1	1	0	374	79	105	1	161	49	0	0
hsa-miR-452	0	0	6	0	49	25	22	2	44	2	14	38
hsa-miR-224	0	0	2	1	21	7	12	1	52	3	4	22
hsa-miR-189	2	2	1	0	21	19	2	0	4	5	6	8
hsa-miR-200a	1	0	1	0	20	9	6	0	23	1	0	0
hsa-miR-200b	2	0	1	0	20	11	7	0	21	6	0	0
hsa-miR-646	1	0	1	0	19	22	102	7	3	3	1	11
hsa-let-7b	1	1	1	0	19	7	5	0	17	5	1	1
hsa-miR-429	1	1	1	0	19	9	5	0	11	0	0	0
hsa-miR-98	1	1	2	1	17	6	9	1	8	2	7	9
hsa-miR-27a	1	0	1	0	16	6	9	0	14	4	3	8
hsa-miR-100	1	0	1	0	16	5	4	0	14	4	50	131
hsa-miR-181b	2	1	1	0	15	8	10	0	5	0	112	18
hsa-miR-99a	1	0	1	0	14	5	4	0	9	1	46	118
hsa-miR-213	2	2	3	4	13	9	15	1	8	0	85	29
hsa-let-7e	8	0	1	1	13	10	6	0	8	2	14	5
hsa-miR-27b	1	0	2	0	12	2	3	0	3	0	4	3
hsa-let-7a	1	1	1	0	11	4	7	0	10	3	4	6
hsa-miR-181d	1	1	1	1	11	6	7	0	6	2	79	26
hsa-miR-330	1	1	1	1	10	7	4	0	3	1	5	3
hsa-miR-642	2	2	1	0	10	10	2	0	7	2	6	4
hsa-miR-23a	1	0	2	0	9	2	4	0	9	0	1	8
hsa-miR-135b	2	0	1	0	9	5	1	0	3	0	1	0
hsa-miR-24	1	1	1	0	9	5	6	0	9	3	2	5
hsa-miR-200a	1	2	3	2	9	4	9	0	14	4	0	2

SUP TABLE 2

NISSAN et al.

miRNAs Downregulated upon hESC differentiation into Keratinocytes

	hESC H9		hESC SA01		K-hESC H9		K-hESC SA01		HK		NPC	MSC
miRNAs ID	Average	SD	Average	SD	Average	SD	Average	SD	Average	SD	Average	Average
hsa-miR-367	1,19	0,10	0,86	0,23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
hsa-miR-302a	1,38	0,50	0,77	0,20	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
hsa-miR-302c	1,42	0,11	0,80	0,48	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
hsa-miR-302d	1,42	0,11	0,71	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
hsa-miR-302b	1,19	0,09	0,86	0,23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
hsa-miR-372	0,42	0,03	2,44	0,88	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
hsa-miR-371	0,35	0,03	2,85	0,27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
hsa-miR-517c	1,19	0,09	0,87	0,23	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
hsa-miR-520g	0,98	0,36	1,09	0,26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
hsa-miR-519d	1,01	0,47	1,09	0,26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
hsa-miR-512	1,00	0,08	1,13	0,67	0,00	0,00	0,03	0,00	0,02	0,03	0,01	0,00
hsa-miR-373	0,36	0,16	3,07	0,81	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
hsa-miR-302a	1,32	0,47	0,80	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
hsa-miR-518c	1,00	0,07	1,13	0,66	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
hsa-miR-518a	1,19	0,10	0,86	0,22	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
hsa-miR-302c	1,42	0,11	0,71	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
hsa-miR-124a	0,86	0,43	1,43	0,84	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,13	0,00
hsa-miR-518e	1,21	0,09	0,89	0,06	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00
hsa-miR-520h	1,15	0,41	1,02	0,59	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05
hsa-miR-520b	1,00	0,08	1,01	0,09	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
hsa-miR-518f	1,00	0,08	1,01	0,08	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
hsa-miR-518b	1,11	0,30	0,97	0,25	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01
hsa-miR-519c	1,54	0,47	0,71	0,30	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,01
hsa-miR-526b	0,99	0,00	1,02	0,09	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,01
hsa-miR-520a	0,84	0,08	1,22	0,31	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,02	0,01
hsa-miR-512	1,17	0,41	0,89	0,07	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,02	0,01

IV. Régulation de l'engagement neural des cellules hES par miR-125a

Titre de l'article : MiR 125a acts in conjunction with BMP and Activin/Nodal inhibitors to promote early neural specification of human embryonic stem cells

Auteurs: Xavier Nissan, Laetitia Aubry, Claire Boissart, Anselme Perrier, MarcPeschanski and Alexandra Benchoua

A ce jour, les études décrivant des protocoles d'induction neurale reposent sur la formation de corps embryoides ou la coculture des cellules hES avec des cellules stromales murines de moelle osseuse (MS5 ou PA6). Ces deux systèmes se révèlent toutefois limités quant à leur reproductibilité et l'homogénéité des cellules produites. Un premier système permettant d'induire la différenciation neurale des cellules hES en monocouche adhérente a été dérivée dans le laboratoire du Pr Austin Smith par le Dr Alexandra Benchoua (Lowell S et al., 2006 ; Pollard SM et al., 2006) en adaptant le protocole décrit pour les cellules de souris (Ying QL et al., 2003). Ce système a ensuite été optimisé lors de son arrivée à ISTEM en introduisant deux inhibiteurs des voies BMP et Activin/Nodal, Noggin et SB431542. Cette méthode, a donnée lieu à un dépôt de brevet le 5 Décembre 2008 alors qu'était publié en Mars 2009 par l'équipe du Pr Lorenz Studer un protocole très proche (Chambers SM et al., 2009) .L'utilisation combinée de Noggin et du SB431254 a pour but de potentialiser l'induction neurale et ainsi obtenir des rosettes neurales contenant les précurseurs neuro-epithéliaux (NEP) de manière robuste, rapide et reproductible sans nécessité de coculture. L'utilisation d'un système en monocouche adhérente permet en plus de suivre en cinétique, de manière précise, les événements morphologiques et moléculaires aboutissant à l'engagement synchronisé des cellules dans la voie neurale. Nous avons donc utilisé ce protocole d'induction dans le but d'identifier des microARNs impliqués dans le contrôle des premières étapes de l'engagement neural des cellules hES. Cette étude, actuellement en cours de publication, a permis de mettre en évidence le rôle de miR-125a dans la promotion de l'engagement neural des cellules hES.

A. Induction neurale des cellules hES en milieu « N2B27 » *in vitro*.

Le protocole de différenciation dit « par défaut » aboutit à la conversion efficace mais non optimale car non synchronisée des hES en cellules NEP. Nous avons ainsi déterminé qu'en fonction des lignées de cellules hES utilisées, entre 30% et 80% des cellules hES s'engageaient dans le lignage neural à 8jours de différenciation en milieu N2B27 (Figure 1A et 1B). L'analyse immunocytochimique de ces cultures cellulaires révèle ainsi la présence de cellules hES indifférenciées (Oct4+/Sox2+), de cellules neurales (Oct4- /Sox2+/Pax6+), et de cellules neurales engagées dans un lignage non neural (Oct4-/Sox2-/Pax6-) (Figure 1C). Ces résultats indiquent que les populations cellulaires obtenues après 8 jours de culture en milieu

« N2B27 » sont globalement très hétérogènes, même si des cellules neurales y sont clairement identifiables.

B. Effets des inhibiteurs Noggin et SB431254 sur l'induction neurale des hES *in vitro*.

Les Dr Alexandra Benchoua et Laetitia Aubry ont dans un premier temps cherché à optimiser les conditions expérimentales en identifiant les voies de signalisation impliquées dans le développement neural et ainsi en déduire les facteurs permettant son induction. Plusieurs voies de signalisation ont été identifiées comme promotrices de l'induction neurale chez les vertébrés, en particulier la voie des FGFs (Fibroblast growth factor), la voie de signalisation Wnt, l'acide rétinoïque, Notch, alors qu'en parallèle la non activation des voies dépendantes membres de la famille des TGFβ tels que les BMPs (Bone Morphogenetic Protein) et la voie Activin/Nodal (Gaulden J, Reiter JF, 2008) semble nécessaires. Dans notre contexte expérimental, le blocage actif de la voie Activin/Nodal par le SB431542 et de la voie BMP par Noggin suffit à synchroniser de manière optimale l'induction neurale (Figure 1C). Nous avons ensuite cherché à étudier l'effet de deux de leurs inhibiteurs respectifs Noggin et SB431542 sur la transformation phénotypique des cellules hESC en précurseurs neuraux. L'analyse phénotypique des cellules traitées avec Noggin et SB431542, seuls ou en combinaison indique que la double induction Noggin +SB431542 permet de produire de manière extrêmement reproductible prés de 90% de cellules hES engagées dans le lignage neural. L'analyse immunocytochimique des cultures cellulaires traitées uniquement avec la protéine Noggin révèle la présence de cellules hES indifférenciées (Oct4+/Sox2+), de cellules neurales (Oct4- /Sox2+ et Oct4-/Pax6+), et de cellules engagées dans un lignage non neural (Oct4-/Sox2- et Oct4-/Pax6-) (Figure 2A et B) alors que la culture des cellules en présence des deux antagonistes, Noggin et SB431542 permet d'obtenir plus de 90% de cellules neurales exprimant Pax6 mais n'exprimant plus Oct4 (Figure 1C). L'analyse transcriptionelle réalisée par qPCR démontre également une augmentation significative dans les cellules traitées au Noggin et SB431542 du niveau d'expression des marqueurs neuraux PAX6 et SOX1 parallèlement à une diminution d'expression des marqueurs non neuraux (FOXA1, FLK1, CDX2, EOMES), de la voie épithéliale (KRT18 et ΔNp63) et que des marqueurs caractéristiques de l'état indifférencié (OCT4 et NANOG), en comparaison avec les autres conditions (Figure 2). De manière intéressante, le traitement au SB431542 seul permet d'engager les cellules dans la voie ectodermique mais non neurale puisque ces cellules surexprimant spécifiquement les marqueurs épithéliaux, (KRT18 et ΔNp63) et les marqueurs des crêtes neurales (SOX10 et SLUG) (Figure 2), ces résultats ayant été confirmé par

l'analyse immunocytochimique avec l'observation d'un nombre important de cellules exprimant la Kératine 18 et PAX3 (Figure 3).

C. Etude du rôle des microARNs dans l'induction neurale des hES *in vitro*.

Ayant mis un point un protocole permettant d'obtenir près de 90% de cellules engagées dans le lignage neural, nous avons cherché à délimiter la fenêtre temporelle au cours de laquelle les cellules hES, sous l'effet des deux inhibiteurs, ont induit leur processus de différenciation. C'est ainsi que l'analyse par PCR quantitative du profil d'expression des cellules hES dans les premiers jours de différenciation a démontré que l'engagement cellulaire se produisaient entre le 2ème et le 5ème jour d'induction (Figure 4). C'est donc dans ces temps très précoces que les cellules hES traitées avec les deux inhibiteurs des Smads (Noggin et SB431542) s'engagent dans le processus de différenciation neurale, caractérisée par la surexpression des marqueurs de la progenie neurale PAX6 et SOX1). A l'inverse c'est également à ce temps précis que les cellules traitées au SB431542 commencent à surexprimer les marqueurs épithéliaux. La fenêtre décisionnelle étant déterminée, nous avons dans deuxième temps cherché à déterminer quels microARNs étaient modulés au moment de la prise de décision (Figure 5). Contrairement aux expériences réalisées dans l'article précédent sur la mise en évidence de microARNs impliqués dans la différenciation épithéliale, nous n'avons pas utilisé d'approche à haut débit mais une approche « gènes candidats » en l'occurrence « miR candidat » C'est ainsi que nous avons sélectionné les microARNs spécifiquement exprimés dans le tissus neural (miR-9, miR- 124 et miR-125a et b) et dans le tissus épithélial (miR-203, miR-205) et dans les cellules hES indifférenciées (miR-302). Une fois cette liste déterminée, nous avons suivi l'évolution de leurs expressions dans les différentes conditions décrites précédemment. Nous avons ainsi déterminé que les microARNs spécifiques des cellules neurales, miR-9 et miR-124, n'étaient pas directement impliquées dans cette prise de décision puisque leurs profils d'expression ne montrent aucune différence entre les traitements pharmacologiques. Ces données sont toutefois en accord avec celles décrites dans la littérature puisque ces deux microARNs ont été mis en évidence pour contrôler des prises de décisions plus tardive dans la formation du système nerveux central (Yoo AS et al., 2009 ; Kapsimali M et al 2007) A l'inverse miR-125a et b ont été identifiés comme étant des potentiels régulateurs puisqu'ils présentent tous les deux la particularité d'être surexprimés transitoirement au moment de cette prise de décision et uniquement dans la condition doublement traités au Noggin et SB431542. Afin de valider un rôle de ces deux isoformes dans l'induction neurale, nous avons effectué une analyse fonctionnelle durant le processus de différenciation en réalisant des études de perte et de gain de fonction de ces deux microARNs candidats. C'est ainsi que nous avons déterminé que l'inhibition de miR-125a à l'aide d'un Antimir ciblé introduit dans les cellules

hES entrainait un blocage partiel du processus de différenciation à 8 jours caractérisé par la diminution significative du nombre de cellules neurales produites (Sox2+/Oct4 et Nestin+) (Figure 6A et B). L'analyse immunocytochimique confirme que miR-125 participe à l'induction neurale des cellules hES puisque son inhibition provoque une diminution importante du nombre de cellules exprimant la protéine PAX6 (Figure 6C)

L'ensemble de ces résultats sont présentés dans l'article qui suit.

D. Conclusion.

L'ensemble de ces résultats démontre que la différenciation des cellules hES en milieu «N2B27» complémenté avec les deux inhibiteurs respectifs de la voie BMP et de la voie Activin/Nodal, Noggin et SB431542, permet d'induire de manière efficace et reproductible la spécification des cellules hES vers la voie neurale. Nous avons démontré à travers cette étude que la prise de décision dans l'engagement neural des cellules hES était comprise entre 2 et 5 jours et qu'un microARN, miR-125a, était directement impliqué dans le contrôle de ce processus. A ce jour et à notre connaissance, il s'agit de la première étude réalisée sur des cellules hES démontrant un rôle fonctionnel d'un microARN dans le contrôle de leur différenciation vers la voie neurale.

MiR 125a acts in conjunction with BMP and Activin/Nodal inhibitors to promote early neural specification of human embryonic stem cells

Xavier Nissan[1,2], Laetitia Aubry[1], Claire Boissart[1,2], Anselme Perrier[1], Marc Peschanski[1] and Alexandra Benchoua[1,2§]

[1]INSERM/UEVE U861, I-STEM, AFM, Evry cedex, France, [2] CECS, I-STEM, Evry cedex France. [§] To whom correspondence should be addressed.

Correspondance:

Dr Alexandra BENCHOUA, PhD

ISTEM/CECS, UMR INSERM 861, Genopole campus 1, 5, rue Henri Desbruères, 91030 Evry Cedex

Tel: 33 1 69908540, Facsimile : 33 1 69908521,

e-mail: abenchoua@istem.genethon.fr

Journal section: Cellular and Molecular

Abbreviated title: Regulation of neural commitment by TGF-beta family member antagonists

Number of Figures: 6

Number of tables: 2

Supplementary figures: 3

Number of pages: 19

Words in abstract: 228

Words in introduction: 493

Words in discussion: 1481

Key words: Embryonic stem cells, neural commitment, TGF-beta antagonists, micro-RNA, *Niche*, neural stem cells.

Abbreviations: BMP: Bone Morphogenetic Protein, EC: Embryonal Carcinoma, ERK: Extra-cellular signal-Regulated Kinase, ES: Embryonic Stem, FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting, FGF: Fibroblast Growth factor, hESC: human Embryonic Stem Cells, KSR: Knock-out Serum Replacement, TGF: Transforming Growth factor.

Acknowledgements: The authors thank Dr Nathalie Lefort for assistance with FACS, Alexandra Alarza, Alexandra Plancheron, Pauline Georges and Aurélie Poulet for technical support. Dr Christine Baldeschi kindly helped with the epidermal lineage experiments and Dr Karen Sermon provided the VUB01 cell line. We are grateful to Dr Jason Wray, Dr Sally Lowell and Dr Steve Pollard for their comments and careful reading of the paper.

This study has been supported in part by additional grants from Medicen Paris Region (IngeCELL), ANR (He-Screen), the Regional Council Ile de France (SESAME) and the Essonne district council (ASTRE).

Abstract:

Fate decisions of pluripotent embryonic stem cells are subtly controlled by a balance between activation and repression of lineage-specific genes. If a role of the cellular environment is known to be instrumental, how it coordinates cell decisions is often unclear. Here, we have used human embryonic stem cells to understand how the decision to turn into neural cells is taken. We have confirmed that inhibitors of Activin and BMP-dependent pathways induced efficient neural commitment of hES cells but show that each acts on different, complementary mechanisms. While the Activin inhibitor SB431542 is necessary to pre-commit the cells to the ectodermic fate, the BMP inhibitor Noggin is instrumental in restricting the fate choice to the neural lineage. We then took advantage of this system to differentially identified microRNAs specifically involved in the very first step of entry into the neural lineage. The two inhibitors repress different sets of miRNA involved in maintenance of embryonic stem cells self-renewal or in their commitment to the epidermal lineage. In parallel, their joined action activates several candidates miRNAs shown to be expressed in the foetal brain but only one, miR-125a, is essential in promoting the very early neural commitment of pluripotent embryonic stem cells. MiR-125a thus appears as a link between extra-cellular environmental signals triggering neural commitment and the genes, the expression of which is necessary for the cellular response to these signals.

Introduction

Formation of early embryonic tissues is the result of a tightly controlled sequence of events that associate environmental signals and intracellular molecular mechanisms. The cellular environment, or *niche* plays an instrumental role, in particular via secreted molecules that coax progenitors or stem cells toward a specific lineage. In the neural system, the earliest precursor cells are found in the neurectoderm, a tissue that derives from the central part of the primitive ectoderm just after the appearance during gastrulation of mesodermal structures called organizer, like the notochord (Harland, 2000). Molecular actors involved in the promotion of this phenomenon so that all the pluripotent stem cells enter synchronously the neural lineage are still to be clearly identified.

Noggin, an antagonist of the *Bone Morphogenetic Protein* (BMP) receptors, was one of the first instructive secreted proteins identified as crucial during the formation of the neurectoderm. Noggin is secreted by the cells of the notochord and, by blocking BMP-dependent pathways, induces the surrounding ectodermic cells to adopt a more specialized neural fate ending up in the formation of the neural plate (Smith and Harland, 1992; Lamb et al., 1993; Zimmerman et al., 1996). However, it has recently emerged that inhibition of BMP-dependent pathways by their endogenous inhibitors Noggin, Follistatin or Chordin, is not sufficient to completely induce neuralisation in vertebrates. A wider blockage of pathways that activate the transcription factors of the Smad family is required. In addition to BMP-dependent pathways, which signal through a Smad1/5-dependent cascade, this includes the Activin/Nodal pathway which signals through a Smad 2/3-dependent cascade (Bell et al., 2003; Linker and Stern, 2004; Chang and Harland, 2007; Wrighton et al., 2009).

An experimental model in which the action of these molecular factors could be studied has, however, long remained elusive, in particular in the Human. Recently, however, Chambers and collaborators (Chambers et al., 2009) have used embryonic stem cells in order to explore those phenomena and showed that the dual inhibition of both Activin/nodal and BMP pathways was necessary for early neural commitment, opening the path for further deciphering of the precise molecular targets of these environmental signals.

Here, we have built up on this pioneering study to further define the mechanisms involved in early neural commitment. We have first distinguish the separate contribution of each type of inhibition on the phenotypic transition leading from hESC to neuro-epithelial cells, in order to assign to each of them one discrete set of mechanisms unable, by itself, to trigger efficient neuralisation. On this basis, we have focused our interest on microRNAs that could link the effects of the environmental signals and the triggering of a genetic program of neuralization, since these small non-coding ARNs have been identified over the past years as key regulators

of the embryonic development (Chua et al., 2009; Fineberg et al., 2009). We show that the neural commitment triggered by the combined action of inhibitors of BMP and Activin/Nodal pathways is linked to the discrete expression of one essential microRNA, miR-125a.

Materials and Methods

Human ES cell culture

SA-01 (XY, passages 30-83, Cellartis AB, Sweden), H9 (XX, passages 34-76, WiCell Research Institue Madison, WI, USA), VUB01 (Mateizel et al., 2006) (XY, passages 85-150 AZ-VUB, Belgium) and Hues-24 (XY, passages 25-45, Dr D Melton's laboratory, Harvard) embryonic stem cell lines were maintained on a layer of mitotically inactivated murine embryonic STO fibroblasts for a variable number of passages. Manual dissection was routinely used to passage the cells rather than enzymatic methods. The hES cells were cultured in DMEM/F12 glutamax supplemented with 20% knockout serum replacement, 1 mM nonessential amino acids, 1% penicillin/streptomycin, 0.55 mM 2-mercaptoethanol and 5 ng/ml recombinant human FGF2 (all from Invitrogen, Cergy Pontoise, France) . Cultures were fed daily and passaged every 5-7 days.

Human ES cell neural differentiation and treatments with antagonists/ inhibitors

Neural differentiation was performed as described in (Lowell et al., 2006) with some modifications. ES cell cultures were washed once in PBS then ES cell medium was changed for the differentiation medium composed of N2B27 medium (Ying et al., 2003) supplemented with FGF2 (5ng/ml). ES cells were manually detached from the feeder-layer, collected in N2B27 and transferred to a low attachment Petri dish in order to fully remove them from the influence of the feeders. Cells were finally seeded on Poly-ornithine and Laminin (Sigma, St. Louis, Missouri, United States) coated tissue culture multiwell plates. The Rock inhibitor Y27632 (Calbiochem, San Diego, California, USA) was used at 10µM at the time of plating to optimize cell survival and seeding. Differentiation medium was changed after 24h then every other day. Where indicated, Human recombinant Noggin (300 ng/ml, Peprotech, London, UK) and SB431542 (20µM, Tocris Biosciences, Ellisville, Missouri, USA) were added from day 0, then in every medium change.

Immunostaining

Cells were fixed in 4% paraformaldehyde and incubated for 10 min in blocking buffer (PBS, 3% goat serum, and 0.1% Triton X-100). Primary antibodies (see supplementary table 1) were diluted in blocking buffer and applied overnight at 4°C. After three washes in PBS, secondary antibodies conjugated to Alexa fluorophores (Molecular Probes, Eugene, Oregon, United States) were diluted at 1:1,000 in blocking buffer and applied for 1 h at room temperature. The cells were washed at least three times in PBS and visualised on a Zeiss inverted fluorescence microscope. For nuclear counter staining, cells were incubated in 10 µg/ml DAPI (Sigma,) for 10 min after immunostaining.

FACS

Cells were trypsinized for 5 min and a solution of 10% foetal bovine serum (FBS) was added to stop the reaction. The cells were collected and washed by resuspension in PBS and centrifugation at 1500g for 10 min. Cells were fixed in 200µl of freshly prepared paraformaldehyde 2% solution for 10 min on ice, washed by centrifugation and permeabilized with a 0.1% solution of saponine. After centrifugation, cells were incubated 1h at room temperature in 200µl of primary antibodies solution. Oct4-Phycoerytrine linked and SOX2 non-linked antibodies were diluted as described in Table 1. Cells were washed and incubated 30min at room temperature with Alexa 488 antibodies. FACS-based counting was performed on a FACScalibur analyzer using CellQuest software (BD Bioscience, Franklin Lakes; USA). Proper gating, compensations and exclusion of auto-fluorescent cells was performed using several control conditions which included cells probed with only one of the primary antibodies, probes with only Alexa 488 or isotype-related non fluorescent antibodies.

Quantitative RT-PCR.

Total RNA was isolated using RNeasy Mini extraction kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's protocol. An on-column DNase I digestion was performed to avoid genomic DNA amplification. RNA level and quality were checked using a Nanodrop. A total of 500 ng of RNA was used for reverse transcription using the Superscript III reverse transcription kit (Invitrogen). PCR Primers are listed in Table 2. Quantitative PCR assays were prepared by loading primer mixes (1 µM of each primer in the final reaction) in duplicate wells of 96 well plates followed by addition of SYBR Green PCR Master Mix (Roche diagnostics, Basel, Switzerland) and 12.5 ng cDNA. PCR reactions were run and

quantified using a LightCycler 480 (Roche Diagnostics). Quantification of gene expression was based on the DeltaCt Method and normalized to 18S expression. Melting curve and electrophoresis analysis were performed to control PCR product specificities and exclude non-specific amplification.

MicroRNA extraction and TaqMan assay

MicroRNAs were extracted using miRVana extraction kit (Ambion, Austin, Texas, USA) according to the manufacturer's instructions after a phenol-chloroform purification step. They were reverse transcribed and prepared for qRT PCR using the TaqMan miRNA reverse transcriptase kit and miRNA specific stem loop primers (Applied biosystems, Foster City, California, USA) following the manufacturer's instructions. Individual TaqMan microRNA assay was performed on ABI 7900 (Applied biosystems) with a no UNG no Amperase master mix. Data were analyzed with SDS relative quantification software (Applied biosystems) with automatic Ct setting for assigning threshold and baseline for Ct detremination. Results were normalized against RNU 48 small nucleolar RNA.

Transfection of hES cells with antago or pre-Mir-125 complexes

Neural induction in the presence of Noggin and SB431542 was initiated as described above. After 24h, cells were transfected with 20nM antago/pre-miR-125a, antago/pre-miR-125b using lipofectamine RNAi at a ratio 1:2 following the manufacturer's instructions. After 6h, medium was changed. Immunocytochemistry and qPCR analyses were performed at day 8. Non targeting, antago or pre-miR were used as a control (Ambion).

Statistics

All experiments were carried out independently at least three times with triplicates included in each experiment. Error bars represent standard deviations, statistical significance was estimated with an ANOVA test and p values were calculated using a one-tailed Student's t-test.

Results

The combined neuralizing effects of the two Smad-dependent pathway inhibitors shown by Chamber et al. (Chambers et al., 2009) were first reconsidered in conditions in which levels of TGFbeta-like molecules were optimally lowered in the culture medium (Lowell et al., 2006). N2B27 was used in combination with laminin as a coating agent instead of KSR and matrigel, and the first step of culture in feeder cells-conditioned medium was avoided. Using these altered experimental conditions, efficiency of neural conversion was quantified over 8 days in the 4 different hESC lines, with and without with Noggin and SB431542 supplementation. Oct4 and Sox2 were quantified by FACS allowing us to differentiate ES cells, that were characterized by co-expression of the two, from cells engaged into the neural lineage that only expressed Sox2 (Lowell et al., 2006).

Results obtained in these experimental conditions confirmed those of Chambers et al. Spontaneous neural induction was obtained in N2B27, but its efficiency was heterogeneous and cell line dependent, ranging from 40 to 80% (Fig.1a). In contrast, when the same medium was supplemented with Noggin and SB431542, neural induction was synchronized and highly efficient independently of the cell line (>90%). These quantitative results were confirmed qualitatively using immunocytochemistry (Fig.1c). Cultures treated with the two inhibitors homogeneously expressed the early neural marker Pax6 as well as Sox2. In contrast when the inhibitors were omitted, expression of the ES marker Oct4 persisted and non–neural cells (Pax6-/Oct4-/Sox2-) were numerous.

The Activin/Nodal and BMP pathways inhibitors SB431542 and Noggin have different roles in neural specification.

Separate effects of the two pathways inhibitors were then analyzed in order to determine whether they were redundant or not. Human ESC were grown in N2B27 alone, or supplemented with Noggin and SB431542 either alone or together. After 8 days of differentiation, FACS analysis using Oct4 and Sox2 as markers indicated that each inhibitor alone increased only partially the proportion of neural cells (Oct4-/Sox2+, 59.91% +/- 0.07 for Noggin, 70.35% +/- 0.06 for SB431542 vs 47.39% +/- 0.7 in non-supplemented cultures). Near homogeneity of neural induction was obtained only when both inhibitors were supplemented together (90.16% +/- 0.17of neural cells).

Differentiation in N2B27 alone gave rise to a highly heterogeneous culture composed, besides neural cells, of undifferentiated embryonic stem cells (Oct4+/Sox2+, 22.55%+/-0.5) and cells from non-neural lineages (double negative or Oct4+/Sox2- cells, 30.05%+/-0.26)

(Fig.1b). Analyses of key marker genes of several lineages by qPCR (Fig.2) confirmed the presence of undifferentiated ES cells which expressed OCT4 and NANOG and of neural cells expressing PAX6 and SOX1. It also revealed that the non-neural cells found next to these two population belonged to extra-embryonic lineages since high levels of EOMES and CDX2 were detected (Fig.2). Differentiation into endodermal lineage, monitored using SOX17 (not shown) and FOXA1 markers, or mesodermal lineage, monitored using Brachyury (not shown) and FLK1 markers, was not detected in this paradigm. Differentiation in the presence of either inhibitor alone was significantly different from control conditions or combined supplementation (Fig.1b). Noggin treatment alone resulted in a high number of ESC resistant to differentiation (Oct4+/Sox2+, 27.50% +/- 0.11) whereas few cells differentiated into non-neural cell types (Oct4-/Sox2-, 12.57% +/- 0.19). Immunocytochemistry (Fig.1b) and qPCR (Fig.2) confirmed that cultures treated only with Noggin were mainly composed of Pax6+/Sox2+/Sox1+ neural cells and Oct4+/Nanog+ pluripotent ESC. Altogether, these results indicated that BMP inhibition by Noggin did not promote exit from the pluripotent state, but was instrumental in restricting cell fate choice to neural commitment.

Addition of SB431542 alone triggered a complete disappearance of Oct4+ pluripotent ESC (1.44% +/- 0.08). However, this was accompanied by the appearance of a large number of Oct4-/Sox2- non-neural cells in the cultures (27.69% +/- 0.03). The presence of this large proportion of non-neurally differentiated cells was confirmed by immunocytochemistry. Pax6 positive early neural cells were indeed organized in heterogeneous clusters surrounded by non-neural, Pax6-/Sox2- cells (Fig.1c). Quantitative PCR confirmed neural induction and absence of ESC markers, but also failed to reveal any marker of either other embryonic primitive layers, namely endoderm (FOXA1) and mesoderm (FLK1) or of extra-embryonic lineages (CDX2 and EOMES). We, therefore, hypothesized that the non-neural cells could be engaged in other ectodermal lineages. Indeed, we found expression of the neural crest markers SOX10 and SLUG and of the early epidermal markers Cytokeratin 18 (CK18) and p63. These demonstrations of neural crest and epidermal derivatives were validated using immunocytochemistry for Pax3 and CK18, respectively (Fig.3). Co-treatment with Noggin resulted in a complete disappearance of these alternative ectodermic phenotypes. Conversely, when Noggin was replaced by BMP4 in combination with SB431542, differentiation was strongly oriented through the epidermal lineage (see Fig.S1 in supplementary material). Taken together, these results indicate that inhibition of the Activin/nodal pathway by SB431542 promoted exit of ESC from the pluripotent compartment and commitment to a general and flexible primitive ectodermal phenotype.

When these results are summed up, the two inhibitors seem to coax very efficiently human ES cells toward the neural lineage by combining the promotion of differentiation toward a general ectodermal lineage by blocking the activin/nodal pathway, and the restriction of ectodermal cell fate toward the neural lineage by blocking BMP pathways.

Time-course analysis of cell-fate decision promoted by Noggin and SB431542

Using quantitative PCR, we performed a time-course analysis of markers of pluripotency (OCT4 and NANOG), of neuro-ectodermal lineage (PAX6 and SOX1) and ectodermal differentiation (CK18 and p63) (Fig.4).

Pluripotency markers decreased over the 8 days of treatment, whatever the medium composition. However, the decrease was clearly more complete and more rapid, between day 2 and day 5 of treatment, when the cells were treated with SB431542, whether it was alone or in combination with Noggin. There was no major difference in the time course of disappearance of the two markers between the non-supplemented condition and the Noggin treatment.

Expression of the two epidermal markers was altogether very low except in cultures treated with SB431542 alone, in which both were significantly higher than in other conditions from day 5 of treatment.

Expression of the early neural marker PAX6 was detected in all conditions, but at higher levels in cells treated with the combination of Noggin and SB431542 than in others. In both cases, PAX6 expression was initiated between day 2 and day 5. The later appearing SOX1 was only observed at detectable levels when cultures were treated with the two inhibitors.

Altogether, the results of this time-course study were consistent with a more homogeneous and more efficient conversion of hESC into neural precursors upon treatment with the two inhibitors than with either alone or in non-supplemented conditions. They pointed to the day 2/day 5 time window as the crucial period for cell fate decision in those cultures.

Mir-125a activation promotes neural conversion of hESC

We took advantage of the very different destinies taken by hESC depending of the culture paradigms to identify microRNAs that would be selectively involved in the promotion of the entry into the neural lineage associated to the action of the two inhibitors. We first analyzed the time-course of expression of a set of micro-RNAs selected for their known involvement in early development, namely miR-302, which is associated with pluripotency (Houbaviy et al., 2003; Suh et al., 2004; Barroso-delJesus et al., 2008), miR-203 and miR-205, which are

involved in epidermis differentiation and homeostasis (Gregory et al., 2008; Lena et al., 2008; Yi et al., 2008), and miR-9, miR-124 and miR-125 isoforms which have been largely reported as expressed in the early embryo nervous system (Sempere et al., 2004; Smirnova et al., 2005; Cao et al., 2007; Wulczyn et al., 2007; Leucht et al., 2008; Cheng et al., 2009).

In agreement with the changes in expression of pluripotency markers reported above, expression of miR-302 rapidly decreased after initiation of differentiation. However, whereas it became undetectable in cells treated with SB431542 alone or combined with Noggin, significant levels of this miRNA were maintained when the Activin/Nodal inhibitor was omitted (Fig.5g). In contrast, expression of miR-203 and miR-205 was only detected in cells treated with SB431542, starting between days 2 and 5, confirming the differentiation of a subpopulation of cells into a cutaneous ectodermic fate (Fig. 5e and f).

The three miRNAs associated to the embryo neural lineage had very different time-courses of appearance. miR-124 was not detected during the 8 days of the study (Fig 5b). However, we confirmed its expression in human foetal brain extract (Fig 5h).We also observed its expression at much later stages, in fully established neural precursor cells (supplementary Fig. 1). There was no expression of miR-9 until the latest -8 days- time point, when it was detected whatever the treatment, pointing to a potential role beyond the time window of cell fate decision triggered by SB431542 and Noggin (Fig. 5a). Finally, miR-125 isoforms a and b showed a transient expression at day 2 that disappeared at all later time points. Interestingly, the strongest expression was measured when both inhibitors were used conjointly (Fig 5 c and d).

As these data suggested that only miR-125 isoforms may play a role in the promotion of neural commitment, we further investigated it. We explored the functional role of each isoform using inhibiting antago-Mir complexes. Transfection of of hESC with a Cy3-labelled antago-miR indicated that the efficiency of transfection was about 30% (Supplemental Fig.2a). Expression of key lineage markers was evaluated after 8 days post-transfection with either antago-miR 125a or b, or else with a non targeting control antago-miR. FACS analyses of Nestin+/Sox2+/Oct4- labelled cells showed that antagonizing the action of miR-125a compromised the efficiency of neural induction (65.22% nestin+ vs 78.97% in Ctl; 53.2% Sox2+/Oct4- cells vs 75.15% in CTL). The proportion of non-neural cells increased in parallel in the cultures (Fig.6a and b). This effect was not observed when using an antago-miR targeting miR-125b. Immunocytochemistry confirmed the presence of areas that were totally negative for the neural marker Pax6 (Fig. 6c). The mirror experiments used pre-miR 125a or

125b complexes transfected in hESC, in order to obtain overexpression of each of the Mir-125 isoforms (Supplemental Fig.2b). Increased efficiency of differentiation was observed in the two cases but only the over-expression of Mir 125a was robust enough to reach statistically significant values (Fig 6)..

Discussion

The main result of this study is the deciphering of molecular mechanisms induced by the extra-cellular environment involved in the orientation of cells towards a neural fate in the earliest times after blastocyst formation in the Human. We have used hESC to probe the actions of Noggin and SB431542 during differentiation and observed that, although their combination had revealed instrumental in promoting early neuralization, each of the inhibitors acted on specific molecular systems with discrete non-overlapping functional correlates. Only when combined did the inhibitors promote quite efficiently neural induction, a phenomenon that we reveal dependent of the action of one specific miRNA, miR-125a.

Dual inhibition of the BMP and Activin/nodal-dependent pathways has been associated here with two discrete, essentially non-overlapping roles in the neural specification that was previously shown strongly facilitated when their effects are combined (Chambers et al., 2009). Inhibition of the Activin/Nodal pathway induces hESC differentiation and commitment to ectodermal derivatives of all types but does not modify the proportion of neuralized cells. Inhibition of the BMP pathway alone promotes restriction of the ectodermal cell fate decision to the neural lineage but does not increase hESC differentiation. Molecular mechanisms of early lineage choices following blastula formation have been shown over the past decades to involve a combination of cell autonomous, intrinsic determinants –that include a genetically defined sequence of transiently expressed genes- and of extrinsic factors (Scadden, 2006; Discher et al., 2009). Among these systems, antagonists of the members of the TGF beta family are key regulators of neurulation in vertebrates. Their pro-neural action was first described independently but more recently the concept of the necessity for a complete inhibition of both the Activin/Nodal and BMP sub-families dependent pathways has emerged in lower vertebrates (Bell et al., 2003; Linker and Stern, 2004; Chang and Harland, 2007), and has been most recently established also in hESC (Chambers et al., 2009). The precise role and

stage at which these inhibitors of the TGFbeta family members act during early development and their interactions with each other are still under investigation *in vivo*. Our *in vitro* modelling supports the latter hypothesis of a complementary action of each of the two inhibitors on different sequential phenotypic transitions (Chambers et al., 2009).

However, our results clearly distinguish the relative role of each of the two pathways inhibited by Noggin and SB431542, respectively, which had remained elusive. We had identified potential technical limitations in the pioneer study by Chambers et al., namely a preliminary exposure of hESC to feeder-conditioned medium and to potential exogenous sources TGFbeta-like molecules in serum replacement products and Matrigel™ and adapted our experimental conditions to eliminate those confusing factors. This was apparently instrumental as we were thus able to discretely identify the effects of each inhibitor on hESC differentiation while conserving the previously demonstrated promotion of neural induction by combined treatments.

Inhibition of the Activin/nodal pathway resulted in an efficient exit of hESC from the self-renewing compartment and, in absence of other instructive signals, primed hESC to a general ectodermic fate. This is in keeping with previous demonstrations that the Activin/Nodal pathway, characterized by the activation of Smad2/3, is essential to maintain self-renewal and pluripotency in hESC (James et al., 2005; Vallier et al., 2005) mainly by directly controlling the expression of NANOG, one key gene of the self-renewal machinery (Xu et al., 2008) (Vallier et al., 2009). Its inhibition using SB431542 synthetic inhibitor or the natural endogenous inhibitor Lefty-A resulted in a higher level of production of neural cells (Smith et al., 2008). It was shown here that hESC treated with SB431542 had to be exposed to another instructive signal, triggered by the BMP inhibitor Noggin in our experimental set-up, to increase the proportion of cells that acquired a neural phenotype over control, thus underscoring its pro-ectodermal rather than pro-neuroectodermal action.

Noggin was the first neural inducer cloned from a vertebrate and is the prototypic member of the BMP inhibitors family. It was largely demonstrated as promoting neurulation in vertebrates including mice (Smith and Harland, 1992; Lamb et al., 1993; Zimmerman et al., 1996) and controlling morphological changes in the neural plate (Ybot-Gonzalez et al., 2007). However, BMP inhibitors are not sufficient to induce neurulation on their own in vivo (Smith and Harland, 1992). Noggin also appeared to facilitate either hESC self-renewal and proliferation (Xu et al., 2005; Yao et al., 2006) or else neural differentiation (Itsykson et al., 2005; Sonntag et al., 2007), depending upon culture conditions. The results of our study may help reconcile those discordant data as Noggin promoted choice of a neural fate when hESC

were already induced for differentiation by the other inhibitor (SB431542), but did not stimulate hESC differentiation otherwise, i.e. only acted as a blocker of alternative cell fates. It is interesting to mention that studies that reported a facilitation of neural differentiation by Noggin on its own were conducted in systems which promoted hESC differentiation through embryoid body formation or by co-culture with stromal cells (Itsykson et al., 2005; Sonntag et al., 2007). Conversely, Noggin acted as a potent blocker of non-neural differentiation and thus contributed to the maintenance of self-renewal in cases in which hESC were not placed in such environments (Xu et al., 2005; Yao et al., 2006).

Activin/Nodal and BMP receptor stimulation by their respective ligands activate a cascade of phosphorylations of the members of the Smad family of transcription factors. These can, in turn, activate the transcription of a group of selected genes and eventually allow the induction of a particular developmental lineage. It has been assumed that the simple inhibition of these Smad-dependent cascades was sufficient to block non-neural fate choices. In the present study, the two inhibitors not only blocked signalling pathways but also promoted the activity of another important actor of neuralisation, the micro-RNA miR-125a. Expression of micro-RNAs has been associated over the past years with a wide variety of key biological processes, including cell cycle regulation, apoptosis, control of metabolic pathways, differentiation and maintenance of stem cell potential (Ambros, 2004; Chua et al., 2009). Here we have shown that treatment of hESC with Noggin, SB431542 or both was associated with repression or activation of different sets of miRNA. A selection of miRNAs were analyzed, driven by published demonstrations of a role in either maintenance of pluripotency (miR-302) (Houbaviy et al., 2003; Suh et al., 2004; Barroso-delJesus et al., 2008), development and homeostasis of epidermis, (miR203 and miR205, Gregory et al., 2008; Yi et al., 2008) and presence in the embryo nervous system (miR-9, miR-124, and miR125, Sempere et al., 2004) (Smirnova et al., 2005; Cao et al., 2007; Wulczyn et al., 2007; Leucht et al., 2008; Cheng et al., 2009). As expected, the combination of inhibitors gave the best activation of miR-9 and miR-125 isoforms but not of micro-RNAs involved in cell fates other than neural. Time-course of expression of miR-125, and not of miR-9, was compatible with a link with effects of the dual inhibitors. miR-125 is expressed all through the mouse neural tube, suggesting a role during the early steps of the nervous system formation (Smirnova et al., 2005). In vitro, increased expression of miR-125 was detected during differentiation of human embryonal carcinoma cell (EC cells, Rybak et al., 2008) and during neuronal-like differentiation of the immortalized human cell lines SH-SY5Y (Le et al., 2009). In EC cells, miR-125 was

described, together with Let-7, in a complex regulatory loop which control self-renewal, pluripotency and differentiation (Rybak et al., 2008). It is targeted by the RNA-binding protein Lin-28, a key actor of pluripotency and self-renewal in EC and ES cells (Viswanathan et al., 2008), which actively represses the maturation and activation of both Let-7 and miR-125 when EC cells are grown under culture conditions promoting self-renewal. Conversely, miR-125 and let-7 were over activated and contributed to the down-regulation of Lin-28 in EC-derived neural stem cells. In silico analyses have highlighted Smad 2 and 4 as potential downstream targets of miR-125, reinforcing the hypothesis that miR-125 acts as a pro-differentiation factor (Maller Schulman et al., 2008). Here miR-125 was shown not only to promote differentiation by inhibiting synthesis of several actors of self-renewal and pluripotency but also as a promoter of neural commitment, through blocking the choice of several alternative lineages. miR-125 contributes to the maintenance of a neural commitment from ES and EC cells (Rybak et al., 2008) as well as neuronal differentiation (Maller Schulman et al., 2008). As shown here, however, its expression is not constant along the different steps of the neural lineage and it is rather activated in a precise developmental time-window. This may have relevance in vivo, where it is essential that miR-125 be inactivated in otder to allow the expression of one of its targets, MLin41, and subsequent neural tube closure (Smirnova et al., 2005). MiR-125, therefore, is not a static safe keeper of the neural stem cell phenotype but rather an active trigger of neural differentiation and commitment.

REFERENCES:

Ambros V (2004) The functions of animal microRNAs. Nature 431:350-355.

Barroso-delJesus A, Romero-Lopez C, Lucena-Aguilar G, Melen GJ, Sanchez L, Ligero G, Berzal-Herranz A, Menendez P (2008) Embryonic stem cell-specific miR302-367 cluster: human gene structure and functional characterization of its core promoter. Mol Cell Biol 28:6609-6619.

Bell E, Munoz-Sanjuan I, Altmann CR, Vonica A, Brivanlou AH (2003) Cell fate specification and competence by Coco, a maternal BMP, TGFbeta and Wnt inhibitor. Development 130:1381-1389.

Cao X, Pfaff SL, Gage FH (2007) A functional study of miR-124 in the developing neural tube. Genes Dev 21:531-536.

Chambers SM, Fasano CA, Papapetrou EP, Tomishima M, Sadelain M, Studer L (2009) Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. Nat Biotechnol 27:275-280.

Chang C, Harland RM (2007) Neural induction requires continued suppression of both Smad1 and Smad2 signals during gastrulation. Development 134:3861-3872.

Cheng LC, Pastrana E, Tavazoie M, Doetsch F (2009) miR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche. Nat Neurosci 12:399-408.
Chua JH, Armugam A, Jeyaseelan K (2009) MicroRNAs: biogenesis, function and applications. Curr Opin Mol Ther 11:189-199.
Discher DE, Mooney DJ, Zandstra PW (2009) Growth factors, matrices, and forces combine and control stem cells. Science 324:1673-1677.
Fineberg SK, Kosik KS, Davidson BL (2009) MicroRNAs potentiate neural development. Neuron 64:303-309.
Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, Vadas MA, Khew-Goodall Y, Goodall GJ (2008) The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. Nat Cell Biol 10:593-601.
Harland R (2000) Neural induction. Curr Opin Genet Dev 10:357-362.
Houbaviy HB, Murray MF, Sharp PA (2003) Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. Dev Cell 5:351-358.
Itsykson P, Ilouz N, Turetsky T, Goldstein RS, Pera MF, Fishbein I, Segal M, Reubinoff BE (2005) Derivation of neural precursors from human embryonic stem cells in the presence of noggin. Mol Cell Neurosci 30:24-36.
James D, Levine AJ, Besser D, Hemmati-Brivanlou A (2005) TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. Development 132:1273-1282.
Lamb TM, Knecht AK, Smith WC, Stachel SE, Economides AN, Stahl N, Yancopolous GD, Harland RM (1993) Neural induction by the secreted polypeptide noggin. Science 262:713-718.
Le MT, Xie H, Zhou B, Chia PH, Rizk P, Um M, Udolph G, Yang H, Lim B, Lodish HF (2009) microRNA-125b Promotes Neuronal Differentiation in Human Cells by Repressing Multiple Targets. Mol Cell Biol.
Lena AM, Shalom-Feuerstein R, Rivetti di Val Cervo P, Aberdam D, Knight RA, Melino G, Candi E (2008) miR-203 represses 'stemness' by repressing DeltaNp63. Cell Death Differ 15:1187-1195.
Leucht C, Stigloher C, Wizenmann A, Klafke R, Folchert A, Bally-Cuif L (2008) MicroRNA-9 directs late organizer activity of the midbrain-hindbrain boundary. Nat Neurosci 11:641-648.
Linker C, Stern CD (2004) Neural induction requires BMP inhibition only as a late step, and involves signals other than FGF and Wnt antagonists. Development 131:5671-5681.
Lowell S, Benchoua A, Heavey B, Smith AG (2006) Notch promotes neural lineage entry by pluripotent embryonic stem cells. PLoS Biol 4:e121.
Maller Schulman BR, Liang X, Stahlhut C, DelConte C, Stefani G, Slack FJ (2008) The let-7 microRNA target gene, Mlin41/Trim71 is required for mouse embryonic survival and neural tube closure. Cell Cycle 7:3935-3942.
Mateizel I, De Temmerman N, Ullmann U, Cauffman G, Sermon K, Van de Velde H, De Rycke M, Degreef E, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A (2006) Derivation of human embryonic stem cell lines from embryos obtained after IVF and after PGD for monogenic disorders. Hum Reprod 21:503-511.
Rybak A, Fuchs H, Smirnova L, Brandt C, Pohl EE, Nitsch R, Wulczyn FG (2008) A feedback loop comprising lin-28 and let-7 controls pre-let-7 maturation during neural stem-cell commitment. Nat Cell Biol 10:987-993.
Scadden DT (2006) The stem-cell niche as an entity of action. Nature 441:1075-1079.
Sempere LF, Freemantle S, Pitha-Rowe I, Moss E, Dmitrovsky E, Ambros V (2004) Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed

microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. Genome Biol 5:R13.
Smirnova L, Grafe A, Seiler A, Schumacher S, Nitsch R, Wulczyn FG (2005) Regulation of miRNA expression during neural cell specification. Eur J Neurosci 21:1469-1477.
Smith JR, Vallier L, Lupo G, Alexander M, Harris WA, Pedersen RA (2008) Inhibition of Activin/Nodal signaling promotes specification of human embryonic stem cells into neuroectoderm. Dev Biol 313:107-117.
Smith WC, Harland RM (1992) Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in Xenopus embryos. Cell 70:829-840.
Sonntag KC, Pruszak J, Yoshizaki T, van Arensbergen J, Sanchez-Pernaute R, Isacson O (2007) Enhanced yield of neuroepithelial precursors and midbrain-like dopaminergic neurons from human embryonic stem cells using the bone morphogenic protein antagonist noggin. Stem Cells 25:411-418.
Suh MR, Lee Y, Kim JY, Kim SK, Moon SH, Lee JY, Cha KY, Chung HM, Yoon HS, Moon SY, Kim VN, Kim KS (2004) Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. Dev Biol 270:488-498.
Vallier L, Alexander M, Pedersen RA (2005) Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. J Cell Sci 118:4495-4509.
Vallier L, Mendjan S, Brown S, Chng Z, Teo A, Smithers LE, Trotter MW, Cho CH, Martinez A, Rugg-Gunn P, Brons G, Pedersen RA (2009) Activin/Nodal signalling maintains pluripotency by controlling Nanog expression. Development 136:1339-1349.
Viswanathan SR, Daley GQ, Gregory RI (2008) Selective blockade of microRNA processing by Lin28. Science 320:97-100.
Wrighton KH, Lin X, Feng XH (2009) Phospho-control of TGF-beta superfamily signaling. Cell Res 19:8-20.
Wulczyn FG, Smirnova L, Rybak A, Brandt C, Kwidzinski E, Ninnemann O, Strehle M, Seiler A, Schumacher S, Nitsch R (2007) Post-transcriptional regulation of the let-7 microRNA during neural cell specification. Faseb J 21:415-426.
Xu RH, Peck RM, Li DS, Feng X, Ludwig T, Thomson JA (2005) Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. Nat Methods 2:185-190.
Xu RH, Sampsell-Barron TL, Gu F, Root S, Peck RM, Pan G, Yu J, Antosiewicz-Bourget J, Tian S, Stewart R, Thomson JA (2008) NANOG is a direct target of TGFbeta/activin-mediated SMAD signaling in human ESCs. Cell Stem Cell 3:196-206.
Yao S, Chen S, Clark J, Hao E, Beattie GM, Hayek A, Ding S (2006) Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions. Proc Natl Acad Sci U S A 103:6907-6912.
Ybot-Gonzalez P, Gaston-Massuet C, Girdler G, Klingensmith J, Arkell R, Greene ND, Copp AJ (2007) Neural plate morphogenesis during mouse neurulation is regulated by antagonism of Bmp signalling. Development 134:3203-3211.
Yi R, Poy MN, Stoffel M, Fuchs E (2008) A skin microRNA promotes differentiation by repressing 'stemness'. Nature 452:225-229.
Ying QL, Stavridis M, Griffiths D, Li M, Smith A (2003) Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. Nat Biotechnol 21:183-186.
Zimmerman LB, De Jesus-Escobar JM, Harland RM (1996) The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. Cell 86:599-606.

Figure legends

Figure 1: Increased efficiency of neural conversion of hESC after treatment with Noggin and SB431542.

(a-b) FACS analysis of cellular phenotypes found in 8 day cultures treated with Noggin, SB431542 or both. (a) Four hESC lines were exposed to the combination of the two inhibitors and the percentage of neural cells (SOX2 positive/Oct4 negative cells, black bars) was analysed and compared to non treated cells (grey bars). Noggin + SB431542 treatment robustly increased efficiency of neural conversion independently of the cell line used. (b) The effect of each inhibitor was analysed more precisely on the representative cell line H9. Double positive cells represented ES cells, SOX2 positive/Oct4 negative cells were neural cells, double negative cells were cells engaged into non-neural lineages. *$p<0.01$, one-tailed Student's t-test. (c) Qualitative analysis of the effect of each inhibitor by immunocytochemistry. Oct4 labelling (green) was combined with SOX2 (red) or the pro-neural gene PAX6 (red) labelling, scale bar = 100µm.

Figure 2: Analysis of fate choices induced by Noggin and SB431542 respectively.

Expression of genes representative of ESC (Oct4 and Nanog), of the neural lineage (PAX6 and SOX1), endoderm (FOXA1), mesoderm (FLK1), extra-embryonic tissues (CDX2 and Eomes), epidermal lineage (p63 and CK18) and neural crest (SOX10 and slug) were quantified by qPCR. Cells were cultivated with N2B27 basic medium and treated with each inhibitor alone and in combination. Gene expression in a given treatment was normalized to the expression found in hESC. *$p<0.01$, one-tailed Student's t-test compared to hES cells. §$p<0.01$, one-tailed Student's t-test compared to N2B27 treatment.

Figure 3: Complementary effect of the two inhibitors Noggin and SB431542

Immunocytochemistry analyses of CytoKeratin 18 a marker of keratinocytes (green, top panels), of PAX3 a marker of neural crest (green lower panels) and of PAX6 a neural gene (red, lower panels) were performed on cultures treated with each inhibitor alone or in combination. Keratinocytes and neural crest cells were seen only when SB431542 was used on its own. This was completely abrogated by the treatment with Noggin and confirmed that SB431542 and Noggin acted complementarily to coordinate neural induction. Scale bar = 100µm.

Figure 4: Fate decisions were taken within 5 days of exposition to each inhibitor.

Time course of expressions of genes representative of the neural lineage (PAX6 and SOX1), of the epidermal lineage (CK18 and p63) and of ESC (Oct4 and Nanog) induced by each inhibitor on its own or in combination was analysed by qPCR.

Figure 5: miRNAs activation following Noggin and SB431542 treatments

(a) The time-course of expression of selected miRNAs was analysed using TaqMan assays after treatment with Noggin and SB431542 and normalized to the expression found in ESC. Four pro-neural (miR-9, miR-124, miR-125a and b), two pro-epidermal (miR203 and miR-205) and one ESC specific (miR-302) miRNAs were chosen. (b) Summary of the absence (-) or presence (+) of each miRNA according to each treatment. Each inhibitor regulated a different set of miRNAs, ending up in the best combination to allow neural specification *$p<0.01$, one-tailed Student's t-test compared to N2B27 condition.

Figure 6: miR-125a promotes neural conversion of hESC

Functional involvement of miR 125-a and b in the promotion of the neural conversion of hESC was investigated using antago- or pre-miR complexes and the consequences analysed by FACS for SOX2/Oct4 (a) and Nestin (b) expression as well as by Immuno-fluorescence (c).* $p<0.01$, one-tailed Student's t-test.

Table 1: Antibodies used in this study. FACS: Fluorescence-activated cell sorting, IF: Immunofluorescence

ANTIBODY	SPECIES	APPLICATION	DILUTION	PROVIDER
OCT4-PE	mouse	FACS	1/10°	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA
SOX2	rabbit	IF	1/500°	Millipore, Billerica, Massachussett, USA
OCT4	mouse	FACS	1/200°	Santa-cruz Biotechnology, Bergheimer, Germany
PAX6	rabbit	IF	1/800°	Eurogentec, Angers, France
PAX3	rabbit	IF	1/50°	R and D systems, Lille, France
CK18	mouse	IF	1/50°	Abcam, Cambridge, UK
Alexa 488	goat	FACS/IF	1/1000°	Invitrogen, cergy Pontoise, France
Alexa 555	goat	IF	1/1000°	Invitrogen, cergy Pontoise, France

Table 2: List of the qPCR primer sequences

Gene Name	Forward primer	Reverse primer
18S	GAGGATGAGGTGGAACGTGT	TCTTCAGTCGCTCCAGGTCT
NANOG	CAAAGGCAAACAACCCACTT	TCTGCTGGAGGCTGAGGTAT
OCT4	CTTGCTGCAGAAGTGGGTGGAGGAA	CTGCAGTGTGGGTTTCGGGCA
K18	GAGTATGAGGCCCTGCTGAACATCA	GCGGGTGGTGGTCTTTTGGAT
K8	GATCGCCACCTACAGGAAGCT	ACTCATGTTCTGCATCCCAGACT
CDX2	TCACTACAGTCGCTACATCACCATC	TTAACCTGCCTCTCAGAGAGCC
Eomes	CGGCCTCTGTGGCTCAAA	AAGGAAACATGCGCCTGC
Brachyury	CGGAACAATTCTCCAACCTATT	GTACTGGCTCTCCACGATGTCT
FLK1	GCATCTCATCTGTTACAGC	CTTCATCAATCTTTACCCC
FOXA1	AGCAGGCGCCCAGCAAGATG	TGGCGGCGCAAGTAGCAG
SOX17	CGGGGACATGAAGGTGAAG	GTCAGCGCCTTCCACGACTT
SOX1	GATGCACAACTCGGAGATCA	GTCCTTCTTGAGCAGCGTCT
PAX6	GCCAGCAACACACCTAGTCA	TGTGAGGGCTGTGTCTGTTC
SOX10	CCCACACTACACCGACCAG	GGCCATAATAGGGTCCTGAGG
Slug	ATACCACAACCAGAGATCCTCA	GACTCACTCGCCCCAAAGATG

Figure 1

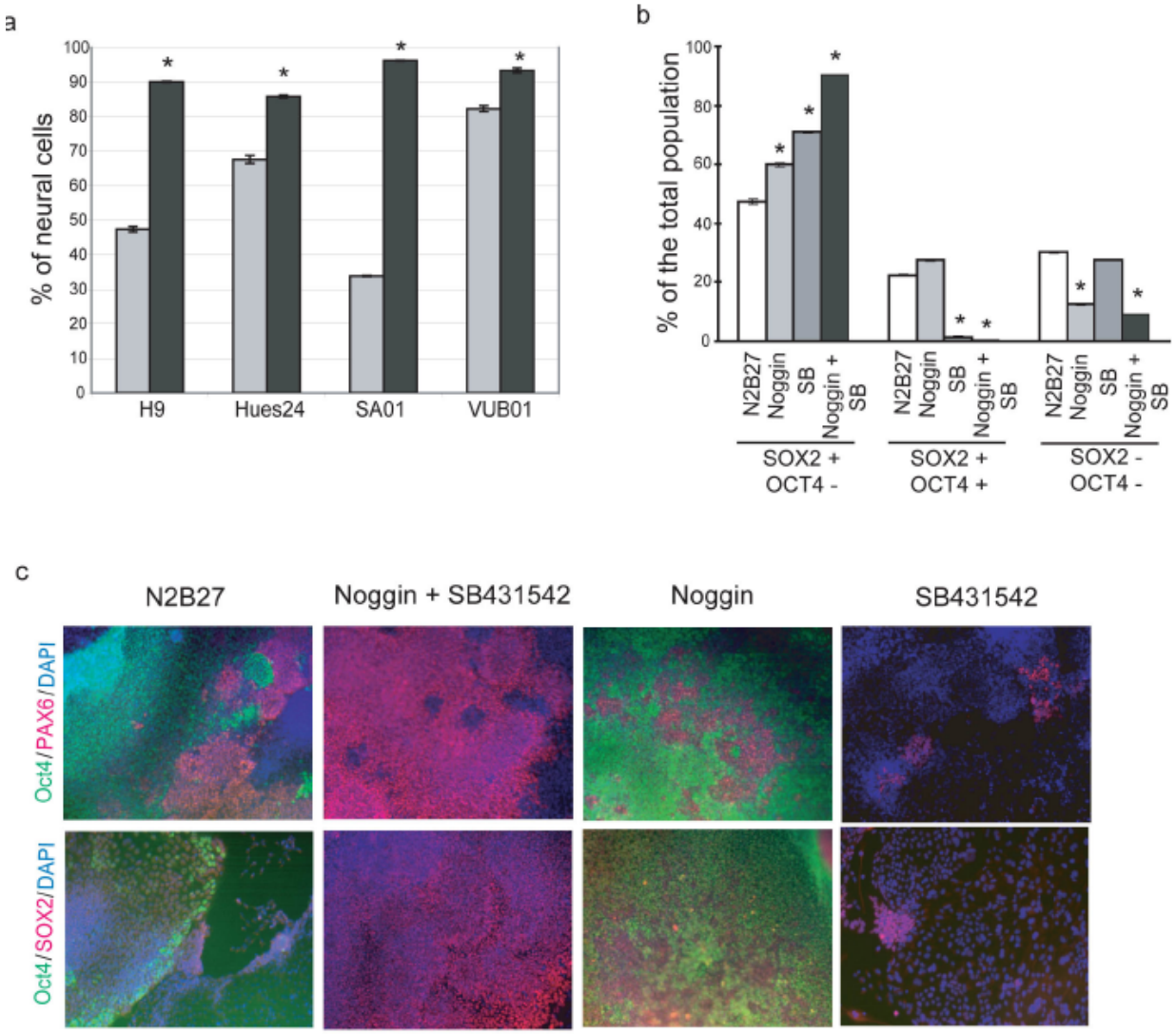

a
% of neural cells
H9
Hues24
SA01
VUB01
b
% of the total population
N2B27
Noggin
SB
Noggin + SB
SOX2 + OCT4 -
SOX2 + OCT4 +
SOX2 - OCT4 -
c
N2B27
Noggin + SB431542
Noggin
SB431542
Oct4/PAX6/DAPI
Oct4/SOX2/DAPI

Figure 2

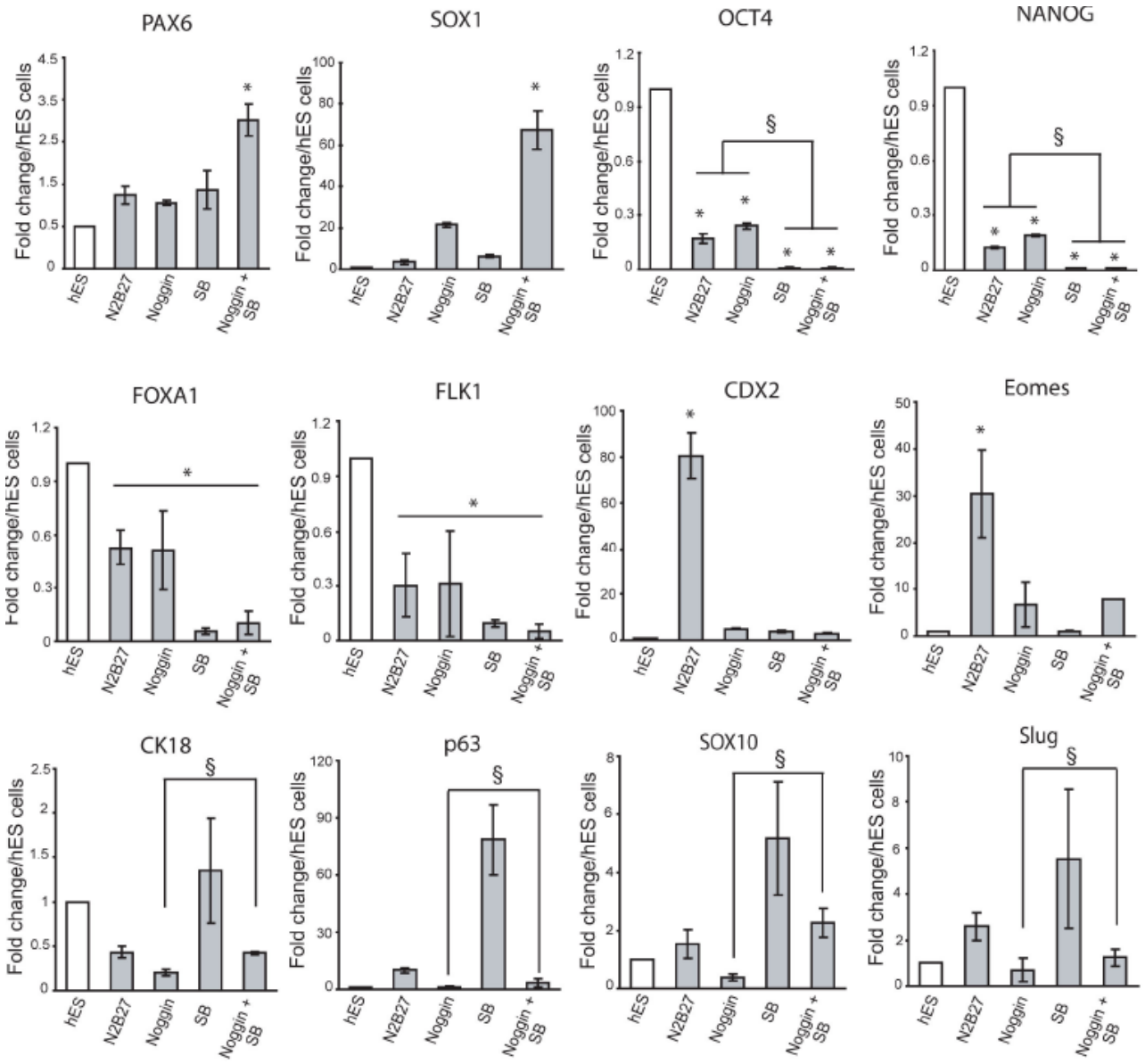

PAX6
SOX1
OCT4
NANOG
FOXA1
FLK1
CDX2
Eomes
CK18
p63
SOX10
Slug
Fold change/hES cells
hES
N2B27
Noggin
SB
Noggin + SB
*
§

Figure 3

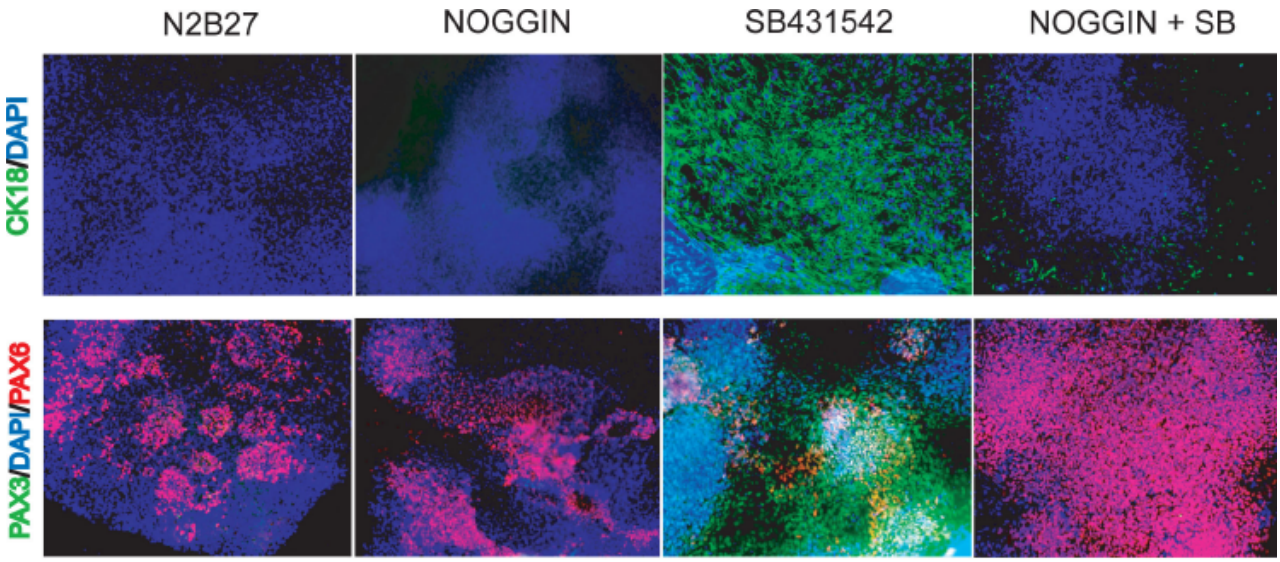


Figure 4

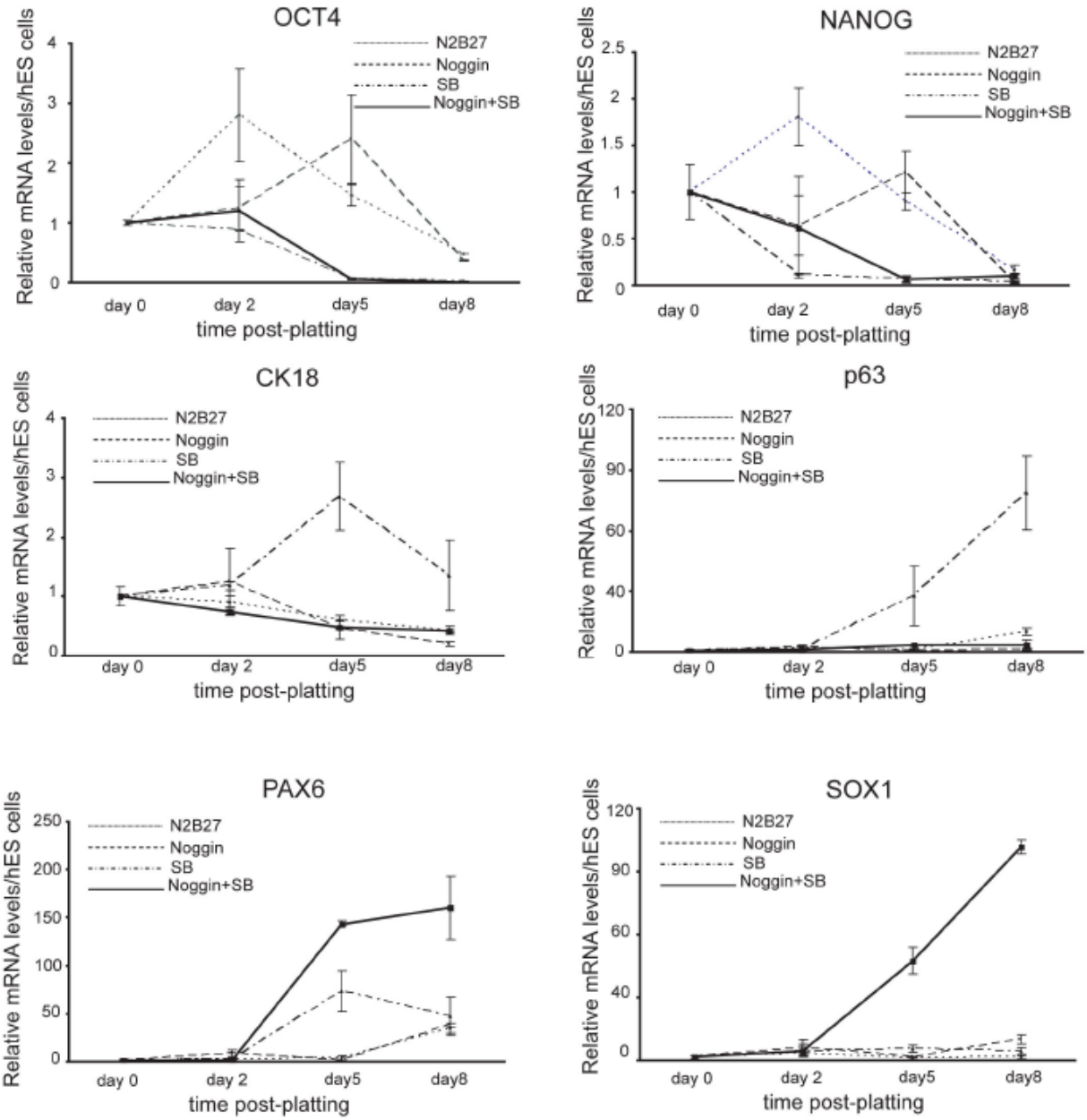

OCT4
NANOG
CK18
p63
PAX6
SOX1
N2B27
Noggin
SB
Noggin+SB
Relative mRNA levels/hES cells
time post-platting
day 0
day 2
day5
day8

Figure 5

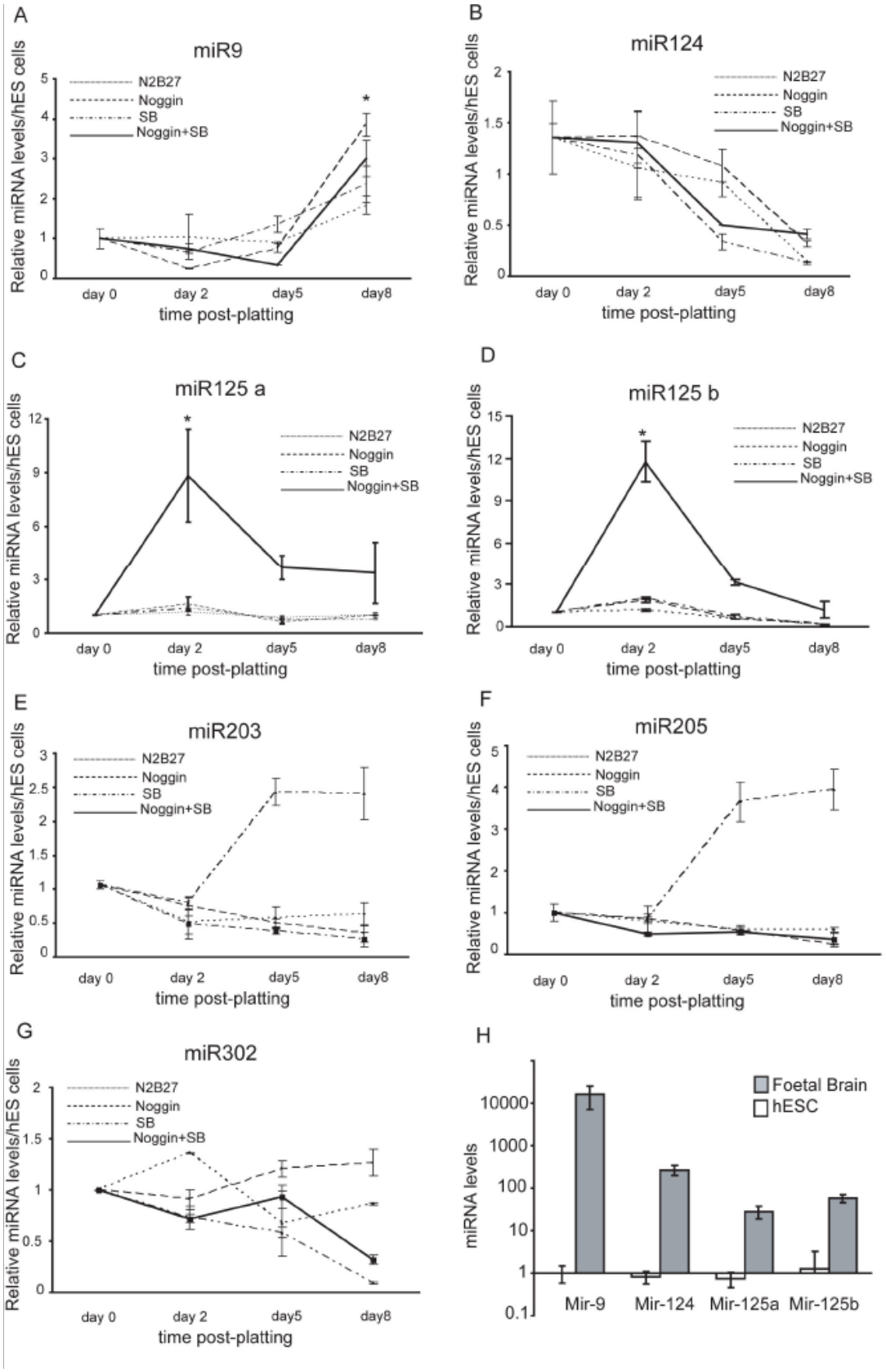
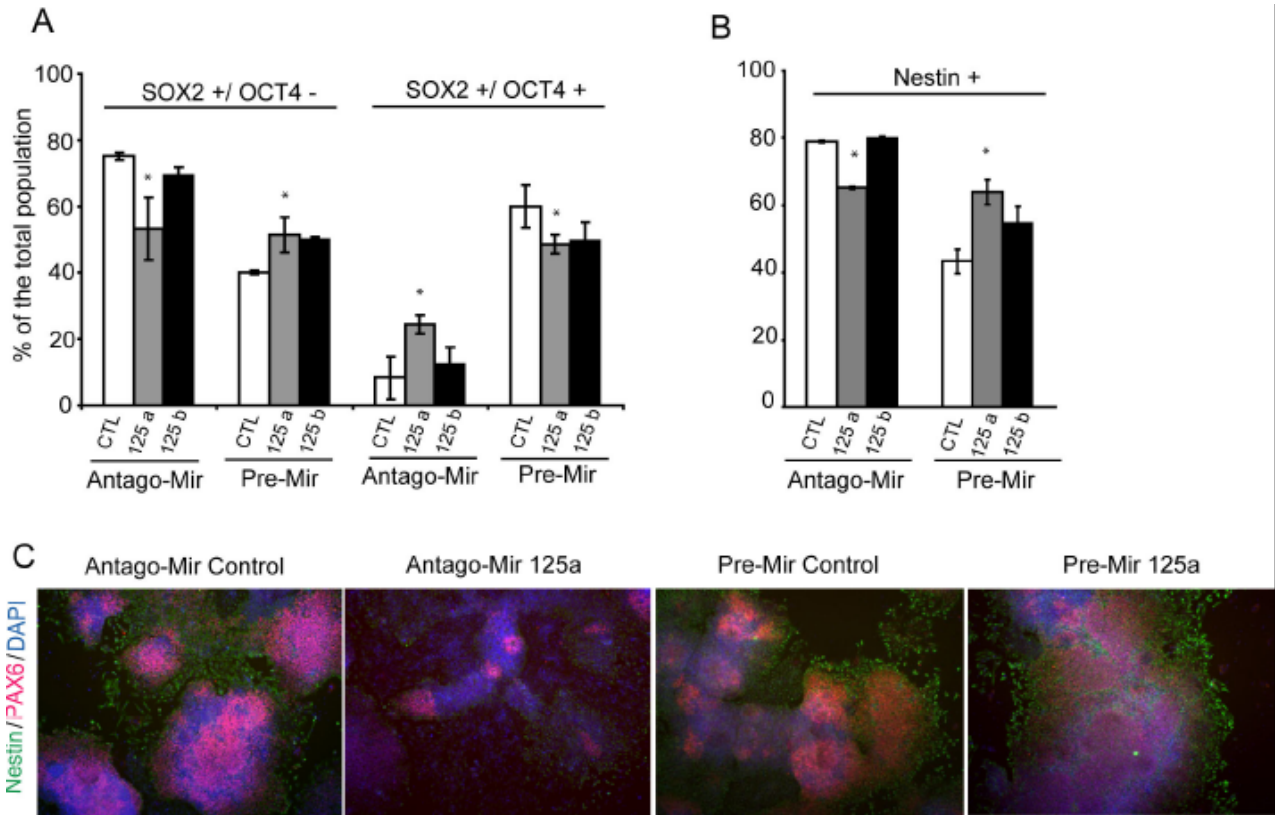
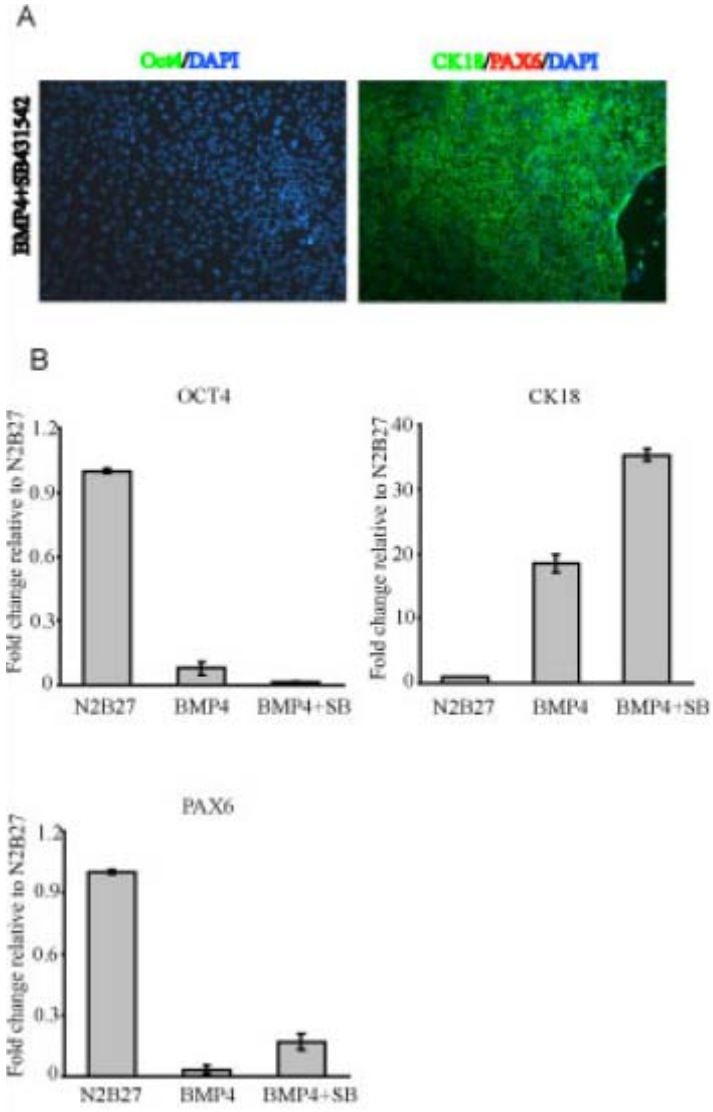

A
miR9
Relative miRNA levels/hES cells
N2B27
Noggin
SB
Noggin+SB
day 0
day 2
day5
day8
time post-platting
B
miR124
C
miR125 a
D
miR125 b
E
miR203
F
miR205
G
miR302
H
Foetal Brain
hESC
miRNA levels
Mir-9
Mir-124
Mir-125a
Mir-125b

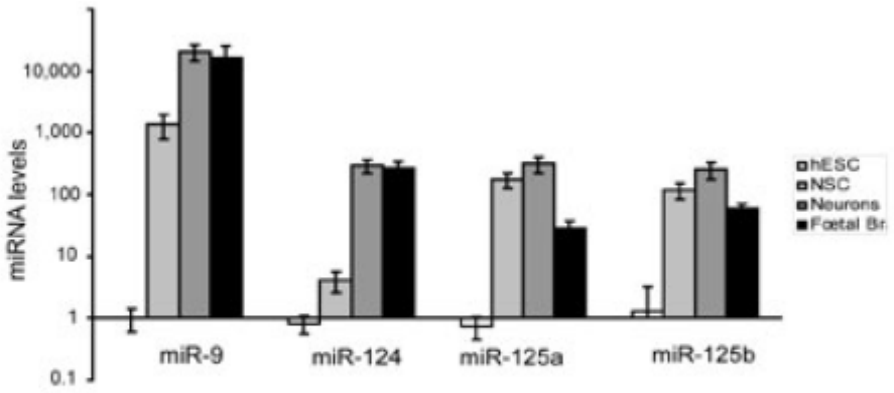
Figure 6


A
SOX2 +/ OCT4 -
SOX2 +/ OCT4 +
% of the total population
100
80
60
40
20
0
CTL
125 a
125 b
Antago-Mir
Pre-Mir
B
Nestin +
C
Antago-Mir Control
Antago-Mir 125a
Pre-Mir Control
Pre-Mir 125a
Nestin/PAX6/DAPI

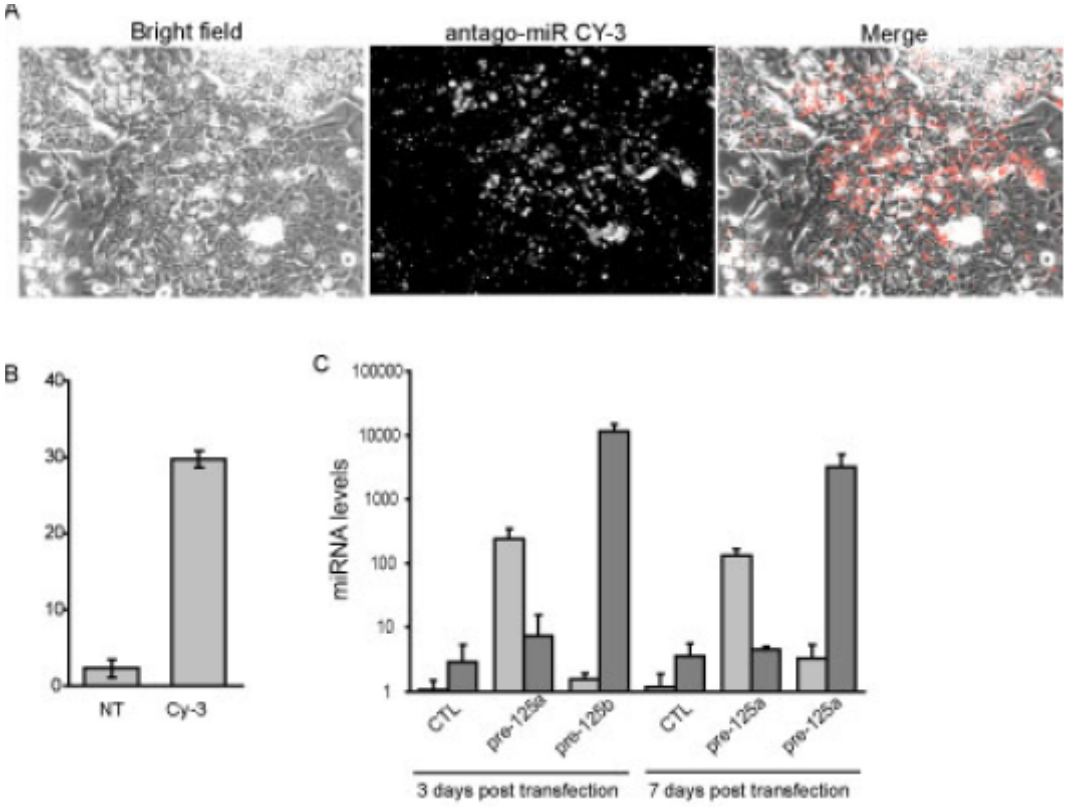
Sup Figure 1



Sup Figure 2



Sup Figure 3


A
Bright field
antago-miR CY-3
Merge
B
40
30
20
10
0
NT
Cy-3
C
100000
10000
1000
100
10
1
miRNA levels
CTL
pre-125a
pre-125b
CTL
pre-125a
pre-125a
3 days post transfection
7 days post transfection

DISCUSSION et PERSPECTIVES

Discussion et Perspectives :

De la recherche fondamentale aux applications thérapeutiques

Durant ces trois années de thèse, j'ai participé au développement de différents protocoles de différenciation de cellules souches pluripotentes humaines (hES et iPS) en kératinocytes, en mélanocytes et en progéniteurs neuraux. Dans le but d'élucider les mécanismes moléculaires impliqués dans la spécification de ces différents lignages, nous avons dans un deuxième temps étudié le rôle d'une nouvelle classe de régulateurs développementaux : les microARNs. Nous discuterons dans le présent chapitre de l'utilisation de ces différents types cellulaires pour l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement embryonnaire humain autant dans un contexte normal que pathologique mais également de l'intérêt de telles populations cellulaires dérivées de cellules souches pluripotentes pour la thérapie cellulaire ou la recherche de nouveaux médicaments par criblage à haut débit.

I. Etude des mécanismes moléculaires et cellulaires du développement embryonnaire humain

A. Implication des voies de signalisation BMPs, Wnt et Activin/Nodal dans la différenciation des cellules hES

La première partie de ma thèse a donc consisté à développer des protocoles de différenciation permettant de spécifier l'engagement de cellules pluripotentes dans les lignages kératinocytaire, mélanocytaire et neural. Nous avons ainsi démontré qu'il était possible de dériver des kératinocytes fonctionnels à partir de cellules hES (Guenou H et al., 2009) mais également des mélanocytes et des progéniteurs neuraux. Ces résultats n'ont pu être possibles que par l'étude des voies de signalisation impliquées dans le développement embryonnaire de ces différents lignages et leur transposition *in vitro*. C'est ainsi que nous avons identifié la voie des BMPs comme étant majeure dans l'engagement des cellules pluripotentes dans le lignage ectodermique. En effet, les études préalablement effectuées sur l'embryogenèse du Xénope ont démontré que la mise en place des différents lignages ectodermiques était sous l'influence d'un gradient entre les différents facteurs dorsalisant (comme la Noggin, la Chordin et la Follistatin) (Hemmati Brivanlou A et al ., 1994, Sassai Y et al., 1995) et le principal facteur ventralisant qui est la Bone Morphogenetic Protein4 (BMP4) (Hemmati-Brivanlou A et al., 1995). *In vivo* comme *in vitro*, il été démontré que la BMP4 permettait l'engagement des cellules du neurectoderme dans le lignage épithélial (Tropepe V et al., 2001 ; Gambaro K et al., 2006) alors que son inhibiteur le Noggin spécifiait l'engagement dans le lignage neural (Sassai Y et al., 2001 ; Gratsch TE, O'Shea KS, 2002). Par ailleurs il a

également été montré qu'un niveau intermédiaire de BMP4 désignait les territoires du neurectoderme qui deviendront les crêtes neurales (Kanzler B et al., 2000). Sur la base de ces informations, nous avons traitées les cellules hES à la BMP4 pour induire leur engagement dans les lignages épithélial et crête neural et des concentrations fortes de Noggin pour permettre leur induction neurale. Nous avons ainsi démontré qu'un traitement à forte concentration de BMP4 (500µmol/L) stimulait la différenciation des cellules hES en kératinocytes. Ainsi traitées, ces cellules expriment l'ensemble des marqueurs spécifiques de ce lignage et sont capables de régénérer un épiderme à la fois *in vitro* et *in vivo*. Le maintien de cette induction pendant 40 jours permet finalement à ces cellules engagées dans ce processus de différenciation de respecter la chronobiologie du développement embryonnaire de l'épiderme humain avec dans un premier temps l'acquisition d'un phénotype d'épithélium simple puis celui d'épithélium pluristratifié. Si l'ajout de BMP4 permet l'engagement des cellules pluripotentes dans le lignage épithélial, son inhibition par le Noggin en induit la spécification neurale. Bien que nécessaire à l'obtention d'une progenie neurale, nous avons observé que le traitement au Noggin n'était pas suffisant à la différenciation de la totalité des cellules hES. Nous avons ainsi identifié la voie de l'Activin/Nodal comme étant potentiellement impliquée dans le maintien de la pluripotence de ces cellules. En effet, différentes études ont mis en évidence que la voie Activin/Nodal stimulait la phosphorylation des SMADs 2/3 (James D et al., 2005 ; Vallier L et al., 2005) et ainsi participait à la régulation transcriptionelle de NANOG, facteur clé de la pluripotence (Xu RH et al., 2008). L'inhibition de cette voie de signalisation via le SB431542, a par ailleurs démontré être suffisante pour induire la différenciation des cellules hES alors que l'ajout d'Activin et de Nodal en combinaison avec du bFGF pouvait en prévenir la différenciation (Vallier L et al., 2005). Nos travaux consistant à développer un protocole pour optimiser l'induction neurale a également démontré que l'ajout du SB431542 permettait d'induire la différenciation des cellules hES en progéniteurs neuraux. De manière intéressante nous avons également observé que le traitement au SB431542 sans Noggin induisait par défaut une différenciation dans l'ensemble des lignages ectodermiques. Notre équipe, en collaboration avec celle du Dr Alexandra Benchoua, est actuellement en train d'évaluer l'effet d'un traitement au SB431542 sur l'induction épithéliale des cellules hES et iPS dans le protocole d'induction kératinocytaire. Finalement nous avons également observé qu'il était possible d'obtenir des mélanocytes dérivées de la crête neurale après un traitement à la BMP4 des cellules hES et iPS. Les couples EDN3/EDRNB et SCF/c-Kit ainsi que la voie Wnt/β-caténine ayant été mis en évidence pour induire la survie et la migration ainsi que la différenciation des melanoblastes en mélanocytes autant *in vitro* qu'*in vivo* (pour revue Uong A et al., 2010). Nous sommes actuellement en train d'évaluer à la fois leurs expressions et leurs rôles dans notre modèle cellulaire. Par ailleurs, le traitement au SB431542 permettant d'induire

l'engagement des cellules hES dans le lignage ectodermique, nous envisageons également d'optimiser le protocole de différenciation mélanocytaire en ajoutant cet inhibiteur, au moins dans les premiers jours d'induction.

B. Régulation du processus de différenciation par les facteurs de transcription clés de la pluripotence (NANOG) et des différents lignages (p63, PAX6 et MITF)

La mise au point de ces protocoles de différenciation m'ont donc permis d'étudier le rôle clé de certains facteurs de transcription dont les fonctions avaient initialement été caractérisées dans des modèles murins. Tout d'abord parmi les gènes impliqués dans le contrôle de la pluripotence et de l'autorenouvellement, NANOG en est un des principaux. Ce dernier a été mis en évidence dans les cellules souches embryonnaires murines et humaines (Cavaleri F et al., 2003) et sa surexpression a démontré être associé à la reprogrammation de cellules somatiques en cellules iPS (Yu J et al., 2007). Dans les trois modèles de différenciation que nous avons décrit (neural, mélanocytaire et kératinocytaire), nous avons observé que l'expression de NANOG était diminuée graduellement au fur et à mesure de la différenciation des cellules souches pluripotentes. Nous avons également corrélé son expression au traitement des cellules hES avec l'inhibiteur de la voie Activin/Nodal, le SB431542. Dans cette dernière étude nous avons par ailleurs démontré que cette perte de pluripotence liée à l'inhibition de la voie Activin/Nodal pouvait potentialiser la différenciation ectodermique. Parallèlement à la perte de pluripotence, les cellules hES acquièrent donc des phénotypes différents en fonction des traitements pharmacologiques effectués (BMP4, Noggin ou SB431542) et par conséquence du type cellulaire dans lequel elles sont différenciées. Cet engagement cellulaire est accompagné de transformations morphologiques mais également transcriptionelles. C'est ainsi que nous avons identifié le facteur de transcription p63 et plus particulièrement son isoforme ΔNp63 comme étant un des premiers marqueurs surexprimés durant l'engagement des cellules hES dans le lignage épithélial. Ces données expérimentales sont en accord avec celles mises en évidence par Candi E et al., qui ont démontré que sa surexpression dans des progéniteurs épithéliaux suffisait seul à en stimuler la différenciation en kératinocytes (Candi E et al., 2008). De même, l'obtention d'une population pure de mélanocytes dérivés de cellules pluripotentes, nous a permis d'identifier l'isoforme M de MITF, qui a préalablement été rapporté pour réguler le développement mélanocytaire et la survie de ces cellules (pour revue Moore KJ et al., 1995), comme étant un des premiers facteurs surexprimé dans l'induction du lignage mélanocytaire. Et nous avons également fait la même observation dans les progéniteurs neuraux en identifiant PAX6, connu pour son rôle dans le contrôle de différents processus développementaux du système nerveux central (Pour revue Osumi N et al 2008), comme étant un des marqueurs les plus précocement induits dans la différenciation

neurale. L'ensemble de ces données démontrent la spécificité développementale de ces facteurs de transcription. La perte de pluripotence et l'induction des différents lignages sont donc associées à une évolution spécifique d'un set de facteurs de transcription capables de réguler, en cascade, l'ensemble des gènes impliqués dans la mise en place de la progenie. Mais quels sont les mécanismes régulant l'expression de ces facteurs ? Une piste récente démontre l'existence d'une nouvelle classe de régulateurs posttranscriptionnels capables d'induire les différentes transitions développementales en régulant principalement l'expression de facteurs de transcription: Les microARNs

C. Mise en évidence du rôle des microARNs dans la différenciation des cellules hES :

La seconde partie de ma thèse a donc consisté à étudier le rôle et la fonction des microARNs dans ces modèles *in vitro* du développement humain. La démonstration du rôle des microARNs dans le contrôle des différentes étapes du développement embryonnaire vient de l'analyse phénotypique des souris KO pour Dicer et DGCR8, deux éléments majeurs impliqués dans la biogénèse des microARNs (Bernstein E et al., 2003 and Wang Y et al., 2007). En effet, dans les deux cas, la perte de Dicer et de DGCR8 entraine des anomalies développementales et structurales majeures rapidement létales dans les premières étapes de l'embryogénèse murine (E7,5). Depuis, de nombreuses études principalement réalisées dans des modèles tels que le Xenope ou la souris ont démontré que certains microARNs régulaient spécifiquement la mise en place de lignage cellulaire. C'est notamment le cas de miR-125 dans le développement neuronal (Makeyev EV et al., 2007), de miR-1 et miR-133 dans l'induction du lignage musculaire (Chen JF et al., 2006 ;Takaya T et al., 2009) ou de miR-155 and miR-181 régulant la différenciation hématopoïétique (Neilson JR et al., 2007). Nous avons ainsi mis en évidence que deux microARNs miR-125a et miR-203 pouvaient respectivement réguler l'induction du lignage neural et la formation de l'épiderme. Nous avons ainsi identifié que miR-125a, à la différence de miR-9 et miR-124 qui jouent des rôles probablement plus tardifs au cours du développement du système nerveux central, étaient capables de stimuler la spécification neurale des progéniteurs neurectodermiques. Ces données ont été obtenues par l'observation d'une augmentation d'expression de facteurs clés de la neurogenèse tels que PAX6 ou Nestine consécutivement à la surexpression de miR-125a. De manière intéressante cette étude a également démontré que la différenciation induite par l'inhibition de la voie Activin/Nodal par le SB431542 entrainait la diminution significative de l'expression de miR-302, microARN impliqué dans la régulation du cycle cellulaire (Card DA et al., 2008) et de la pluripotence des cellules souches embryonnaires (Stadler BM et al 2010). Bien que cette donnée soit la première à mettre en évidence la

relation directe entre cette voie de signalisation et la modification de l'expression de microARNs régulateurs de la pluripotence, des études additionnelles sont nécessaires pour déterminer les mécanismes moléculaires mis en jeu.

Parallèlement à cette étude nous avons suivi l'évolution du miRnome au fur et à mesure de l'engagement des cellules hES dans le lignage épithélial. C'est ainsi que nous avons identifié 4 microARNs comme étant spécifiquement surexprimés : miR-200a/b, miR-203, miR-205 et miR-429. De manière intéressante l'ensemble de ces microARNs ont été mis en évidence pour jouer un rôle dans la biologie des cellules épithéliales. En effet miR-200a/b miR-205 et miR-429 ont été décrits pour réguler la migration, la différenciation et la maturation des cellules épithéliales chez la souris et l'humain (Yi R et al., 2006 ; Sand M et al., 2009 ; Sossey-Alaoui K et al., 2009 ;Gregory PA et al., 2008). Bien que ces microARNs soient spécifiquement surexprimés pendant la différenciation épithéliale des cellules hES, il semble que leur expression ne soit pas à l'origine de la mise en place de ce lignage mais sa conséquence. En effet seul miR-203 a montré un effet régulateur lors de l'étude fonctionnelle que nous avons réalisé. miR-203 est un microARN spécifiquement exprimé par les kératinocytes (Yi R et al., 2006), son expression a directement été corrélée avec l'état de différenciation de ces cellules (Yi R et al., 2008, Lena AM et al., 2008) et la modification de son expression est suffisante pour l'induire à la fois *in vitro* (Yi R et al., 2008, Lena AM et al., 2008) et *in vivo* (Yi R et al., 2008). Il a ainsi été démontré *in vivo* que la surexpression de miR-203 au cours du développement embryonnaire de souris entrainait une différenciation prématurée des kératinocytes basaux et une diminution du nombre de couches épidermiques formées (Yi et al., 2008). Ces données ont été confirmées la même année, *in vitro,* par la publication d'une étude montrant que l'extinction et la surexpression de miR-203 dans des kératinocytes adultes humains entrainaient respectivement une augmentation et une diminution de leurs capacités clonogéniques (Lena AM et al., 2008). Notre étude s'est intéressée aux premières étapes du développement embryonnaire humain en utilisant des cellules hES engagées dans le lignage épithélial. Nous avons ainsi démontré que l'extinction de miR-203 dans les progéniteurs épithéliaux dérivés de cellules hES était suffisante pour stimuler leur différenciation en kératinocytes. Nos résultats démontrent également que la surexpression de miR-203 dans des kératinocytes humains n'entraine pas seulement la diminution de leurs potentiels prolifératifs mais aussi une baisse de leurs capacités à générer un épiderme dans un modèle de culture organotypique. L'ensemble de ces données démontrent donc pour la première fois que des microARNs peuvent réguler la différenciation de cellules souches pluripotentes humaines engagées dans des processus de différenciation spécifiques telles que les lignages neuraux et épithéliaux. La mise en évidence de ce type de facteurs développementaux n'est possible que par la mise en place de ce type de protocole permettant d'induire de manière optimum la différenciation des cellules souches

pluripotentes. Avec les avancées technologiques effectuées chaque jour dans ce domaine en plein expansion que sont les cellules souches, de nombreux autres microARNs vont ainsi pouvoir être mis en évidence dans les années à venir.

II. Cellules souches pluripotentes et modélisation pathologique

A. Modélisation pathologique des maladies monogéniques

La modélisation pathologique *in vitro* des maladies génétiques humaines est un enjeu majeur à la fois pour la compréhension des mécanismes moléculaires de ces pathologies mais également pour la recherche de thérapies innovantes. A ce titre, les cellules souches pluripotentes représentent un modèle développemental humain unique pour comprendre et identifier leurs mécanismes moléculaires. Pour cela deux stratégies sont possibles : Premièrement, l'introduction d'une mutation causale d'une pathologie dans des cellules hES dérivées d'un embryon sain. Cette stratégie ayant été rapportée par Urbach et al par la création d'un modèle de la maladie de Lesch-Nyhan par l'introduction d'une mutation dans le gène HPRT1 (Urbach A et al., 2004). La seconde stratégie, plus couramment utilisée, est l'utilisation de cellules hES dérivées d'un embryon porteur d'une mutation identifiée durant un diagnostic préimplantatoire (DPI) (Ben-Yosef D et al., 2008). A ce jour plusieurs dizaines de lignées de cellules hES porteuses de mutations ont été dérivées pour mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans le développement de pathologies telles que la thalassémie, l'adrenoleukodystrophie, les myopathies dystrophiques de Duchenne et de Becker, la maladie de Steinert, la maladie de Huntington ou encore le syndrome de l'X fragile (pour revue Stephenson EL et al., 2009). Avec la récente découverte des cellules souches induites à la pluripotence et la possibilité de reprogrammer des cellules somatiques d'un patient, il est désormais possible d'étudier des pathologies pour lesquelles aucune lignée de cellules hES n'est disponible ou pour lesquels le ou les gènes impliqués n'ont pas été identifiés

B. Modélisation pathologique et cellules iPS

Les cellules iPS présentent deux avantages majeurs par rapport aux cellules hES, celui de pouvoir modéliser des pathologies pour lesquelles l'origine génétique n'a pas encore été déterminée et celui de pouvoir corréler les mécanismes pathologiques avec les symptômes du patient à partir duquel les cellules ont été dérivées. Il a ainsi été rapporté que les cellules iPS spécifiques d'un patient pouvaient être obtenues à partir de patients jeunes (Ebert AD et al., 2009) comme âgés de plus de 80 ans (Dimos JT et al., 2008). Ainsi la première étude à avoir décrit la possibilité de générer des iPS spécifiques du patient a été rapportée par Dimos et al., en 2008 en générant des cellules iPS à partir de fibroblastes issus d'une patiente agée de 82

ans présentant une forme familiale de la sclérose amyotrophique latérale (ALS) (Dimos JT et al., 2008). Dans un deuxième temps les auteurs de cette étude ont démontré qu'une fois différenciées en motoneurones, ces cellules iPS présentaient les mêmes déficits fonctionnels que ceux induits par cette pathologie avec notamment une réduction de leur nombre, de leur taille et de leur fonction synaptique.

L'utilisation des cellules souches pluripotentes humaines comme outils de modélisation pathologique de maladies génétiques nécessite toutefois la mise au point de protocole de différenciation extrêmement reproductible aboutissant à l'obtention du type cellulaire d'intérêt dont la fonction est altérée dans cette pathologie.

C. Kératinocytes dérivés de cellules souches pluripotentes et étude des génodermatoses

Les génodermatoses affectant l'épiderme peuvent présenter des phénotypes très variables. Au laboratoire nous cherchons à utiliser ce système pour étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans les différentes épidermolyses bulleuses dans un contexte développemental. Les épidermolyses bulleuses héréditaires (EBH) sont des génodermatoses rares caractérisées cliniquement par une fragilité épithéliale conduisant à la formation de bulles par clivage entre l'épiderme et le derme. Leur gravité est très variable, allant d'une gêne mineure à des formes rapidement mortelles. Ainsi l'identification des mutations génétiques induisant les différentes formes d'EBH a permis la distinction de trois groupes : 1) Les EB épidermolytiques ou simples (EBS) qui sont caractérisées par un clivage intraépidermique dû à des mutations de gènes codant pour les kératines K5 et K14. 2) Les EB jonctionnelles (EBJ) qui présentent des clivages situés à la jonction dermo-épidermique qui sont principalement dus à des mutations dans les gènes codant pour la laminine 5, son récepteur cellulaire composé des intégrines α6 et β4 et le collagène de type XVII ; 3) et les EB dermolytiques ou dystrophiques (EBD) qui présentent des défauts structuraux au niveau de la membrane basale épidermique dus à des défauts de collagène de type VII (Dellambra E et al., 1998 ; Mitsuhashi Y et al., 2003). Il n'existe à ce jour aucune lignée de cellules hES dérivées d'embryon porteur d'une mutation de ces différents gènes. Nous envisageons donc de reprogrammer des fibroblastes de patients en cellules iPS, de les différencier en kératinocytes et d'étudier les mécanismes moléculaires mis en jeu dans ce modèle pathologique mais dans un contexte développemental. La mise en place d'un tel modèle permettra l'identification de nouveaux mécanismes pathologiques et la recherche de composés pharmacologiques capables de corriger ces défauts d'adhérence par des approches de criblage à haut débit.

D. Melanocytes dérivés de cellules souches pluripotentes et modélisation des génodermatoses pigmentaires

Les troubles de la pigmentation représentent également un enjeu majeur de santé publique. Il existe en effet de nombreuses maladies affectant la pigmentation pouvant être d'origine génétique telles que les syndromes de Waardenburg, le syndrome de Griscelli, l'albinisme ou des maladies d'origines complexes tel que le vitiligo. A ce jour aucune lignée de cellules hES ou de cellules iPS porteuses des mutations causales de ces pathologies n'a été rapportée dans la littérature. La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement mélanocytaire humain reste encore des extrapolations de données recueillies dans des modèles de souris.

Le syndrome de Waardenburg est une maladie génétique de transmission autosomique dominante avec une prévalence de 1/ 42.000. Cette pathologie associe une surdité avec des anomalies de la pigmentation en se caractérisant notamment par un déficit de maturation des mélanocytes au cours du développement embryonnaire entrainant des anomalies de pigmentation de la peau, des cheveux et/ou de l'iris. Cette pathologie peut être due à des mutations de différents gènes impliqués dans la maturation, la différenciation ou la survie des mélanoblastes tels que PAX3 (WS de type 1 et 3), SOX10 (WS de type 4), MITF (WS de type 2) ou encore l'END3 et son recepteur EDNRB (WS de type 4). Les rôles de PAX3 et SOX10, ont clairement été associés à la régulation des processus de survie et la différenciation des mélanoblastes (Potterf SB et al., 2000). Par ailleurs, alors que MITF contrôle l'ensemble des mécanismes de différenciation des mélanoblastes en mélanocytes (Tachibana M et al., 1996 ; McGill GG et al., 2002) ainsi que le processus de mélanogénèse (Yasumoto K et al., 1997), le couple l'END3/EDNRB ont démontré être de puissants mitogènes des cellules de la crête neurale et des inducteurs de la différenciation de ces progéniteurs dans le lignage mélanocytaire (Dupin E et al., 2001). Il a par ailleurs été montré que l'ajout d'EDN3 pouvait induire la différenciation des cellules mES en mélanocytes (Aoki H et al., 2005 ; Pla P et al 2005). Une des études que j'ai effectué durant ma thèse a donc consisté à mettre en place un protocole de différenciation *in vitro* de cellules pluripotentes humaines en mélanocytes récapitulant l'ensemble des étapes du développement mélanocytaire. Nous avons ainsi confirmé que les melanocytes ainsi dérivés exprimaient bien les principaux marqueurs des crêtes neurales (PAX3, SOX10) mais également le facteur de transcription MITF et les gènes codant pour les enzymes de la mélanogénèse TRP1 et Tyrosinase. Ces données suggèrent qu'il serait possible de modéliser ce type de pathologie affectant la différenciation des progéniteurs mélanocytaires en utilisant soit des cellules hES porteuses de ces mutations, soit de cellules iPS reprogrammées à partir de fibroblastes de patients.

Nous avons également démontré que ces mélanocytes dérivées de cellules souches pluripotentes exprimaient la protéine Rab27a, impliquée dans le transport des mélanosomes, et que placées en conditions de coculture, ces dernières pouvaient les transférer dans des kératinocytes avoisinants. Ces données, en plus de démontrer la fonctionnalité de ces cellules permet d'envisager la modélisation de pathologies hypopigmantantes dues à un déficit dans le processus de transport des mélanosomes tels que le syndrome de Griscelli. En effet, le syndrome de Griscelli est une maladie génétique à transmission autosomique récessive caractérisée par un albinisme oculo-cutané et l'apparition d'un syndrome d'hyperactivation lymphocytaire et macrophagique. D'un point de vue moléculaire, cette pathologie est due à des mutations des principaux gènes impliqués dans transport des mélanosomes (Myosine VA et Rab27a) et se caractérise par une accumulation de mélanosomes dans les cytoplasmes de mélanocytes. Il apparait donc envisageable de récupérer des échantillons de patients afin d'obtenir des iPS qui une fois reprogrammées et différenciées représenteraient une source de cellules potentiellement illimitée utilisable pour la recherche de composés pharmacologiques capables de corriger ce déficit de transport.

L'albinisme (déficit en mélanine) et le vitiligo (dégénérescence des mélanocytes) sont également deux pathologies pigmentaires assez bien décrites d'un point de vue phénotypique mais très peu étudié dans un contexte embryonnaire chez l'homme. Des cellules iPS générées à partir de cellules de malades apparaissent donc être des modèles d'études intéressants dans une optique de compréhension des mécanismes développementaux chez l'homme.

Les cellules hES et iPS permettent donc d'identifier et de comprendre des mécanismes moléculaires impliqués dans la mise en place des tissus chez l'homme. Nous pouvons ainsi mettre en évidence des voies de signalisation, des facteurs de transcription ou des microARNs jouant des rôles majeurs dans le contrôle de ces processus. L'ensemble de ces informations permettent par la suite d'identifier des cibles thérapeutiques, qui dans un contexte pathologique sont défaillantes. Notre institut a pour objectif de mettre en évidence ces cibles et de découvrir de nouveaux moyens thérapeutiques pour l'ensemble de ces maladies rares pour lesquelles, à ce jour, aucun traitement n'est possible.

E. Développement mélanocytaires humains et mélanomes

L'incidence des cancers de la peau et en particulier les mélanomes est en progression constante dans les pays occidentaux, Les raisons épidémiologiques à l'origine de ce phénomène sont assez claires : climat, pollution, déplacement d'ethnie et culte du bronzage. Au niveau moléculaire, les mélanomes sont principalement caractérisés par trois critères 1) l'activation de la voie des MAP kinases, via les récepteurs à tyrosine kinase (RTK), pouvant résulter de mutations activatrices de N-Ras ou B-Raf (pour revue Russo AE et al., 2009) , 2)

l'activation constitutive de la voie de signalisation Wnt/β-caténine (Delmas V et al., 2007) et 3) la perte de production des gènes régulateurs du cycle cellulaire, comme p16INK4a (Delmas V et al., 2007). De manière intéressante les deux voies de signalisation, Wnt/β-caténine et RTK/N-Ras/B-Raf, ont été impliquées dans le développement normal et pathologique du lignage mélanocytaire et aboutissent toutes deux à la régulation de MITF (pour revue Denat L et al., 2007) Comme nous l'avons vue précédemment, MITF joue un rôle majeur dans la différenciation des mélanoblastes en melanocytes en activant l'enzyme clé de la mélanogenèse, la tyrosinase et ses enzymes accessoires, TRP1 et TRP2/Dct. Il a également été montré que MITF pouvait réguler à la fois la morphologie, la migration, et la prolifération des mélanocytes (pour revue Levy C et al., 2006). Par ailleurs il a été montré que plus de 90 % des échantillons de mélanomes exprimaient un fort niveau de MITF et que ce dernier était directement associé au pronostique vital des patients (Garraway LA et al., 2005) suggérant possible l'utilisation de ce facteur de transcription comme marqueur diagnostique de ce type de cancer cutané (Ugurel S al., 2007). En 2005, Garraway et al ont également mis en évidence un rôle oncogénique de MITF puisque sa surexpression pouvait induire la transformation primaire de mélanocytes (Garraway LA et al., 2005). De nombreuses études ont ainsi mis en avant que les mécanismes moléculaires associés à la formation des mélanomes étaient pour la plupart les mêmes que ceux impliqués dans le développement mélanocytaire au cours de l'embryogénèse. C'est notamment le cas de c-Kit et du recepteur à l'endothéline (EDNRB), deux récepteurs directement impliqués dans le contrôle de la différenciation des mélanoblastes en mélanocytes. Il a ainsi été montré que certaines formes rare de mélanomes muqueux pouvaient être déclenchés par des mutations entrainant la surexpression de c-Kit (Curtin JA et al., 2006) et que l'EDNRB et sa voie de signalisation jouaient un rôle dans la progression des mélanomes (pour revue Saldana-Caboverde A et al., 2010). Ainsi l'utilisation clinique d'antagonistes de ce recepteur se sont montrés capables de stabiliser la progression de ce type de cancer via le déclenchement des processus pro-apoptotiques et l'inhibition de leur prolifération (Berger Y et al., 2006). Sur la base de ces travaux, il apparait donc essentiel de pouvoir étudier, au cours du développement embryonnaire, le rôle de ces différents gènes impliqués dans la formation de mélanomes. Les cellules hES et iPS représentent pour cela un modèle d'étude unique permettant la mise en évidence des mécanismes moléculaires induits par ces différents gènes. La mise en place d'un tel modèle, fondé sur la différenciation des cellules souches pluripotentes, permettant *in fine* le développement de nouvelles pistes thérapeutiques et ainsi l'amélioration du pronostic vital des malades atteints de ce type de cancer.

III. Thérapie cellulaire de l'épiderme

A. Cellules souches pluripotentes et thérapie cellulaire

En 2009, la FDA (Food and Drug Administration), service gouvernemental responsable de la pharmacovigilance et de la mise sur le marché d'aliments et des médicaments sur le territoire américain a autorisé le premier essai clinique de thérapie cellulaire fondé sur l'utilisation de dérivés de cellules souches embryonnaires. Bien que ce dernier ait été récemment suspendu suite au réexamen de certaines données obtenues sur les animaux, cet essai clinique devrait être conduit par la société californienne Geron (Menlo Park, CA, USA) sur 8 à 10 patients présentant des lésions de la moelle épinière. L'objectif de cette étude est de démontrer que des cellules souches embryonnaires humaines différenciées en population homogène d'oligodendrocytes peuvent améliorer les symptômes de patients souffrant de lésions subaiguës « complètes » de la moelle épinière dorsale (Rossi SL et al., 2009). Ce traitement nommé "GRNOPC1" fait suite aux travaux publiés par cette compagnie qui démontra en 2005 que ces cellules pouvaient stimuler la croissance du tissu nerveux et sa remyélinisation dans un modèle de souris souffrant de lésion aiguë de la moelle épinière (Keirstead HS et al, 2005). Les auteurs de cette étude ayant démontré que ce traitement aboutissait à la restauration des capacités motrices de ces modèles animaux (Keirstead HS et al, 2005). Il apparait donc aujourd'hui envisageable de traiter des patients avec des cellules dérivées de cellules souches embryonnaires. La dernière partie de ma thèse a donc consisté à identifier les populations cellulaires d'intérêt et d'évaluer la possibilité de les utiliser en clinique.

B. Utilisation des kératinocytes dérivés de cellules souches pluripotentes pour la thérapie cellulaire des grands brulés

Nous avons donc décrit une méthode permettant de différencier des cellules hES en kératinocytes et démontré que, expérimentalement du moins, ces cellules pouvaient être utilisées comme source cellulaire pour la production d'un épiderme humain (Guenou H et al., 2009). Pour passer de cette preuve de concept à la clinique, nous avons bien sûr de nombreux défis à relever (Nissan et al., Medecine/Science 2010, Annexe 2). Le premier est celui du changement d'échelle dont nous avons déjà eu l'occasion de présenter les différentes facettes. Le second est celui de la sécurité du geste, qui se décline au moins selon deux axes, la tolérance immunitaire et le risque tumoral. En ce qui concerne ce dernier, il n'existe pas encore de réponse absolue mais la multiplication actuelle des demandes d'autorisation d'essais cliniques auprès des agences réglementaires démontre au moins que la question est désormais posée dans des termes qui n'excluent pas l'accès au patient. Pour ce qui est de la réponse immunitaire, l'espoir est grand de voir des cellules d'origine embryonnaire provoquer

des réponses très limitées du fait de leur statut développemental précoce. En effet nous avons démontré que les cellules hESC différenciées en kératinocytes exprimaient une très faible quantité de protéines du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) suggérant un faible risque de rejet du greffon par le patient (Guenou H et al., 2009). Ces données expérimentales sont à associer avec des travaux encourageants, publiés en 2005, qui ont démontré que des kératinocytes isolés à partir de peaux fœtales, exprimant également une quantité faible de marqueurs du MHC, avaient été greffés à long terme (21 mois) chez des patients sans présenter aucun signe de rejet (Hohlfeld J et al., 2005). Ces deux dernières décennies, les avancés technologiques effectuées dans le domaine de la thérapie cellulaire ont permis d'améliorer considérablement le pronostic vital des grands brulés (Peschanski M et al., Regenerative Medicine 2010 Annexe 3). C'est dans ce cadre que notre équipe évalue actuellement la possibilité d'utiliser des kératinocytes dérivés de cellules souches embryonnaires en tant que pansement biologique temporaire. En effet, à ce jour le principal traitement disponible pour ces patients est l'autogreffe d'épiderme. Cette technique consiste à effectuer une biopsie cutanée de quelques mm2 dans une zone saine, d'en isoler les kératinocytes souches, de les amplifier *in vitro* et de leur permettre de reconstituer un épiderme qui sera finalement greffé sur le patient (Gallico GG et al., 1984). L'inconvénient majeur de cette technique étant le délai incompressible de trois semaines nécessaire à l'obtention d'une quantité suffisante de kératinocytes greffables, différentes stratégies sont actuellement utilisées pour limiter les risques de déshydratation et d'infection. C'est notamment le cas de la peau de cadavre decellularisée (allogreffes), de la peau de porc (xénogreffe) ou de substituts inertes ou biologiques contenant des fibroblastes ou des kératinocytes (Metcalfe AD et al., 2007). Cependant, aucune de ces technologies ne permet de s'affranchir du risque de rejet immunitaire et de transmission de maladies. Il apparait donc nécessaire de trouver des ressources biologiques alternatives présentant des capacités d'amplification importantes, capables de reconstruire un épiderme et qui une fois greffé, seront tolérés par le patient. Ce « graal » n'ayant pas encore été découvert, nous proposons d'évaluer au niveau clinique l'utilisation d'épidermes générés à partir de cellules hES. Le passage de ce protocole à la « clinique » nécessite de nombreuses précautions que nous sommes actuellement en train d'étudier. Nous sommes pour cela en train de mettre en place des conditions de production de ces cellules dans des conditions GMP (Good manufacturing practice) compatibles avec la greffe et d'évaluer le potentiel tumorigène de ces cellules.

De plus, la récente découverte de l'existence des cellules souches induites à la pluripotence, rend envisageable en théorie la possibilité de créer des centres de ressources biologiques inventoriant des kératinocytes dérivés de cellules iPS dont la combinaison des marqueurs du CMH aurait été caractérisés. En effet la diversité phénotypique humaine en termes de reconnaissance immunitaire est principalement due aux différentes combinaisons possibles

des différents allèles des gènes codant pour les HLA (Human Leucocyte Antigen)-A, B et DR. Statistiquement cela permet en temps normal d'aboutir à plus de 100 millions de combinaison différentes, assurant l'unicité immunitaire de chaque individu. Il est cependant possible de réduire cette diversité haplotypiques en sélectionnant des donneurs homozygotes pour les trois HLA-A, B and DR ("patients triple homozygotes"). L'utilisation de cellules iPS générées à partir de ces patients triple homozygotes permettrait de créer une banque de cellules haplotypées « Haplo-Bank » compatibles avec une grande partie de la population (N Nakatsuji et al 2008 CJ Taylor et al 2005). Ainsi il a été évalué que moins de 100 lignées seraient nécessaires pour recouvrir prés de 90% de la population japonaise. De même des études préliminaires réalisées sur la diversité allélique en France a permis de déterminer que plus de 20% de la population française pourrais être greffés sans risque de rejet avec seulement deux lignées (la lignée HLA A-1, B-8, DR-3 et la lignée A-3, B-7, DR-7). Ainsi caractérisée, cette banque permettrait aux médecins de venir puiser en fonction du besoin, des cellules présentant une combinaison de marqueurs HLA compatibles avec ceux du malade en attente de greffe. Cette piste de recherche nécessite cependant de transposer ce protocole de différenciation aux cellules hES. Ce travail de recherche est actuellement en cours d'étude dans notre équipe.

Un autre problème, directement liées à la greffe d'épiderme chez les grands brulés vient de leur composition unique en kératinocytes. En effet les patients nécessitant la greffe d'épiderme doivent une fois celle-ci effectuée, éviter toute exposition aux rayons UVs afin d'éviter tout risque de cancer. L'absence de mélanocytes dans ces épidermes représente donc un handicap important pour la vie des patients greffés. Une fois .la banque ce cellules haplotypées mise en place, il apparaitra également envisageable de réaliser des études précliniques afin d'évaluer la sécurité d'une greffe d'épiderme complémenté en mélanocytes dérivés de cellules hES ou iPS.

IV. Utilisation des cellules souches pluripotentes pour le criblage à haut débit et les études de toxicologie prédictive

Parallèlement à leur intérêt majeur dans le domaine de la médecine régénérative, les cellules souches pluripotentes humaines apparaissent aujourd'hui être une ressource biologique de premier ordre pour les industries pharmaceutiques et cosmétiques. En effet, les cellules souches pluripotentes présentent la particularité d'avoir un potentiel de prolifération illimité, de pouvoir se différencier dans l'ensemble des types cellulaires de l'organisme et de recouvrir un nombre quasi illimité de phénotypes pathologiques. L'ensemble de ces paramètres font donc de ces cellules un modèle de premier ordre pour le développement de stratégies de criblage à haut débit innovantes nécessaires à la découverte de nouveaux médicaments mais également pour la mise en place de modèle de toxicologie prédictive.

Dans une perspective d'utilisation industrielle, un changement d'échelle est toutefois nécessaire pour passer de la paillasse de laboratoire à la production en masse. Pour cela différents systèmes de production automatisées (Thomas RJ et al., 2009) et d'amplification en bioréacteurs (Come J, Nissan X et al., 2008 Annexe 4) ont été mis au point par différentes équipes.

A. Epidermes dérivés de cellules pluripotentes : Un challenge pour les industries pharmaceutiques, chimiques et cosmétiques

Entré en vigueur le 1er juin 2007, REACH (Registration, Evaluation and Authorization of CHemicals) est une règlementation imposée par l'Union européenne (UE) sur l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et les restrictions des substances chimiques. Ses principaux objectifs sont de mieux protéger la santé humaine et l'environnement contre les risques que peuvent poser les produits chimiques, de promouvoir les méthodes d'essai alternatives, la libre circulation des substances au sein du marché intérieur et de renforcer la compétitivité et l'innovation. REACH impose ainsi de tester l'ensemble des substances chimiques polluantes selon différents critères : la persistance, la bioaccumulation, le potentiel cancérigène, la toxicité, la mutagènicité, la reprotoxicité, la perturbation endocrinienne. Dans ce cadre, les modèles *in vitro* de reconstruction d'épiderme représentent un marché dont l'intérêt est majeur à la fois pour les industries pharmaceutiques et cosmétiques. En effet ce type de modèles tridimensionnels dérivés de cellules souches pluripotentes confère l'avantage d'être standardisé, de présenter un fond génétique stable et de pouvoir être produit en quantité quasi illimitée. Un tel modèle pourrait permettre de tester différents paramètres tels que l'absorption, la sensibilisation, la corrosion, l'irritation, la phototoxicité, la génotoxicité mais aussi l'inflammation ou la protection solaire.

B. Les études de toxicologies prédictives et de criblage à haut débit sur des dérivés de cellules souches pluripotentes

A ce jour, il a déjà été montré que les cellules souches embryonnaires pouvaient être un excellent modèle de reprotoxicologie. Ainsi, en 2002, L'ECVAM (the European Center for the Validation of Alternative Methods) a développé un test nommé "embryonic stem cell test" (EST) qui permet d'évaluer la cytotoxicité d'un composé pharmaceutique sur des cardiomyocytes dérivés de cellules mES (Genschow E et al., 2002). La transposition au modèle humain a par la suite été démontrée en 2008 via la mise en place de procédures expérimentales permettant la différenciation standardisée de cellules hES en cardiomyocytes (Adler S et al., 2008; Mehta A et al., 2008). Parallèlement, Stummann et al. ont développé un protocole permettant d'évaluer le caractère neurotoxique d'un composé pharmaceutique sur

des neurones dérivés de cellules hES. Cette étude ayant rapporté que le methylmercury, un des composés initialement mis en évidence dans le test EST, interférait avec les premières étapes de la neurogenèse (Stummann T et al., 2009). Récemment un troisième type d'étude de toxicologie prédictive fondé sur l'utilisation des cellules hES a permis de démontrer que la nicotine avait pour effet de modifier leur adhérence, leur prolifération et leur survie *in vitro* (Zdravkovic T et al., 2008). La multiplication de ce type d'approche ne sera possible qu'avec le développement de protocole de différenciation permettant d'obtenir des populations cellulaires dérivées de cellules souches pluripotentes pures, homogènes et fonctionnelles. C'est à ce titre que les mélanocytes dérivés de cellules souches pluripotentes apparaissent être un modèle unique de cellules pigmentées compatibles avec le High-Throughput Screening (HTS). En effet, nous avons démontré que ces cellules étaient capables de produire et sécréter des mélanosomes dans les kératinocytes avoisinant en conditions de coculture. Il apparait ainsi possible de se servir de ces cellules, préalablement sélectionnées en fonction de leur phototype, pour mettre en évidence des composés pharmaceutiques capables de corriger un phénotype hypo ou hyperpigmentant en modulant la mélanogénèse.

Les kératinocytes dérivés de cellules hES et iPS sont également des modèles intéressants pour le criblage à haut débit. En effet, ce type de cellules peut servir de ressources biologiques illimitées dans le but d'identifier des composés capables de stimuler ou inhiber leur différenciation, ce qui pourrait avoir un intérêt tout particulier pour des pathologies cutanées affectant la balance prolifération/différenciation tel que le psoriasis.

V. Conclusions

A partir de données expérimentales préalablement obtenues dans des études développementales dans des modèles tels que le Xenope, le poisson zèbre ou la souris, nous avons identifié des voies de signalisation et de facteurs moléculaires capables d'induire la différenciation des cellules souches pluripotentes dans les différents lignages neurectodermiques. Nous avons ainsi été en mesure de dériver des populations pures et homogènes de kératinocytes et de mélanocytes, les deux types cellulaires majoritaires de l'épiderme. Notre première étude a mis en évidence que ces cellules pouvaient servir à la fois comme modèle développemental pour l'identification des mécanismes moléculaires impliqués dans la mise en place de ces différentes progenies chez l'homme mais également comme ressource biologique à la mise en place de stratégies innovantes de thérapie cellulaire, de criblage à haut débit et de toxicologie prédictive. L'utilisation des cellules souches pluripotentes en clinique nécessitera toutefois de résoudre plusieurs obstacles parmi lesquels, leur sureté pour le patient qui devra être démontrée au travers d'études précliniques poussées. Le second enjeu est celui de la production qui doit nécessairement se rapprocher des

conditions GMP indispensables à toute utilisation clinique. Enfin dans le cas des cellules iPS, s'ajoutera également le développement de méthodes de reprogrammation alternatives à l'utilisation de virus intégratifs. Ces enjeux cruciaux nécessiteront probablement plusieurs années de travail mais ouvriront des perspectives de recherche quasi illimitées pour le traitement de nombreuses pathologies cutanées d'origines génétiques ou environnementales.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

-Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes.
Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, Vassena R, Bilić J, Pekarik V, Tiscornia G, Edel M, Boué S, Izpisúa Belmonte JC.
Nat Biotechnol. 2008 Nov;26(11):1276-84.
-Embryonic stem cells as a cellular model for neuroectodermal commitment and skin formation.
Aberdam D, Gambaro K, Medawar A, Aberdam E, Rostagno P, de la Forest Divonne S, Rouleau M.
C R Biol. 2007 Jun-Jul;330(6-7):479-84.
-Key role of p63 in BMP-4-induced epidermal commitment of embryonic stem cells.
Aberdam D, Gambaro K, Rostagno P, Aberdam E, de la Forest Divonne S, Rouleau M.
Cell Cycle. 2007 Feb 1;6(3):291-4.
-A pure population of ectodermal cells derived from human embryonic stem cells.
Aberdam E, Barak E, Rouleau M, de LaForest S, Berrih-Aknin S, Suter DM, Krause KH, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Aberdam D.
Stem Cells. 2008 Feb;26(2):440-4.
-Testing potential developmental toxicants with a cytotoxicity assay based on human embryonic stem cells.
Adler S, Lindqvist J, Uddenberg K, Hyllner J, Strehl R.
Altern Lab Anim. 2008 May;36(2):129-40.
-Structural and immunocytochemical characterization of keratinization in vertebrate epidermis and epidermal derivatives.
Alibardi L
Int Rev Cytol. 2006;253:177-259.
-Stem cells of the skin epithelium.
Alonso L, Fuchs E.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Sep 30;100 Suppl 1:11830-5.
-Derivation and spontaneous differentiation of human embryonic stem cells.
Amit M, Itskovitz-Eldor J.
J Anat. 2002 Mar;200(Pt 3):225-32.
-Maintenance of human embryonic stem cells in animal serum- and feeder layer-free culture conditions.
Amit M, Itskovitz-Eldor J.
Methods Mol Biol. 2006;331:105-13.
-The miRNA-processing enzyme dicer is essential for the morphogenesis and maintenance of hair follicles.
Andl T, Murchison EP, Liu F, Zhang Y, Yunta-Gonzalez M, Tobias JW, Andl CD, Seykora JT, Hannon GJ, Millar SE.
Curr Biol. 2006 May 23;16(10):1041-9.
-Transcriptional Repression of miR-34 Family Contributes to p63-Mediated Cell Cycle Progression in Epidermal Cells.
Antonini D, Russo MT, De Rosa L, Gorrese M, Del Vecchio L, Missero C.
J Invest Dermatol. 2010 Jan 21.
-Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells.
Aoi T, Yae K, Nakagawa M, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K, Chiba T, Yamanaka S.
Science. 2008 Aug 1;321(5889):699-702.
-Iris as a recipient tissue for pigment cells: organized in vivo differentiation of melanocytes and pigmented epithelium derived from embryonic stem cells in vitro.
Aoki H, Hara A, Motohashi T, Chem H, Kunisada T.
Dev Dyn. 2008 Sep;237(9):2394-404.
-Cooperative and indispensable roles of endothelin 3 and KIT signalings in melanocyte development.
Aoki H, Motohashi T, Yoshimura N, Yamazaki H, Yamane T, Panthier JJ, Kunisada T.
Dev Dyn. 2005 Jun;233(2):407-17.
-New insights into melanosome transport in vertebrate pigment cells.

Aspengren S, Hedberg D, Sköld HN, Wallin M.
Int Rev Cell Mol Biol. 2009;272:245-302.
-In vivo convergence of BMP and MAPK signaling pathways: impact of differential Smad1 phosphorylation on development and homeostasis.
Aubin J, Davy A, Soriano P.
Genes Dev. 2004 Jun 15;18(12):1482-94.
-Differentiation of embryonal stem cells into keratinocytes: comparison of wild-type and beta 1 integrin-deficient cells.
Bagutti C, Wobus AM, Fässler R, Watt FM.
Dev Biol. 1996 Oct 10;179(1):184-96.
-Differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatocyte-like cells in a serum-free adherent culture condition.
Baharvand H, Hashemi SM, Shahsavani M.
Differentiation. 2008 May;76(5):465-77.
-Zebrafish DeltaNp63 is a direct target of Bmp signaling and encodes a transcriptional repressor blocking neural specification in the ventral ectoderm.
Bakkers J, Hild M, Kramer C, Furutani-Seiki M, Hammerschmidt M.
Dev Cell. 2002 May;2(5):617-27.
-Retinoic acid inhibits downregulation of DeltaNp63alpha expression during terminal differentiation of human primary keratinocytes.
Bamberger C, Pollet D, Schmale H.
J Invest Dermatol. 2002 Jan;118(1):133-8.
-Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice.
Barberi T, Klivenyi P, Calingasan NY, Lee H, Kawamata H, Loonam K, Perrier AL, Bruses J, Rubio ME, Topf N, Tabar V, Harrison NL, Beal MF, Moore MA, Studer L.
Nat Biotechnol. 2003 Oct;21(10):1200-7.
-Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication.
Barrandon Y, Green H
Proc Natl Acad Sci U S A. 1987 Apr;84(8):2302-6.
-C-fos and c-jun proto-oncogene expression is decreased in psoriasis: an in situ quantitative analysis.
Basset-Séguin N, Escot C, Molès JP, Blanchard JM, Kerai C, Guilhou JJ.
J Invest Dermatol. 1991 Oct;97(4):672-8.
-Interaction of endothelin-3 with endothelin-B receptor is essential for development of epidermal melanocytes and enteric neurons.
Baynash AG, Hosoda K, Giaid A, Richardson JA, Emoto N, Hammer RE, Yanagisawa M.
Cell. 1994 Dec 30;79(7):1277-85.
-Targeting the endothelin axis in human melanoma: combination of endothelin receptor antagonism and alkylating agents.
Berger Y, Bernasconi CC, Juillerat-Jeanneret L.
Exp Biol Med (Maywood). 2006 Jun;231(6):1111-9.
-PGD-derived human embryonic stem cell lines as a powerful tool for the study of human genetic disorders.
Ben-Yosef D, Malcov M, Eiges R.
Mol Cell Endocrinol. 2008 Jan 30;282(1-2):153-8. Epub 2007 Nov 22.
-Dicer is essential for mouse development.
Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, Mills AA, Elledge SJ, Anderson KV, Hannon GJ.
Nat Genet. 2003 Nov;35(3):215-7.
-Dose and context dependent effects of Myc on epidermal stem cell proliferation and differentiation.
Berta MA, Baker CM, Cottle DL, Watt FM.
EMBO Mol Med. 2010 Jan;2(1):16-25.
-Hematopoietic stem cell characterization by Hoechst 33342 and rhodamine 123 staining.

Bertoncello I, Williams B.
Methods Mol Biol. 2004;263:181-200.
-Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells.
Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R, Young RA.
Cell. 2005 Sep 23;122(6):947-56.
-Feeder-free culture of human embryonic stem cells in conditioned medium for efficient genetic modification.
Braam SR, Denning C, Matsa E, Young LE, Passier R, Mummery CL.
Nat Protoc. 2008;3(9):1435-43.
-Biochemical composition of the epidermal-dermal junction and other basement membrane.
Briggaman RA.
J Invest Dermatol. 1982 Jan;78(1):1-6.
-Peripheral sensory neurons differentiate from neural precursors derived from human embryonic stem cells.
Brokhman I, Gamarnik-Ziegler L, Pomp O, Aharonowiz M, Reubinoff BE, Goldstein RS.
Differentiation. 2008 Feb;76(2):145-55.
-Analysis of the early stages of trunk neural crest migration in avian embryos using monoclonal antibody HNK-1.
Bronner-Fraser M.
Dev Biol. 1986 May;115(1):44-55.
-Signaling via Src family kinases is required for normal internalization of the receptor c-Kit.
Broudy VC, Lin NL, Liles WC, Corey SJ, O'Laughlin B, Mou S, Linnekin D.
Blood. 1999 Sep 15;94(6):1979-86.
-Derivation of functional retinal pigmented epithelium from induced pluripotent stem cells.
Buchholz DE, Hikita ST, Rowland TJ, Friedrich AM, Hinman CR, Johnson LV, Clegg DO.
Stem Cells. 2009 Oct;27(10):2427-34.
-Type VII collagen, anchoring fibrils, and epidermolysis bullosa.
Burgeson RE.
J Invest Dermatol. 1993 Sep;101(3):252-5.
-Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity.
Bylund M, Andersson E, Novitch BG, Muhr J.
Nat Neurosci. 2003 Nov;6(11):1162-8.
-Absence of Nodal signaling promotes precocious neural differentiation in the mouse embryo.
Camus A, Perea-Gomez A, Moreau A, Collignon J.
Dev Biol. 2006 Jul 15;295(2):743-55.
-TAp63 and DeltaNp63 in cancer and epidermal development.
Candi E, Dinsdale D, Rufini A, Salomoni P, Knight RA, Mueller M, Krammer PH, Melino G.
Cell Cycle. 2007 Feb 1;6(3):274-85.
-Differential roles of p63 isoforms in epidermal development: selective genetic complementation in p63 null mice.
Candi E, Rufini A, Terrinoni A, Dinsdale D, Ranalli M, Paradisi A, De Laurenzi V, Spagnoli LG, Catani MV, Ramadan S, Knight RA, Melino G.
Cell Death Differ. 2006 Jun;13(6):1037-47.
-Oct4/Sox2-regulated miR-302 targets cyclin D1 in human embryonic stem cells.
Card DA, Hebbar PB, Li L, Trotter KW, Komatsu Y, Mishina Y, Archer TK.
Mol Cell Biol. 2008 Oct;28(20):6426-38.
-p63 regulates an adhesion programme and cell survival in epithelial cells.
Carroll DK, Carroll JS, Leong CO, Cheng F, Brown M, Mills AA, Brugge JS, Ellisen LW.
Nat Cell Biol. 2006 Jun;8(6):551-61.
-Enrichment of neurons and neural precursors from human embryonic stem cells.
Carpenter MK, Inokuma MS, Denham J, Mujtaba T, Chiu CP, Rao MS.
Exp Neurol. 2001 Dec;172(2):383-97.
-Nanog: a new recruit to the embryonic stem cell orchestra.
Cavaleri F, Schöler HR.

Cell. 2003 May 30;113(5):551-2.
-Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells.
Chadwick K, Wang L, Li L, Menendez P, Murdoch B, Rouleau A, Bhatia M.
Blood. 2003 Aug 1;102(3):906-15.
-Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling.
Chambers SM, Fasano CA, Papapetrou EP, Tomishima M, Sadelain M, Studer L.
Nat Biotechnol. 2009 Mar;27(3):275-80.
-Live cell imaging distinguishes bona fide human iPS cells from partially reprogrammed cells.
Chan EM, Ratanasirintrawoot S, Park IH, Manos PD, Loh YH, Huo H, Miller JD, Hartung O, Rho J, Ince TA, Daley GQ, Schlaeger TM.
Nat Biotechnol. 2009 Nov;27(11):1033-7.
-Defining embryonic stem cell identity using differentiation-related microRNAs and their potential targets.
Chen C, Ridzon D, Lee CT, Blake J, Sun Y, Strauss WM.
Mamm Genome. 2007 May;18(5):316-27.
-The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation.
Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, Conlon FL, Wang DZ.
Nat Genet. 2006 Feb;38(2):228-33.
-Microphthalmia-associated transcription factor regulates RAB27A gene expression and controls melanosome transport.
Chiaverini C, Beuret L, Flori E, Busca R, Abbe P, Bille K, Bahadoran P, Ortonne JP, Bertolotto C, Ballotti R.
J Biol Chem. 2008 May 2;283(18):12635-42.
-Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures.
Chin MH, Mason MJ, Xie W, Volinia S, Singer M, Peterson C, Ambartsumyan G, Aimiuwu O, Richter L, Zhang J, Khvorostov I, Ott V, Grunstein M, Lavon N, Benvenisty N, Croce CM, Clark AT, Baxter T, Pyle AD, Teitell MA, Pelegrini M, Plath K, Lowry WE.
Cell Stem Cell. 2009 Jul 2;5(1):111-23.
-Vitamin D receptor is essential for normal keratinocyte stem cell function.
Cianferotti L, Cox M, Skorija K, Demay MB.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 May 29;104(22):9428-33.
-Reconstituted skin from murine embryonic stem cells.
Coraux C, Hilmi C, Rouleau M, Spadafora A, Hinnrasky J, Ortonne JP, Dani C, Aberdam D.
Curr Biol. 2003 May 13;13(10):849-53.
-Epithelial stem cells in the skin: definition, markers, localization and functions.
Cotsarelis G, Kaur P, Dhouailly D, Hengge U, Bickenbach J.
Exp Dermatol. 1999 Feb;8(1):80-8.
-Somatic activation of KIT in distinct subtypes of melanoma.
Curtin JA, Busam K, Pinkel D, Bastian BC.
J Clin Oncol. 2006 Sep 10;24(26):4340-6. Epub 2006 Aug 14.
-Multiple roles for activated LEF/TCF transcription complexes during hair follicle development and differentiation.
DasGupta R, Fuchs E.
Development. 1999 Oct;126(20):4557-68.
-miRNAs are essential for survival and differentiation of newborn neurons but not for expansion of neural progenitors during early neurogenesis in the mouse embryonic neocortex.
De Pietri Tonelli D, Pulvers JN, Haffner C, Murchison EP, Hannon GJ, Huttner WB.
Development. 2008 Dec;135(23):3911-21.
-Dorsal-ventral patterning and neural induction in Xenopus embryos.
De Robertis EM, Kuroda H.

Annu Rev Cell Dev Biol. 2004;20:285-308.
-A preclinical model for the analysis of genetically modified human skin in vivo.
Del Rio M, Larcher F, Serrano F, Meana A, Muñoz M, Garcia M, Muñoz E, Martin C, Bernad A, Jorcano JL.
Hum Gene Ther. 2002 May 20;13(8):959-68.
-Downregulation of 14-3-3sigma prevents clonal evolution and leads to immortalization of primary human keratinocytes.
Dellambra E, Golisano O, Bondanza S, Siviero E, Lacal P, Molinari M, D'Atri S, De Luca M.
J Cell Biol. 2000 May 29;149(5):1117-30.
-Corrective transduction of human epidermal stem cells in laminin-5-dependent junctional epidermolysis bullosa.
Dellambra E, Vailly J, Pellegrini G, Bondanza S, Golisano O, Macchia C, Zambruno G, Meneguzzi G, De Luca M.
Hum Gene Ther. 1998 Jun 10;9(9):1359-70.
-Cutaneous melanoma in childhood and adolescence shows frequent loss of INK4A and gain of KIT.
Daniotti M, Ferrari A, Frigerio S, Casieri P, Miselli F, Zucca E, Collini P, Della Torre G, Manoukian S, Peissel B, Bono A, Santinami M, Parmiani G, Rivoltini L, Pilotti S, Rodolfo M.
J Invest Dermatol. 2009 Jul;129(7):1759-68. Epub 2009 Jan 22.
-Beta-catenin induces immortalization of melanocytes by suppressing p16INK4a expression and cooperates with N-Ras in melanoma development.
Delmas V, Beermann F, Martinozzi S, Carreira S, Ackermann J, Kumasaka M, Denat L, Goodall J, Luciani F, Viros A, Demirkan N, Bastian BC, Goding CR, Larue L.
Genes Dev. 2007 Nov 15;21(22):2923-35.
-Malignant melanoma and the role of the paradoxal protein Microphthalmia transcription factor
Denat L, Larue L.
Bull Cancer. 2007 Jan 1;94(1):81-92.
-Control of neural crest cell fate by the Wnt signalling pathway.
Dorsky RI, Moon RT, Raible DW.
Nature. 1998 Nov 26;396(6709):370-3.
-Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons.
Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, Croft GF, Saphier G, Leibel R, Goland R, Wichterle H, Henderson CE, Eggan K.
Science. 2008 Aug 29;321(5893):1218-21.
-MLANA/MART1 and SILV/PMEL17/GP100 are transcriptionally regulated by MITF in melanocytes and melanoma.
Du J, Miller AJ, Widlund HR, Horstmann MA, Ramaswamy S, Fisher DE.
Am J Pathol. 2003 Jul;163(1):333-43.
-The neural crest stem cells: control of neural crest cell fate and plasticity by endothelin-3.
Dupin E, Real C, Ledouarin N.
An Acad Bras Cienc. 2001 Dec;73(4):533-45.
-WNT1 and WNT3a promote expansion of melanocytes through distinct modes of action.
Dunn KJ, Brady M, Ochsenbauer-Jambor C, Snyder S, Incao A, Pavan WJ.
Pigment Cell Res. 2005 Jun;18(3):167-80.
-Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient.
Ebert AD, Yu J, Rose FF Jr, Mattis VB, Lorson CL, Thomson JA, Svendsen CN.
Nature. 2009 Jan 15;457(7227):277-80.
-Notch, a universal arbiter of cell fate decisions.
Ehebauer M, Hayward P, Arias AM.
Science. 2006 Dec 1;314(5804):1414-5.
-Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage.

Elkabetz Y, Panagiotakos G, Al Shamy G, Socci ND, Tabar V, Studer L.
Genes Dev. 2008 Jan 15;22(2):152-65.
-Splotch (Sp2H), a mutation affecting development of the mouse neural tube, shows a deletion within the paired homeodomain of Pax-3.
Epstein DJ, Vekemans M, Gros P.
Cell. 1991 Nov 15;67(4):767-74.
-Role of the Notch ligand Delta1 in embryonic and adult mouse epidermis.
Estrach S, Cordes R, Hozumi K, Gossler A, Watt FM.
J Invest Dermatol. 2008 Apr;128(4):825-32.
-Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing.
Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E.
Cell. 2008 Jan 11;132(1):9-14.
-Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos.
Evans MJ, Kaufman MH.
Nature. 1981 Jul 9;292(5819):154-6.
-Defining the conditions for the generation of melanocytes from human embryonic stem cells.
Fang D, Leishear K, Nguyen TK, Finko R, Cai K, Fukunaga M, Li L, Brafford PA, Kulp AN, Xu X, Smalley KS, Herlyn M.
Stem Cells. 2006 Jul;24(7):1668-77.
-Long-term expansion of human functional epidermal precursor cells: promotion of extensive amplification by low TGFb1 concentrations.
Fortunel NO, Hatzfeld JA, Rosemary P-A, Ferraris C, Monier MN, Haydont V et al.
J Cell Sci. 2003 Oct 1;116(Pt 19):4043-52.
-Getting under the skin of epidermal morphogenesis.
Fuchs E, Raghavan S.
Nat Rev Genet. 2002 Mar;3(3):199-209.
-Fluorescence-activated cell sorting-based purification of embryonic stem cell-derived neural precursors averts tumor formation after transplantation.
Fukuda H, Takahashi J, Watanabe K, Hayashi H, Morizane A, Koyanagi M, Sasai Y, Hashimoto N.
Stem Cells. 2006 Mar;24(3):763-71.
-Bone morphogenetic proteins (BMPs) as regulators of dorsal forebrain development.
Furuta Y, Piston DW, Hogan BL.
Development. 1997 Jun;124(11):2203-12.
-Generation of murine hepatic lineage cells from induced pluripotent stem cells.
Gai H, Nguyen DM, Joon Moon Y, Aguila JR, Fink LM, Ward DC, Ma Y.
Differentiation. 2010 Jan 25. [Epub ahead of print]
-Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium.
Gallico GG 3rd, O'Connor NE, Compton CC, Kehinde O, Green H.
N Engl J Med. 1984 Aug 16;311(7):448-51.
-BMP-4 induces a Smad-dependent apoptotic cell death of mouse embryonic stem cell-derived neural precursors.
Gambaro K, Aberdam E, Virolle T, Aberdam D, Rouleau M.
Cell Death Differ. 2006 Jul;13(7):1075-87.
-Extracellular matrix-induced transforming growth factor-beta receptor signaling dynamics.
Garamszegi N, Garamszegi SP, Samavarchi-Tehrani P, Walford E, Schneiderbauer MM, Wrana JL, Scully SP.
Oncogene. 2010 Jan 25. [Epub ahead of print]
-Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma.
Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA, Getz G, Berger AJ, Ramaswamy S, Beroukhim R, Milner DA, Granter SR, Du J, Lee C, Wagner SN, Li C, Golub TR, Rimm DL, Meyerson ML, Fisher DE, Sellers WR.
Nature. 2005 Jul 7;436(7047):117-22.

-Neur-ons and neur-offs: regulators of neural induction in vertebrate embryos and embryonic stem cells.
Gaulden J, Reiter JF.
Hum Mol Genet. 2008 Apr 15;17(R1):R60-6.
-Antagonizing the Spemann organizer: role of the homeobox gene Xvent-1.
Gawantka V, Delius H, Hirschfeld K, Blumenstock C, Niehrs C.
EMBO J. 1995 Dec 15;14(24):6268-79.
-Myc regulates keratinocyte adhesion and differentiation via complex formation with Miz1.
Gebhardt A, Frye M, Herold S, Benitah SA, Braun K, Samans B, Watt FM, Elsässer HP, Eilers M.
J Cell Biol. 2006 Jan 2;172(1):139-49.
-The ECVAM international validation study on in vitro embryotoxicity tests: results of the definitive phase and evaluation of prediction models. European Centre for the Validation of Alternative Methods.
Genschow E, Spielmann H, Scholz G, Seiler A, Brown N, Piersma A, Brady M, Clemann N, Huuskonen H, Paillard F, Bremer S, Becker K.
Altern Lab Anim. 2002 Mar-Apr;30(2):151-76.
-Molecular characterization and functional properties of cardiomyocytes derived from human inducible pluripotent stem cells.
Germanguz I, Sedan O, Zeevi-Levin N, Shtreichman R, Barak E, Ziskind A, Eliyahu S, Meiry G, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Binah O.
J Cell Mol Med. 2009 Dec 11. [Epub ahead of print]
-MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish.
Giraldez AJ, Cinalli RM, Glasner ME, Enright AJ, Thomson JM, Baskerville S, Hammond SM, Bartel DP, Schier AF.
Science. 2005 May 6;308(5723):833-8.
-Mitf from neural crest to melanoma: signal transduction and transcription in the melanocyte lineage.
Goding CR.
Genes Dev. 2000 Jul 15;14(14):1712-28.
-Agouti protein inhibits the production of eumelanin and phaeomelanin in the presence and absence of alpha-melanocyte stimulating hormone.
Graham A, Wakamatsu K, Hunt G, Ito S, Thody AJ.
Pigment Cell Res. 1997 Oct;10(5):298-303.
-Noggin and chordin have distinct activities in promoting lineage commitment of mouse embryonic stem (ES) cells.
Gratsch TE, O'Shea KS.
Dev Biol. 2002 May 1;245(1):83-94.
-Marker succession during the development of keratinocytes from cultured human embryonic stem cells.
Green H, Easley K, Iuchi S.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Dec 23;100(26):15625-30.
-The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1.
Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, Vadas MA, Khew-Goodall Y, Goodall GJ.
Nat Cell Biol. 2008 May;10(5):593-601.
-Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control C. elegans developmental timing.
Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, Baillie DL, Fire A, Ruvkun G, Mello CC.
Cell. 2001 Jul 13;106(1):23-34.
-Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study.

Guenou H, Nissan X, Larcher F, Feteira J, Lemaitre G, Saidani M, Del Rio M, Barrault CC, Bernard FX, Peschanski M, Baldeschi C, Waksman G.
Lancet. 2009 Nov 21;374(9703):1745-53.
-Neuron-like differentiation and selective ablation of undifferentiated embryonic stem cells containing suicide gene with Oct-4 promoter.
Hara A, Aoki H, Taguchi A, Niwa M, Yamada Y, Kunisada T, Mori H.
Stem Cells Dev. 2008 Aug;17(4):619-27.
-Disruption of BMP signals in embryonic Xenopus ectoderm leads to direct neural induction.
Hawley SH, Wünnenberg-Stapleton K, Hashimoto C, Laurent MN, Watabe T, Blumberg BW, Cho KW.
Genes Dev. 1995 Dec 1;9(23):2923-35.
-Mammalian tyrosinase--the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation.
Hearing VJ, Jiménez M.
Int J Biochem. 1987;19(12):1141-7.
-Enzymatic control of pigmentation in mammals.
Hearing VJ, Tsukamoto K.
FASEB J. 1991 Nov;5(14):2902-9.
-Derivation, characterization, and differentiation of human embryonic stem cells.
Heins N, Englund MC, Sjöblom C, Dahl U, Tonning A, Bergh C, Lindahl A, Hanson C, Semb H.
Stem Cells. 2004;22(3):367-76.
-Follistatin, an antagonist of activin, is expressed in the Spemann organizer and displays direct neuralizing activity.
Hemmati-Brivanlou A, Kelly OG, Melton DA.
Cell. 1994 Apr 22;77(2):283-95.
-Vertebrate neural induction.
Hemmati-Brivanlou A, Melton D.
Annu Rev Neurosci. 1997;20:43-60.
-Ventral mesodermal patterning in Xenopus embryos: expression patterns and activities of BMP-2 and BMP-4.
Hemmati-Brivanlou A, Thomsen GH.
Dev Genet. 1995;17(1):78-89.
-UVA, pheomelanin and the carcinogenesis of melanoma.
Hill HZ, Hill GJ.
Pigment Cell Res. 2000;13 Suppl 8:140-4.
-Human embryonic stem cell stability.
Hoffman LM, Carpenter MK.
Stem Cell Rev. 2005;1(2):139-44.
-Bone morphogenetic proteins in development.
Hogan BL.
Curr Opin Genet Dev. 1996 Aug;6(4):432-8.
-Tissue engineered fetal skin constructs for paediatric burns.
Hohlfeld J, de Buys Roessingh A, Hirt-Burri N, Chaubert P, Gerber S, Scaletta C, Hohlfeld P, Applegate LA.
Lancet. 2005 Sep 3-9;366(9488):840-2.
-Neural precursors derived from human embryonic stem cells maintain long-term proliferation without losing the potential to differentiate into all three neural lineages, including dopaminergic neurons.
Hong S, Kang UJ, Isacson O, Kim KS.
J Neurochem. 2008 Jan;104(2):316-24.
-BMP-2/-4 and Wnt-8 cooperatively pattern the Xenopus mesoderm.
Hoppler S, Moon RT.
Mech Dev. 1998 Feb;71(1-2):119-29.
-Targeted and natural (piebald-lethal) mutations of endothelin-B receptor gene produce megacolon associated with spotted coat color in mice.

Hosoda K, Hammer RE, Richardson JA, Baynash AG, Cheung JC, Giaid A, Yanagisawa M.
Cell. 1994 Dec 30;79(7):1267-76.
-A tissue-restricted cAMP transcriptional response: SOX10 modulates alpha-melanocyte-stimulating hormone-triggered expression of microphthalmia-associated transcription factor in melanocytes.
Huber WE, Price ER, Widlund HR, Du J, Davis IJ, Wegner M, Fisher DE.
J Biol Chem. 2003 Nov 14;278(46):45224-30.
-The leaden gene product is required with Rab27a to recruit myosin Va to melanosomes in melanocytes.
Hume AN, Collinson LM, Hopkins CR, Strom M, Barral DC, Bossi G, Griffiths GM, Seabra MC
Traffic. 2002 Mar;3(3):193-202.
-Rab27a and MyoVa are the primary Mlph interactors regulating melanosome transport in melanocytes.
Hume AN, Ushakov DS, Tarafder AK, Ferenczi MA, Seabra MC.
J Cell Sci. 2007 Sep 1;120(Pt 17):3111-22.
-Wnt signalling required for expansion of neural crest and CNS progenitors.
Ikeya M, Lee SM, Johnson JE, McMahon AP, Takada S.
Nature. 1997 Oct 30;389(6654):966-70.
-Intracellular signaling mechanisms leading to synergistic effects of endothelin-1 and stem cell factor on proliferation of cultured human melanocytes. Cross-talk via trans-activation of the tyrosine kinase c-kit receptor.
Imokawa G, Kobayasi T, Miyagishi M.
J Biol Chem. 2000 Oct 27;275(43):33321-8.
-In vitro clonal analysis of mouse neural crest development.
Ito K, Morita T, Sieber-Blum M.
Dev Biol. 1993 Jun;157(2):517-25.
-Removal of stem cell factor or addition of monoclonal anti-c-KIT antibody induces apoptosis in murine melanocyte precursors.
Ito M, Kawa Y, Ono H, Okura M, Baba T, Kubota Y, Nishikawa SI, Mizoguchi M.
J Invest Dermatol. 1999 May;112(5):796-801.
-Signaling of transforming growth factor-beta family members through Smad proteins.
Itoh S, Itoh F, Goumans MJ, Ten Dijke P.
Eur J Biochem. 2000 Dec;267(24):6954-67.
-Derivation of neural precursors from human embryonic stem cells in the presence of noggin.
Itsykson P, Ilouz N, Turetsky T, Goldstein RS, Pera MF, Fishbein I, Segal M, Reubinoff BE.
Mol Cell Neurosci. 2005 Sep;30(1):24-36.
-Immortalized keratinocyte lines derived from human embryonic stem cells.
Iuchi S, Dabelsteen S, Easley K, Rheinwald JG, Green H.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Feb 7;103(6):1792-7.
-MicroRNA regulation of cell lineages in mouse and human embryonic stem cells.
Ivey KN, Muth A, Arnold J, King FW, Yeh RF, Fish JE, Hsiao EC, Schwartz RJ, Conklin BR, Bernstein HS, Srivastava D.
Cell Stem Cell. 2008 Mar 6;2(3):219-29.
-Identification of the albino mutation of mouse tyrosinase by analysis of an in vitro revertant.
Jackson IJ, Bennett DC.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Sep;87(18):7010-4.
-Characterization of TRP-1 mRNA levels in dominant and recessive mutations at the mouse brown (b) locus.
Jackson IJ, Chambers D, Rinchik EM, Bennett DC.
Genetics. 1990 Oct;126(2):451-9.
-A second tyrosinase-related protein, TRP-2, maps to and is mutated at the mouse slaty locus.
Jackson IJ, Chambers DM, Tsukamoto K, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Hearing V.
EMBO J. 1992 Feb;11(2):527-35.

-TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells.
James D, Levine AJ, Besser D, Hemmati-Brivanlou A.
Development. 2005 Mar;132(6):1273-82.
-Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in intégrine function and expression.
Jones PH, Watt FM
Cell. 1993 May 21;73(4):713-24.
-Generation and differentiation of human embryonic stem cell-derived keratinocyte precursors.
Ji L, Allen-Hoffmann BL, de Pablo JJ, Palecek SP.
Tissue Eng. 2006 Apr;12(4):665-79.
-Wnt and BMP signaling govern lineage segregation of melanocytes in the avian embryo.
Jin EJ, Erickson CA, Takada S, Burrus LW.
Dev Biol. 2001 May 1;233(1):22-37.
-Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency.
Judson RL, Babiarz JE, Venere M, Blelloch R.
Nat Biotechnol. 2009 May;27(5):459-61.
-Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors.
Kaji K, Norrby K, Paca A, Mileikovsky M, Mohseni P, Woltjen K.
Nature. 2009 Apr 9;458(7239):771-5.
-Sox1 acts through multiple independent pathways to promote neurogenesis.
Kan L, Israsena N, Zhang Z, Hu M, Zhao LR, Jalali A, Sahni V, Kessler JA.
Dev Biol. 2004 May 15;269(2):580-94.
-Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing.
Kanellopoulou C, Muljo SA, Kung AL, Ganesan S, Drapkin R, Jenuwein T, Livingston DM, Rajewsky K.
Genes Dev. 2005 Feb 15;19(4):489-501.
-BMP signaling is essential for development of skeletogenic and neurogenic cranial neural crest.
Kanzler B, Foreman RK, Labosky PA, Mallo M.
Development. 2000 Mar;127(5):1095-104.
-MicroRNAs show a wide diversity of expression profiles in the developing and mature central nervous system.
Kapsimali M, Kloosterman WP, de Bruijn E, Rosa F, Plasterk RH, Wilson SW.
Genome Biol. 2007;8(8):R173.
-Transcriptional regulation of BMP4 synexpression in transgenic Xenopus.
Karaulanov E, Knöchel W, Niehrs C.
EMBO J. 2004 Feb 25;23(4):844-56.
-Interfollicular Epidermal Stem Cells: Identification, Challenges, Potential
Kaur P.
J Invest Dermatol. 2006 Jul;126(7):1450-8.
-Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity.
Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, Kaneko S, Kuwana Y, Nakanishi S, Nishikawa SI, Sasai Y.
Neuron. 2000 Oct;28(1):31-40.
-Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury.
Keirstead HS, Nistor G, Bernal G, Totoiu M, Cloutier F, Sharp K, Steward O.
J Neurosci. 2005 May 11;25(19):4694-705.
-p63 is the molecular switch for initiation of an epithelial stratification program.
Koster MI, Kim S, Mills AA, DeMayo FJ, Roop DR.
Genes Dev. 2004 Jan 15;18(2):126-31.

-Generation of induced pluripotent stem cells from neural stem cells.
Kim JB, Zaehres H, Araúzo-Bravo MJ, Schöler HR.
Nat Protoc. 2009;4(10):1464-70.
-p63: defining roles in morphogenesis, homeostasis, and neoplasia of the epidermis.
King KE, Weinberg WC.
Mol Carcinog. 2007 Aug;46(8):716-24. Review.
-Tgf-Beta signaling in development.
Kitisin K, Saha T, Blake T, Golestaneh N, Deng M, Kim C, Tang Y, Shetty K, Mishra B, Mishra L.
Sci STKE. 2007 Aug 14;2007(399):cm1.
-Specific microRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis.
Krichevsky AM, Sonntag KC, Isacson O, Kosik KS.
Stem Cells. 2006 Apr;24(4):857-64.
-Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo.
Kroon E, Martinson LA, Kadoya K, Bang AG, Kelly OG, Eliazer S, Young H, Richardson M, Smart NG, Cunningham J, Agulnick AD, D'Amour KA, Carpenter MK, Baetge EE.
Nat Biotechnol. 2008 Apr;26(4):443-52.
-Murine cutaneous mastocytosis and epidermal melanocytosis induced by keratinocyte expression of transgenic stem cell factor.
Kunisada T, Lu SZ, Yoshida H, Nishikawa S, Nishikawa S, Mizoguchi M, Hayashi S, Tyrrell L, Williams DA, Wang X, Longley BJ.
J Exp Med. 1998 May 18;187(10):1565-73.
-Keratin profiles may differ between intraepidermal and intradermal invasive eccrine porocarcinoma.
Kurokawa I, Urakawa Y, Senba Y, Kawabata E, Nishimura K, Omoto Y, Tokime K, Mizutani H, Tsubura A.
Oncol Rep. 2006 Sep;16(3):473-7.
-Eumelanin biosynthesis is regulated by coordinate expression of tyrosinase and tyrosinase-related protein-1 genes.
Kuzumaki T, Matsuda A, Wakamatsu K, Ito S, Ishikawa K.
Exp Cell Res. 1993 Jul;207(1):33-40.
-MicroRNA1 influences cardiac differentiation in Drosophila and regulates Notch signaling.
Kwon C, Han Z, Olson EN, Srivastava D.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Dec 27;102(52):18986-91.
-Cytoskeletal events underlying dendrite formation by cultured pigment cells.
Lacour JP, Gordon PR, Eller M, Bhawan J, Gilchrest BA.
J Cell Physiol. 1992 May;151(2):287-99.
-Endothelin 3 promotes neural crest cell proliferation and mediates a vast increase in melanocyte number in culture.
Lahav R, Ziller C, Dupin E, Le Douarin NM.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1996 Apr 30;93(9):3892-7.
-Human side population keratinocytes exhibit long-term proliferative potential and a specific gene expression profile and can form a pluristratified epidermis.
Larderet G, Fortunel NO, Vaigot P, Cegalerba M, Maltère P, Zobiri O, Gidrol X, Waksman G, Martin MT.
Stem Cells. 2006 Apr;24(4):965-74.
-Comprehensive microRNA profiling reveals a unique human embryonic stem cell signature dominated by a single seed sequence.
Laurent LC, Chen J, Ulitsky I, Mueller FJ, Lu C, Shamir R, Fan JB, Loring JF.
Stem Cells. 2008 Jun;26(6):1506-16.
-Isolation and directed differentiation of neural crest stem cells derived from human embryonic stem cells.
Lee G, Kim H, Elkabetz Y, Al Shamy G, Panagiotakos G, Barberi T, Tabar V, Studer L.
Nat Biotechnol. 2007 Dec;25(12):1468-75.

-A dominant-negative form of p63 is required for epidermal proliferation in zebrafish.
Lee H, Kimelman D.
Dev Cell. 2002 May;2(5):607-16.
-The endothelin receptor-B is required for the migration of neural crest-derived melanocyte and enteric neuron precursors.
Lee HO, Levorse JM, Shin MK.
Dev Biol. 2003 Jul 1;259(1):162-75.
-The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14.
Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V.
Cell. 1993 Dec 3;75(5):843-54.
-Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells.
Lee TI, Jenner RG, Boyer LA, Guenther MG, Levine SS, Kumar RM, Chevalier B, Johnstone SE, Cole MF, Isono K, Koseki H, Fuchikami T, Abe K, Murray HL, Zucker JP, Yuan B, Bell GW, Herbolsheimer E, Hannett NM, Sun K, Odom DT, Otte AP, Volkert TL, Bartel DP, Melton DA, G ifford DK, Jaenisch R, Young RA.
Cell. 2006 Apr 21;125(2):301-13.
-miR-203 represses 'stemness' by repressing DeltaNp63.
Lena AM, Shalom-Feuerstein R, Rivetti di Val Cervo P, Aberdam D, Knight RA, Melino G, Candi E.
Cell Death Differ. 2008 Jul;15(7):1187-95.
-MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene.
Levy C, Khaled M, Fisher DE.
Trends Mol Med. 2006 Sep;12(9):406-14. Epub 2006 Aug 8.
-Identification and isolation of candidate human keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype.
Li A, Simmons PJ, Kaur P
Proc Natl Acad Sci U S A. 1998 Mar 31;95(7):3902-7.
-A mammalian microRNA cluster controls DNA methylation and telomere recombination via Rbl2-dependent regulation of DNA methyltransferases.
Benetti R, Gonzalo S, Jaco I, Muñoz P, Gonzalez S, Schoeftner S, Murchison E, Andl T, Chen T, Klatt P, Li E, Serrano M, Millar S, Hannon G, Blasco MA.
Nat Struct Mol Biol. 2008 Sep;15(9):998.
-Melanocyte biology and skin pigmentation.
Lin JY, Fisher DE.
Nature. 2007 Feb 22;445(7130):843-50.
-Bone morphogenetic protein signalling and vertebrate nervous system development.
Liu A, Niswander LA.
Nat Rev Neurosci. 2005 Dec;6(12):945-54.
-Could co-transplantation of iPS cells derived hepatocytes and MSCs cure end-stage liver disease?
Liu T, Wang Y, Tai G, Zhang S.
Cell Biol Int. 2009 Nov;33(11):1180-3.
-MicroRNAs: biogenesis and molecular functions.
Liu X, Fortin K, Mourelatos Z.
Brain Pathol. 2008 Jan;18(1):113-21.
-Characterization of bipotential epidermal progenitors derived from human sebaceous gland: contrasting roles of c-Myc and beta-catenin.
Lo Celso C, Berta MA, Braun KM, Frye M, Lyle S, Zouboulis CC, Watt FM.
Stem Cells. 2008 May;26(5):1241-52.
-Generation of induced pluripotent stem cells from human blood.
Loh YH, Agarwal S, Park IH, Urbach A, Huo H, Heffner GC, Kim K, Miller JD, Ng K, Daley GQ.
Blood. 2009 May 28;113(22):5476-9.
-Notch promotes neural lineage entry by pluripotent embryonic stem cells.

Lowell S, Benchoua A, Heavey B, Smith AG.
PLoS Biol. 2006 May;4(5):e121.
-Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts.
Lowry WE, Richter L, Yachechko R, Pyle AD, Tchieu J, Sridharan R, Clark AT, Plath K.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Feb 26;105(8):2883-8.
M
-Multiple roles of bone morphogenetic protein signaling in the regulation of cortical cell number and phenotype.
Mabie PC, Mehler MF, Kessler JA.
J Neurosci. 1999 Aug 15;19(16):7077-88.
-Relationship between mitosis and the ordered structure of the stratum corneum in mouse epidermis.
Mackenzie IC
Nature. 1970 May 16;226(5246):653-5.
-Activation of the receptor tyrosine kinase Kit is required for the proliferation of melanoblasts in the mouse embryo.
Mackenzie MA, Jordan SA, Budd PS, Jackson IJ.
Dev Biol. 1997 Dec 1;192(1):99-107.
-Retroviral transduction of murine epidermal stem cells demonstrates clonal units of epidermal structure.
Mackenzie IC
J Invest Dermatol. 1997 Sep;109(3):377-83.
-Assessment of drug induced developmental toxicity using human embryonic stem cells.
Mehta A, Konala VB, Khanna A, Majumdar AS.
Cell Biol Int. 2008 Nov;32(11):1412-24.
-The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing.
Makeyev EV, Zhang J, Carrasco MA, Maniatis T.
Mol Cell. 2007 Aug 3;27(3):435-48.
-The let-7 microRNA target gene, Mlin41/Trim71 is required for mouse embryonic survival and neural tube closure.
Maller Schulman BR, Liang X, Stahlhut C, DelConte C, Stefani G, Slack FJ.
Cell Cycle. 2008 Dec 15;7(24):3935-42.
-Msx2 is a transcriptional regulator in the BMP4-mediated programmed cell death pathway.
Marazzi G, Wang Y, Sassoon D.
Dev Biol. 1997 Jun 15;186(2):127-38.
-Activation of the Receptor Tyrosine Kinase Kit Is Required for the Proliferation of Melanoblasts in the Mouse Embryo
Marina A. F. MacKenzie, Siobha´n A. Jordan, Peter S. Budd, and Ian J. Jackson1
Dev Biol. 1997 Dec 1;192(1):99-107.
-Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells.
Martin GR.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1981 Dec;78(12):7634-8.
-TGF-beta signal transduction.
Massagué J.
Annu Rev Biochem. 1998;67:753-91.
-Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability.
McGill GG, Horstmann M, Widlund HR, Du J, Motyckova G, Nishimura EK, Lin YL, Ramaswamy S, Avery W, Ding HF, Jordan SA, Jackson IJ, Korsmeyer SJ, Golub TR, Fisher DE.
Cell. 2002 Jun 14;109(6):707-18.
-Transplantation of cardiac-committed mouse embryonic stem cells to infarcted sheep myocardium: a preclinical study.

Ménard C, Hagège AA, Agbulut O, Barro M, Morichetti MC, Brasselet C, Bel A, Messas E, Bissery A, Bruneval P, Desnos M, Pucéat M, Menasché P.
Lancet. 2005 Sep 17-23;366(9490):1005-12.
-Human embryonic stem cell-derived keratinocytes exhibit an epidermal transcription program and undergo epithelial morphogenesis in engineered tissue constructs.
Metallo CM, Azarin SM, Moses LE, Ji L, de Pablo JJ, Palecek SP.
Tissue Eng Part A. 2010 Jan;16(1):213-23.
-Retinoic acid and bone morphogenetic protein signaling synergize to efficiently direct epithelial differentiation of human embryonic stem cells.
Metallo CM, Ji L, de Pablo JJ, Palecek SP.
Stem Cells. 2008 Feb;26(2):372-80.
-Directed differentiation of human embryonic stem cells to epidermal progenitors.
Metallo CM, Ji L, de Pablo JJ, Palecek SP.
Methods Mol Biol. 2010;585:83-92.
-Bioengineering skin using mechanisms of regeneration and repair.
Metcalfe AD, Ferguson MW.
Biomaterials. 2007 Dec;28(34):5100-13.
-p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis.
Mills AA, Zheng B, Wang XJ, Vogel H, Roop DR, Bradley A.
Nature. 1999 Apr 22;398(6729):708-13.
-Genetic abnormalities and clinical classification of epidermolysis bullosa.
Mitsuhashi Y, Hashimoto I.
Arch Dermatol Res. 2003 Apr;295 Suppl 1:S29-33.
-Generation of neural crest-derived peripheral neurons and floor plate cells from mouse and primate embryonic stem cells.
Mizuseki K, Sakamoto T, Watanabe K, Muguruma K, Ikeya M, Nishiyama A, Arakawa A, Suemori H, Nakatsuji N, Kawasaki H, Murakami F, Sasai Y.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 May 13;100(10):5828-33.
-Insight into the microphthalmia gene.
.Moore KJ.
Trends Genet. 1995 Nov;11(11):442-8
-Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells.
Morin RD, O'Connor MD, Griffith M, Kuchenbauer F, Delaney A, Prabhu AL, Zhao Y, McDonald H, Zeng T, Hirst M, Eaves CJ, Marra MA.
Genome Res. 2008 Apr;18(4):610-21.
-Multiple roles of Notch signaling in the regulation of epidermal development.
Moriyama M, Durham AD, Moriyama H, Hasegawa K, Nishikawa S, Radtke F, Osawa M.
Dev Cell. 2008 Apr;14(4):594-604.
-Multipotent cell fate of neural crest-like cells derived from embryonic stem cells.
Motohashi T, Aoki H, Chiba K, Yoshimura N, Kunisada T.
Stem Cells. 2007 Feb;25(2):402-10.
-Unexpected multipotency of melanoblasts isolated from murine skin.
Motohashi T, Yamanaka K, Chiba K, Aoki H, Kunisada T.
Stem Cells. 2009 Apr;27(4):888-97.
-Neural stem cells from mouse forebrain are contained in a population distinct from the 'side population'
Mouthon MA, Fouchet P, Mathieu C, Sii-Felice K, Etienne O, Lages CS, Boussin FD.
J Neurochem. 2006 Nov;99(3):807-17.
-Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes by coculture with endoderm in serum-free medium.
Mummery CL, Ward D, Passier R.
Curr Protoc Stem Cell Biol. 2007 Jul;Chapter 1:Unit 1F.2.
-Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells.
Murchison EP, Partridge JF, Tam OH, Cheloufi S, Hannon GJ.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Aug 23;102(34):12135-40.
-Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts.
Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S.
Nat Biotechnol. 2008 Jan;26(1):101-6.
-Neural crest cell-cell adhesion controlled by sequential and subpopulation-specific expression of novel cadherins.
Nakagawa S, Takeichi M.
Development. 1995 May;121(5):1321-32.
-Xenopus Smad8 acts downstream of BMP-4 to modulate its activity during vertebrate embryonic patterning.
Nakayama T, Snyder MA, Grewal SS, Tsuneizumi K, Tabata T, Christian JL.
Development. 1998 Mar;125(5):857-67.
-Dynamic regulation of miRNA expression in ordered stages of cellular development.
Neilson JR, Zheng GX, Burge CB, Sharp PA.
Genes Dev. 2007 Mar 1;21(5):578-89.
-The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy.
Nishikawa S, Goldstein RA, Nierras CR.
Nat Rev Mol Cell Biol. 2008 Sep;9(9):725-9.
-Differential expression of p63 isoforms in normal tissues and neoplastic cells.
Nylander K, Vojtesek B, Nenutil R, Lindgren B, Roos G, Zhanxiang W, Sjöström B, Dahlqvist A, Coates PJ.
J Pathol. 2002 Dec;198(4):417-27.
-Melanosomes are specialized members of the lysosomal lineage of organelles.
Orlow SJ.
J Invest Dermatol. 1995 Jul;105(1):3-7.
-Morphogenesis and renewal of hair follicles from adult multipotent stem cells.
Oshima H, Rochat A, Kedzia C, Kobayashi K, Barrandon Y.
Cell. 2001 Jan 26;104(2):233-45.
-Concise review: Pax6 transcription factor contributes to both embryonic and adult neurogenesis as a multifunctional regulator.
Osumi N, Shinohara H, Numayama-Tsuruta K, Maekawa M.
Stem Cells. 2008 Jul;26(7):1663-72.
-Wnt-regulated temporal control of BMP exposure directs the choice between neural plate border and epidermal fate.
Patthey C, Edlund T, Gunhaga L.
Development. 2009 Jan;136(1):73-83.
-Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells.
Perrier AL, Tabar V, Barberi T, Rubio ME, Bruses J, Topf N, Harrison NL, Studer L.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Aug 24;101(34):12543-8.
-Dct::lacZ ES cells: a novel cellular model to study melanocyte determination and differentiation.
Pla P, Solov'eva O, Moore R, Alberti C, Kunisada T, Larue L.
Pigment Cell Res. 2004 Apr;17(2):142-9.
-What are melanocytes really doing all day long...?
Plonka PM, Passeron T, Brenner M, Tobin DJ, Shibahara S, Thomas A, Slominski A, Kadekaro AL, Hershkovitz D, Peters E, Nordlund JJ, Abdel-Malek Z, Takeda K, Paus R, Ortonne JP, Hearing VJ, Schallreuter KU.
Exp Dermatol. 2009 Sep;18(9):799-819.
-Neural stem cells, neurons, and glia.
Pollard SM, Benchoua A, Lowell S.
Methods Enzymol. 2006;418:151-69.
-Generation of peripheral sensory and sympathetic neurons and neural crest cells from human embryonic stem cells.

Pomp O, Brokhman I, Ben-Dor I, Reubinoff B, Goldstein RS.
Stem Cells. 2005 Aug;23(7):923-30.
-PA6-induced human embryonic stem cell-derived neurospheres: a new source of human peripheral sensory neurons and neural crest cells.
Pomp O, Brokhman I, Ziegler L, Almog M, Korngreen A, Tavian M, Goldstein RS.
Brain Res. 2008 Sep 16;1230:50-60.
-The epidermal proliferative unit: the possible role of the central basal cell.
Potten CS
Cell Tissue Kinet. 1974 Jan;7(1):77-88.
Transcription factor hierarchy in Waardenburg syndrome: regulation of MITF expression by SOX10 and PAX3.
-Potterf SB, Furumura M, Dunn KJ, Arnheiter H, Pavan WJ.
Hum Genet. 2000 Jul;107(1):1-6.
-Markers and methods for cell sorting of human embryonic stem cell-derived neural cell populations.
Pruszak J, Sonntag KC, Aung MH, Sanchez-Pernaute R, Isacson O.
Stem Cells. 2007 Sep;25(9):2257-68.
-Sensing radiosensitivity of human epidermal stem cells.
Rachidi W, Harfourche G, Lemaitre G, Amiot F, Vaigot P, Martin MT.
Radiother Oncol. 2007 Jun;83(3):267-76
-Nuclear proto-oncogenes fos and jun.
Ransone LJ, Verma IM.
Annu Rev Cell Biol. 1990;6:539-57.
-Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs.
Rao PK, Kumar RM, Farkhondeh M, Baskerville S, Lodish HF.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Jun 6;103(23):8721-6.
-The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans.
Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G.
Nature. 2000 Feb 24;403(6772):901-6.
-Neural progenitors from human embryonic stem cells.
Reubinoff BE, Itsykson P, Turetsky T, Pera MF, Reinhartz E, Itzik A, Ben-Hur T.
Nat Biotechnol. 2001 Dec;19(12):1134-40.
-Stem cells and spinal cord regeneration.
Rossi SL, Keirstead HS.
Curr Opin Biotechnol. 2009 Oct;20(5):552-62.
-Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes.
Roy NS, Cleren C, Singh SK, Yang L, Beal MF, Goldman SA.
Nat Med. 2006 Nov;12(11):1259-68.
-Melanoma: molecular pathogenesis and emerging target therapies (Review).
Russo AE, Torrisi E, Bevelacqua Y, Perrotta R, Libra M, McCubrey JA, Spandidos DA, Stivala F, Malaponte G.
Int J Oncol. 2009 Jun;34(6):1481-9.
-A feedback loop comprising lin-28 and let-7 controls pre-let-7 maturation during neural stem-cell commitment.
Rybak A, Fuchs H, Smirnova L, Brandt C, Pohl EE, Nitsch R, Wulczyn FG.
Nat Cell Biol. 2008 Aug;10(8):987-93.
-Roles of endothelin signaling in melanocyte development and melanoma.
Saldana-Caboverde A, Kos L.
Pigment Cell Melanoma Res. 2010 Feb 1.
-MicroRNAs and the skin: tiny players in the body's largest organ.
Sand M, Gambichler T, Sand D, Skrygan M, Altmeyer P, Bechara FG.
J Dermatol Sci. 2009 Mar;53(3):169-75.

-Regulation of neural induction by the Chd and Bmp-4 antagonistic patterning signals in Xenopus.
Sasai Y, Lu B, Steinbeisser H, De Robertis EM.
Nature. 1995 Oct 26;377(6551):757.
-Up-regulation of tyrosinase gene by nitric oxide in human melanocytes.
Sasaki M, Horikoshi T, Uchiwa H, Miyachi Y.
Pigment Cell Res. 2000 Aug;13(4):248-52.
-MicroRNAs: key players in the immune system, differentiation, tumorigenesis and cell death.
Oncogene. 2008 Oct 6;27(45):5959-74.
Schickel R, Boyerinas B, Park SM, Peter ME.
-Role of TAK1 and TAB1 in BMP signaling in early Xenopus development.
Shibuya H, Iwata H, Masuyama N, Gotoh Y, Yamaguchi K, Irie K, Matsumoto K, Nishida E, Ueno N.
EMBO J. 1998 Feb 16;17(4):1019-28.
-The temporal requirement for endothelin receptor-B signalling during neural crest development.
Shin MK, Levorse JM, Ingram RS, Tilghman SM.
Nature. 1999 Dec 2;402(6761):496-501.
-Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition.
Silva J, Barrandon O, Nichols J, Kawaguchi J, Theunissen TW, Smith A.
PLoS Biol. 2008 Oct 21;6(10):e253.
-MicroRNAs control de novo DNA methylation through regulation of transcriptional repressors in mouse embryonic stem cells.
Sinkkonen L, Hugenschmidt T, Berninger P, Gaidatzis D, Mohn F, Artus-Revel CG, Zavolan M, Svoboda P, Filipowicz W.
Nat Struct Mol Biol. 2008 Mar;15(3):259-67.
-Regulation of miRNA expression during neural cell specification.
Smirnova L, Gräfe A, Seiler A, Schumacher S, Nitsch R, Wulczyn FG.
Eur J Neurosci. 2005 Mar;21(6):1469-77.
-Expression cloning of noggin, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in Xenopus embryos.
Smith WC, Harland RM.
Cell. 1992 Sep 4;70(5):829-40.
-Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors.
Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, Gao Q, Bell GW, Cook EG, Hargus G, Blak A, Cooper O, Mitalipova M, Isacson O, Jaenisch R.
Cell. 2009 Mar 6;136(5):964-77.
-Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette.
Sommer CA, Stadtfeld M, Murphy GJ, Hochedlinger K, Kotton DN, Mostoslavsky G.
Stem Cells. 2009 Mar;27(3):543-9.
-The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes.
Song JJ, Liu J, Tolia NH, Schneiderman J, Smith SK, Martienssen RA, Hannon GJ, Joshua-Tor L.
Nat Struct Biol. 2003 Dec;10(12):1026-32.
-Integrin alpha 6/beta 4 complex is located in hemidesmosomes, suggesting a major role in epidermal cell-basement membrane adhesion.
Sonnenberg A, Calafat J, Janssen H, Daams H, van der Raaij-Helmer LM, Falcioni R, Kennel SJ, Aplin JD, Baker J, Loizidou M, et al.
J Cell Biol. 1991 May;113(4):907-17.
-The miR200 family of microRNAs regulates WAVE3-dependent cancer cell invasion.
Sossey-Alaoui K, Bialkowska K, Plow EF.
J Biol Chem. 2009 Nov 27;284(48):33019-29.

-Mutations of the KIT (mast/stem cell growth factor receptor) proto-oncogene account for a continuous range of phenotypes in human piebaldism.
Spritz RA, Holmes SA, Ramesar R, Greenberg J, Curtis D, Beighton P.
Am J Hum Genet. 1992 Nov;51(5):1058-65.
-Characterization of microRNAs Involved in Embryonic Stem Cell States.
Stadler BM, Ivanovska I, Mehta K, Song S, Nelson A, Tan Y, Mathieu J, Darby GC, Blau CA, Ware C, Peters G, Miller DG, Shen L, Cleary M, Ruohola-Baker H.
Stem Cells Dev. 2010 Feb 3. [Epub ahead of print]
-Mechanisms of self-renewal in human embryonic stem cells.
Stewart R, Stojkovic M, Lako M.
Eur J Cancer. 2006 Jun;42(9):1257-72.
-Preimplantation genetic diagnosis as a source of human embryonic stem cells for disease research and drug discovery.
Stephenson EL, Mason C, Braude PR.
BJOG. 2009 Jan;116(2):158-65.
-An autogeneic feeder cell system that efficiently supports growth of undifferentiated human embryonic stem cells.
Stojkovic P, Lako M, Stewart R, Przyborski S, Armstrong L, Evans J, Murdoch A, Strachan T, Stojkovic M.
Stem Cells. 2005 Mar;23(3):306-14.
-Nonrestrictive developmental regulation of microRNA gene expression.
Strauss WM, Chen C, Lee CT, Ridzon D.
Mamm Genome. 2006 Aug;17(8):833-40.
-Hazard assessment of methylmercury toxicity to neuronal induction in embryogenesis using human embryonic stem cells.
Stummann TC, Hareng L, Bremer S.
Toxicology. 2009 Mar 29;257(3):117-26.
-Isolation of an adult mouse lung mesenchymal progenitor cell population.
Summer R, Fitzsimmons K, Dwyer D, Murphy J, Fine A.
Am J Respir Cell Mol Biol. 2007 Aug;37(2):152-9.
-Neural commitment of embryonic stem cells: molecules, pathways and potential for cell therapy.
Suter DM, Krause KH.
J Pathol. 2008 Aug;215(4):355-68.
-Xenopus msx1 mediates epidermal induction and neural inhibition by BMP4.
Suzuki A, Ueno N, Hemmati-Brivanlou A.
Development. 1997 Aug;124(16):3037-44.
-Binding of melanotropic hormones to the melanocortin receptor MC1R on human melanocytes stimulates proliferation and melanogenesis.
Suzuki I, Cone RD, Im S, Nordlund J, Abdel-Malek ZA.
Endocrinology. 1996 May;137(5):1627-33.
-Migration and differentiation of neural precursors derived from human embryonic stem cells in the rat brain.
Tabar V, Panagiotakos G, Greenberg ED, Chan BK, Sadelain M, Gutin PH, Studer L.
Nat Biotechnol. 2005 May;23(5):601-6.
-Ectopic expression of MITF, a gene for Waardenburg syndrome type 2, converts fibroblasts to cells with melanocyte characteristics.
Tachibana M, Takeda K, Nobukuni Y, Urabe K, Long JE, Meyers KA, Aaronson SA, Miki T.
Nat Genet. 1996 Sep;14(1):50-4.
-Spatial relationship between Merkel cells and Langerhans cells in human hair follicles.
Taira K, Narisawa Y, Nakafusa J, Misago N, Tanaka T.
J Dermatol Sci. 2002 Dec;30(3):195-204.
-Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.
Takahashi K, Yamanaka S.

Cell. 2006 Aug 25;126(4):663-76.
-Enrichment for murine keratinocyte stem cells based on cell surface phenotype.
Tani H, Morris RJ, Kaur P
Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Sep 26;97(20):10960-5.
-Side population keratinocytes resembling bone marrow side population stem cells are distinct from labelretaining keratinocyte stem cells.
Terunuma A, Jackson KL, Kapoor V, Telford WG, Vogel JC
J Invest Dermatol. 2003 Nov;121(5):1095-103.
-Stem cell activity of human side population and alpha6 integrin-bright keratinocytes defined by a quantitative in vivo assay.
Terunuma A, Kapoor V, Yee C, Telford WG, Udey MC, Vogel JC.
Stem Cells. 2007 Mar;25(3):664-9.
-The making of a melanocyte: the specification of melanoblasts from the neural crest.
Thomas AJ, Erickson CA.
Pigment Cell Melanoma Res. 2008 Dec;21(6):598-610.
-Automated, serum-free production of CTX0E03: a therapeutic clinical grade human neural stem cell line.
Thomas RJ, Hope AD, Hourd P, Baradez M, Miljan EA, Sinden JD, Williams DJ.
Biotechnol Lett. 2009 Aug;31(8):1167-72.
-Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts.
Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM.
Science. 1998 Nov 6;282(5391):1145-7.
-Direct neural fate specification from embryonic stem cells: a primitive mammalian neural stem cell stage acquired through a default mechanism.
Tropepe V, Hitoshi S, Sirard C, Mak TW, Rossant J, van der Kooy D.
Neuron. 2001 Apr;30(1):65-78.
-Commitment of embryonic stem cells to an epidermal cell fate and differentiation in vitro.
Troy TC, Turksen K.
Dev Dyn. 2005 Feb;232(2):293-300.
-Defining the epithelial stem cell niche in skin.
Tumbar T, Guasch G, Greco V, Blanpain C, Lowry WE, Rendl M, Fuchs E.
Science. 2004 Jan 16;303(5656):359-63
-MicroRNA expression patterns and function in endodermal differentiation of human embryonic stem cells.
Tzur G, Levy A, Meiri E, Barad O, Spector Y, Bentwich Z, Mizrahi L, Katzenellenbogen M, Ben-Shushan E, Reubinoff BE, Galun E.
PLoS One. 2008;3(11):e3726.
-Molecular complexity of the cutaneous basement membrane zone.
Uitto J, Pulkkinen L.
Mol Biol Rep. 1996;23(1):35-46.
-Melanocytes in development and cancer.
Uong A, Zon LI.
J Cell Physiol. 2010 Jan;222(1):38-41.
-Modeling for Lesch-Nyhan disease by gene targeting in human embryonic stem cells.
Urbach A, Schuldiner M, Benvenisty N.
Stem Cells. 2004;22(4):635-41.
-Microphthalmia-associated transcription factor gene amplification in metastatic melanoma is a prognostic marker for patient survival, but not a predictive marker for chemosensitivity and chemotherapy response.
Ugurel S, Houben R, Schrama D, Voigt H, Zapatka M, Schadendorf D, Bröcker EB, Becker JC.
Clin Cancer Res. 2007 Nov 1;13(21):6344-50.
-Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells.

Utikal J, Maherali N, Kulalert W, Hochedlinger K.
J Cell Sci. 2009 Oct 1;122(Pt 19):3502-10.
-Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells.
Vallier L, Alexander M, Pedersen RA.
J Cell Sci. 2005 Oct 1;118(Pt 19):4495-509.
-Activin/Nodal signalling maintains pluripotency by controlling Nanog expression.
Vallier L, Mendjan S, Brown S, Chng Z, Teo A, Smithers LE, Trotter MW, Cho CH, Martinez A, Rugg-Gunn P, Brons G, Pedersen RA.
Development. 2009 Apr;136(8):1339-49.
-Signaling pathways controlling pluripotency and early cell fate decisions of human induced pluripotent stem cells.
Vallier L, Touboul T, Brown S, Cho C, Bilican B, Alexander M, Cedervall J, Chandran S, Ahrlund-Richter L, Weber A, Pedersen RA.
Stem Cells. 2009 Nov;27(11):2655-66.
-Inhibition of flower pigmentation by antisense CHS genes: promoter and minimal sequence requirements for the antisense effect.
van der Krol AR, Mur LA, de Lange P, Mol JN, Stuitje AR.
Plant Mol Biol. 1990 Apr;14(4):457-66.
-Derivation of insulin-producing cells from human embryonic stem cells.
Van Hoof D, D'Amour KA, German MS.
Stem Cell Res. 2009 Sep-Nov;3(2-3):73-87.
-The microRNA miR-124 antagonizes the anti-neural REST/SCP1 pathway during embryonic CNS development.
Visvanathan J, Lee S, Lee B, Lee JW, Lee SK.
Genes Dev. 2007 Apr 1;21(7):744-9.
-DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal.
Wang Y, Medvid R, Melton C, Jaenisch R, Blelloch R.
Nat Genet. 2007 Mar;39(3):380-5.
-Epidermal stem cell diversity and quiescence.
Watt FM, Jensen KB.
EMBO Mol Med. 2009 Aug;1(5):260-7.
-Differential expression of the fos and jun family members c-fos, fosB, Fra-1, Fra-2, c-jun, junB and junD during human epidermal keratinocyte differentiation.
Welter JF, Eckert RL.
Oncogene. 1995 Dec 21;11(12):2681-7.
-c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts.
Wernig M, Meissner A, Cassady JP, Jaenisch R.
Cell Stem Cell. 2008 Jan 10;2(1):10-2.
-The Delta Np63 alpha phosphoprotein binds the p21 and 14-3-3 sigma promoters in vivo and has transcriptional repressor activity that is reduced by Hay-Wells syndrome-derived mutations.
Westfall MD, Mays DJ, Sniezek JC, Pietenpol JA.
Mol Cell Biol. 2003 Apr;23(7):2264-76.
-Induction of epidermis and inhibition of neural fate by Bmp-4.
Wilson PA, Hemmati-Brivanlou A.
Nature. 1995 Jul 27;376(6538):331-3.
-Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation.
Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S.
Nat Cell Biol. 2009 Mar;11(3):228-34.
-piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells.
Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hämäläinen R, Cowling R, Wang W, Liu P, Gertsenstein M, Kaji K, Sung HK, Nagy A.
Nature. 2009 Apr 9;458(7239):766-70.

-Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells.
Xu C, Inokuma MS, Denham J, Golds K, Kundu P, Gold JD, Carpenter MK.
Nat Biotechnol. 2001 Oct;19(10):971-4.
-Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium.
Xu C, Rosler E, Jiang J, Lebkowski JS, Gold JD, O'Sullivan C, Delavan-Boorsma K, Mok M, Bronstein A, Carpenter MK.
Stem Cells. 2005 Mar;23(3):315-23.
-NANOG is a direct target of TGFbeta/activin-mediated SMAD signaling in human ESCs.
Xu RH, Sampsell-Barron TL, Gu F, Root S, Peck RM, Pan G, Yu J, Antosiewicz-Bourget J, Tian S, Stewart R, Thomson JA.
Cell Stem Cell. 2008 Aug 7;3(2):196-206
-Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction.
Yamaguchi K, Shirakabe K, Shibuya H, Irie K, Oishi I, Ueno N, Taniguchi T, Nishida E, Matsumoto K.
Science. 1995 Dec 22;270(5244):2008-11.
-Derivation of melanocytes from embryonic stem cells in culture.
Yamane T, Hayashi S, Mizoguchi M, Yamazaki H, Kunisada T.
Dev Dyn. 1999 Dec;216(4-5):450-8.
-Inhibition of BMP2-induced, TAK1 kinase-mediated neurite outgrowth by Smad6 and Smad7.
Yanagisawa M, Nakashima K, Takeda K, Ochiai W, Takizawa T, Ueno M, Takizawa M, Shibuya H, Taga T.
Genes Cells. 2001 Dec;6(12):1091-9.
-p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities.
Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dötsch V, Andrews NC, Caput D, McKeon F.
Mol Cell. 1998 Sep;2(3):305-16.
-p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development.
Yang A, Schweitzer R, Sun D, Kaghad M, Walker N, Bronson RT, Tabin C, Sharpe A, Caput D, Crum C, McKeon F.
Nature. 1999 Apr 22;398(6729):714-8.
-Epitope mapping of the melanosomal matrix protein gp100 (PMEL17): rapid processing in the endoplasmic reticulum and glycosylation in the early Golgi compartment.
Yasumoto K, Watabe H, Valencia JC, Kushimoto T, Kobayashi T, Appella E, Hearing VJ.
J Biol Chem. 2004 Jul 2;279(27):28330-8.
-Functional analysis of microphthalmia-associated transcription factor in pigment cell-specific transcription of the human tyrosinase family genes.
Yasumoto K, Yokoyama K, Takahashi K, Tomita Y, Shibahara S.
J Biol Chem. 1997 Jan 3;272(1):503-9.
-MicroRNA-mediated control in the skin.
Yi R, Fuchs E.
Cell Death Differ. 2010 Feb;17(2):229-35.
-Morphogenesis in skin is governed by discrete sets of differentially expressed microRNAs.
Yi R, O'Carroll D, Pasolli HA, Zhang Z, Dietrich FS, Tarakhovsky A, Fuchs E.
Nat Genet. 2006 Mar;38(3):356-62.
-DGCR8-dependent microRNA biogenesis is essential for skin development.
Yi R, Pasolli HA, Landthaler M, Hafner M, Ojo T, Sheridan R, Sander C, O'Carroll D, Stoffel M, Tuschl T, Fuchs E.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Jan 13;106(2):498-502.
-A skin microRNA promotes differentiation by repressing 'stemness'.
Yi R, Poy MN, Stoffel M, Fuchs E.

Nature. 2008 Mar 13;452(7184):225-9.
-Defined conditions for neural commitment and differentiation.
Ying QL, Smith AG.
Methods Enzymol. 2003;365:327-41.
-Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture.
Ying QL, Stavridis M, Griffiths D, Li M, Smith A.
Nat Biotechnol. 2003 Feb;21(2):183-6.
-MicroRNA-mediated switching of chromatin-remodelling complexes in neural development.
Yoo AS, Staahl BT, Chen L, Crabtree GR.
Nature. 2009 Jul 30;460(7255):642-6.
-Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells.
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.
Science. 2007 Dec 21;318(5858):1917-20.
-Human embryonic stem cells as a model system for studying the effects of smoke exposure on the embryo.
Zdravkovic T, Genbacev O, LaRocque N, McMaster M, Fisher S.
Reprod Toxicol. 2008 Oct;26(2):86-93.
-Jun signalling in the epidermis: From developmental defects to psoriasis and skin tumors.
Zenz R, Wagner EF.
Int J Biochem Cell Biol. 2006;38(7):1043-9.
-The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4.
Zimmerman LB, De Jesús-Escobar JM, Harland RM.
Cell. 1996 Aug 23;86(4):599-606.
-Laminin 5 deposition promotes keratinocyte motility.
Zhang K, Kramer RH.
Exp Cell Res. 1996 Sep 15;227(2):309-22.
-In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells.
Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, Brüstle O, Thomson JA.
Nat Biotechnol. 2001 Dec;19(12):1129-33.
-Activation of beta-catenin signaling programs embryonic epidermis to hair follicle fate.
Zhang Y, Andl T, Yang SH, Teta M, Liu F, Seykora JT, Tobias JW, Piccolo S, Schmidt-Ullrich R, Nagy A, Taketo MM, Dlugosz AA, Millar SE.
Development. 2008 Jun;135(12):2161-72.
-Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis.
Zhao Y, Samal E, Srivastava D.
Nature. 2005 Jul 14;436(7048):214-20.
-Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins.
Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, Trauger S, Bien G, Yao S, Zhu Y, Siuzdak G, Schöler HR, Duan L, Ding S.
Cell Stem Cell. 2009 May 8;4(5):381-4.
-An improved protocol that induces human embryonic stem cells to differentiate into neural cells in vitro.
Zhou JM, Chu JX, Chen XJ.
Cell Biol Int. 2008 Jan;32(1):80-5.
-Derivation of cranial neural crest-like cells from human embryonic stem cells.
Zhou Y, Snead ML.
Biochem Biophys Res Commun. 2008 Nov 21;376(3):542-7.
-Progressive differentiation of human sebocytes in vitro is characterized by increasing cell size and altering antigen expression and is regulated by culture duration and retinoids.
Zouboulis CC, Krieter A, Gollnick H, Mischke D, Orfanos CE.
Exp Dermatol. 1994 Aug;3(4):151-60.

-Members of the miR-290 cluster modulate in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells.
Zovoilis A, Smorag L, Pantazi A, Engel W.
Differentiation. 2009 Sep-Oct;78(2-3):69-78.

ANNEXES

I. Annexe 1: Brevet déposé auprès de l'organisme « U.S. Patent and Trademark Office », intitulé: « Methods for Preparing Human Melanocytes from Human Pluripotent Stem Cells ».

Electronic Acknowledgement Receipt

EFS ID:	7066088
Application Number:	61307056
International Application Number:	
Confirmation Number:	8881
Title of Invention:	Methods for Preparing Human Melanocytes from Human Pluripotent Stem Cells
First Named Inventor/Applicant Name:	Xavier Nissan
Customer Number:	23446
Filer:	Nabeela Rasheed McMillian/Angela Pretnik
Filer Authorized By:	Nabeela Rasheed McMillian
Attorney Docket Number:	02970-22928US01
Receipt Date:	23-FEB-2010
Filing Date:	
Time Stamp:	12:59:20
Application Type:	Provisional

Payment information:

Submitted with Payment	yes
Payment Type	Deposit Account
Payment was successfully received in RAM	$220
RAM confirmation Number	12131
Deposit Account	130017
Authorized User	

The Director of the USPTO is hereby authorized to charge indicated fees and credit any overpayment as follows:

Charge any Additional Fees required under 37 C.F.R. Section 1.16 (National application filing, search, and examination fees)

Charge any Additional Fees required under 37 C.F.R. Section 1.17 (Patent application and reexamination processing fees)

Charge any Additional Fees required under 37 C.F.R. Section 1.19 (Document supply fees)

Charge any Additional Fees required under 37 C.F.R. Section 1.20 (Post Issuance fees)

Charge any Additional Fees required under 37 C.F.R. Section 1.21 (Miscellaneous fees and charges)

File Listing:

Document Number	Document Description	File Name	File Size(Bytes)/ Message Digest	Multi Part /.zip	Pages (if appl.)
1	Provisional Cover Sheet (SB16)	22928US01_fill_ProCover.pdf	999548 855e13777aa9432b96f1efff17e16441af26d509	no	3
Warnings:					
Information:					
2	Application Data Sheet	22928US01_fill_ADS.pdf	964290 cee136ea3f26b4ef69af35ba0417e74d8d5dd7d8	no	5
Warnings:					
Information:					
3		22928US01_Spec.pdf	236342 d9772d9464a2021b5aadb3462f3e6a9067a5f3ca	yes	29

Multipart Description/PDF files in .zip description

Document Description	Start	End
Specification	1	26
Claims	27	28
Abstract	29	29

Warnings:					
Information:					
4	Fee Worksheet (PTO-875)	fee-info.pdf	29444 c5ebc6dcfec10a99a5e2b2071bd2342bd725c832	no	2
Warnings:					
Information:					
			Total Files Size (in bytes):	2229624	

This Acknowledgement Receipt evidences receipt on the noted date by the USPTO of the indicated documents, characterized by the applicant, and including page counts, where applicable. It serves as evidence of receipt similar to a Post Card, as described in MPEP 503.

New Applications Under 35 U.S.C. 111

If a new application is being filed and the application includes the necessary components for a filing date (see 37 CFR 1.53(b)-(d) and MPEP 506), a Filing Receipt (37 CFR 1.54) will be issued in due course and the date shown on this Acknowledgement Receipt will establish the filing date of the application.

National Stage of an International Application under 35 U.S.C. 371

If a timely submission to enter the national stage of an international application is compliant with the conditions of 35 U.S.C. 371 and other applicable requirements a Form PCT/DO/EO/903 indicating acceptance of the application as a national stage submission under 35 U.S.C. 371 will be issued in addition to the Filing Receipt, in due course.

New International Application Filed with the USPTO as a Receiving Office

If a new international application is being filed and the international application includes the necessary components for an international filing date (see PCT Article 11 and MPEP 1810), a Notification of the International Application Number and of the International Filing Date (Form PCT/RO/105) will be issued in due course, subject to prescriptions concerning national security, and the date shown on this Acknowledgement Receipt will establish the international filing date of the application.

Electronic Patent Application Fee Transmittal

Application Number:	
Filing Date:	
Title of Invention:	Methods for Preparing Human Melanocytes from Human Pluripotent Stem Cells
First Named Inventor/Applicant Name:	Xavier Nissan
Filer:	Nabeela Rasheed McMillian/Angela Pretnik
Attorney Docket Number:	02970-22928US01

Filed as Large Entity

Provisional Filing Fees

Description	Fee Code	Quantity	Amount	Sub-Total in USD($)
Basic Filing:				
Provisional application filing	1005	1	220	220
Pages:				
Claims:				
Miscellaneous-Filing:				
Petition:				
Patent-Appeals-and-Interference:				
Post-Allowance-and-Post-Issuance:				
Extension-of-Time:				

Description	Fee Code	Quantity	Amount	Sub-Total in USD($)
Miscellaneous:				
			Total in USD ($)	**220**

Doc Code: **TR.PROV**
Document Description: Provisional Cover Sheet (SB16)

PTO/SB/16 (04-07)
Approved for use through 06/30/2010 OMB 0651-0032
U.S. Patent and Trademark Office: U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE
Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it displays a valid OMB control number

Provisional Application for Patent Cover Sheet

This is a request for filing a PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT under 37 CFR 1.53(c)

Inventor(s)

Inventor 1 — Remove

Given Name	Middle Name	Family Name	City	State	Country
Xavier		Nissan	Evry cedex		FR

Inventor 2 — Remove

Given Name	Middle Name	Family Name	City	State	Country
Christine		Baldeschi	Evry cedex		FR

Inventor 3 — Remove

Given Name	Middle Name	Family Name	City	State	Country
Gilles		Lemaitre	Evry cedex		FR

Inventor 4 — Remove

Given Name	Middle Name	Family Name	City	State	Country
Marc		Peschanski	Evry cedex		FR

All Inventors Must Be Listed – Additional Inventor Information blocks may be generated within this form by selecting the **Add** button. — Add

Title of Invention	Methods for Preparing Human Melanocytes from Human Pluripotent Stem Cells
Attorney Docket Number (if applicable)	02970-22928US01

Correspondence Address

Direct all correspondence to (select one):

◉ The address corresponding to Customer Number	◯ Firm or Individual Name
Customer Number	23446

The invention was made by an agency of the United States Government or under a contract with an agency of the United States Government.

◉ No.

◯ Yes, the name of the U.S. Government agency and the Government contract number are:

Doc Code: **TR.PROV**
Document Description: Provisional Cover Sheet (SB16)

PTO/SB/16 (04-07)
Approved for use through 06/30/2010 OMB 0651-0032
U.S. Patent and Trademark Office: U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE
Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it displays a valid OMB control number

Entity Status

Applicant claims small entity status under 37 CFR 1.27

◯ Yes, applicant qualifies for small entity status under 37 CFR 1.27

◉ No

Warning

Petitioner/applicant is cautioned to avoid submitting personal information in documents filed in a patent application that may contribute to identity theft. Personal information such as social security numbers, bank account numbers, or credit card numbers (other than a check or credit card authorization form PTO-2038 submitted for payment purposes) is never required by the USPTO to support a petition or an application. If this type of personal information is included in documents submitted to the USPTO, petitioners/applicants should consider redacting such personal information from the documents before submitting them to USPTO. Petitioner/applicant is advised that the record of a patent application is available to the public after publication of the application (unless a non-publication request in compliance with 37 CFR 1.213(a) is made in the application) or issuance of a patent. Furthermore, the record from an abandoned application may also be available to the public if the application is referenced in a published application or an issued patent (see 37 CFR1.14). Checks and credit card authorization forms PTO-2038 submitted for payment purposes are not retained in the application file and therefore are not publicly available.

Signature

Please see 37 CFR 1.4(d) for the form of the signature.

Signature	/Nabeela R. McMillian, #43,363/			Date (YYYY-MM-DD)	2010-02-23
First Name	Nabeela	Last Name	McMillian	Registration Number (If appropriate)	43363

This collection of information is required by 37 CFR 1.51. The information is required to obtain or retain a benefit by the public which is to file (and by the USPTO to process) an application. Confidentiality is governed by 35 U.S.C. 122 and 37 CFR 1.11 and 1.14. This collection is estimated to take 8 hours to complete, including gathering, preparing, and submitting the completed application form to the USPTO. Time will vary depending upon the individual case. Any comments on the amount of time you require to complete this form and/or suggestions for reducing this burden, should be sent to the Chief Information Officer, U.S. Patent and Trademark Office, U.S. Department of Commerce, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450. DO NOT SEND FEES OR COMPLETED FORMS TO THIS ADDRESS. **This form can only be used when in conjunction with EFS-Web. If this form is mailed to the USPTO, it may cause delays in handling the provisional application.**

Privacy Act Statement

The Privacy Act of 1974 (P.L. 93-579) requires that you be given certain information in connection with your submission of the attached form related to a patent application or paten. Accordingly, pursuant to the requirements of the Act, please be advised that : (1) the general authority for the collection of this information is 35 U.S.C. 2(b)(2); (2) furnishing of the information solicited is voluntary; and (3) the principal purpose for which the information is used by the U.S. Patent and Trademark Office is to process and/or examine your submission related to a patent application or patent. If you do not furnish the requested information, the U.S. Patent and Trademark Office may not be able to process and/or examine your submission, which may result in termination of proceedings or abandonment of the application or expiration of the patent.

The information provided by you in this form will be subject to the following routine uses:

1. The information on this form will be treated confidentially to the extent allowed under the Freedom of Information Act (5 U.S.C. 552) and the Privacy Act (5 U.S.C 552a). Records from this system of records may be disclosed to the Department of Justice to determine whether disclosure of these records is required by the Freedom of Information Act.
2. A record from this system of records may be disclosed, as a routine use, in the course of presenting evidence to a court, magistrate, or administrative tribunal, including disclosures to opposing counsel in the course of settlement negotiations.
3. A record in this system of records may be disclosed, as a routine use, to a Member of Congress submitting a request involving an individual, to whom the record pertains, when the individual has requested assistance from the Member with respect to the subject matter of the record.
4. A record in this system of records may be disclosed, as a routine use, to a contractor of the Agency having need for the information in order to perform a contract. Recipients of information shall be required to comply with the requirements of the Privacy Act of 1974, as amended, pursuant to 5 U.S.C. 552a(m).
5. A record related to an International Application filed under the Patent Cooperation Treaty in this system of records may be disclosed, as a routine use, to the International Bureau of the World Intellectual Property Organization, pursuant to the Patent Cooperation Treaty.
6. A record in this system of records may be disclosed, as a routine use, t o a n other federal agency for purposes of National Security review (35 U.S.C. 181) and for review pursuant to the Atomic Energy Act (42 U.S.C. 218(c)).
7. A record from this system of records may be disclosed, as a routine use, to the Administrator, General Services, or his/her designee, during an inspection of records conducted by GSA as part of that agency's responsibility to recommend improvements in records management practices and programs, under authority of 44 U.S.C. 2904 and 2906. Such disclosure shall be made in accordance with the GSA regulations governing inspection of records for this purpose, and any other relevant (i.e., GSA or Commerce) directive. Such disclosure shall not be used to make determinations about individuals.
8. A record from this system of records may be disclosed, as a routine use, to the public after either publication of the application pursuant to 35 U.S.C. 122(b) or issuance of a patent pursuant to 35 U.S.C. 151. Further, a record may be disclosed, subject to the limitations of 37 CFR 1.14, as a routine use, to the public if the record was filed in an application which became abandoned or in which the proceedings were terminated and which application is referenced by either a published application, an application open to public inspection or an issued patent.
9. A record from this system of records may be disclosed, as a routine use, to a Federal, State, or local law enforcement agency, if the USPTO becomes aware of a violation or potential violation of law or regulation.

PTO/SB/14 (07-07)
Approved for use through 06/30/2010. OMB 0651-0032
U.S. Patent and Trademark Office; U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE
Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it contains a valid OMB control number.

Application Data Sheet 37 CFR 1.76	Attorney Docket Number	02970-22928US01
	Application Number	
Title of Invention	Methods for Preparing Human Melanocytes from Human Pluripotent Stem Cells	

The application data sheet is part of the provisional or nonprovisional application for which it is being submitted. The following form contains the bibliographic data arranged in a format specified by the United States Patent and Trademark Office as outlined in 37 CFR 1.76.
This document may be completed electronically and submitted to the Office in electronic format using the Electronic Filing System (EFS) or the document may be printed and included in a paper filed application.

Secrecy Order 37 CFR 5.2

☐ Portions or all of the application associated with this Application Data Sheet may fall under a Secrecy Order pursuant to 37 CFR 5.2 (Paper filers only. Applications that fall under Secrecy Order may not be filed electronically.)

Applicant Information:

Applicant 1

Applicant Authority ◉ Inventor ○ Legal Representative under 35 U.S.C. 117 ○ Party of Interest under 35 U.S.C. 118

Prefix	Given Name	Middle Name	Family Name	Suffix
	Xavier		Nissan	

Residence Information (Select One) ○ US Residency ◉ Non US Residency ○ Active US Military Service

City	Evry	Country Of Residence	FR
Citizenship under 37 CFR 1.41(b)	FR		

Mailing Address of Applicant:

Address 1	I-STEM, INSERM/UEVE UMR 86		
Address 2	Genopole Campus 1, 5 rue Henri Desbrueres		
City	Evry cedex	State/Province	
Postal Code	91030	Country	FR

Applicant 2

Applicant Authority ◉ Inventor ○ Legal Representative under 35 U.S.C. 117 ○ Party of Interest under 35 U.S.C. 118

Prefix	Given Name	Middle Name	Family Name	Suffix
	Christine		Baldeschi	

Residence Information (Select One) ○ US Residency ◉ Non US Residency ○ Active US Military Service

City	Evry cedex	Country Of Residence	FR
Citizenship under 37 CFR 1.41(b)	FR		

Mailing Address of Applicant:

Address 1	I-STEM, INSERM/UEVE UMR 86		
Address 2	Genopole Campus 1, 5 rue Henri Desbrueres		
City	Evry cedex	State/Province	
Postal Code	91030	Country	FR

Applicant 3

Applicant Authority ◉ Inventor ○ Legal Representative under 35 U.S.C. 117 ○ Party of Interest under 35 U.S.C. 118

Prefix	Given Name	Middle Name	Family Name	Suffix
	Gilles		Lemaitre	

Residence Information (Select One) ○ US Residency ◉ Non US Residency ○ Active US Military Service

City	Evry cedex	Country Of Residence	FR

PTO/SB/14 (07-07)
Approved for use through 06/30/2010. OMB 0651-0032
U.S. Patent and Trademark Office; U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE
Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it contains a valid OMB control number.

Application Data Sheet 37 CFR 1.76	Attorney Docket Number	02970-22928US01
	Application Number	
Title of Invention	Methods for Preparing Human Melanocytes from Human Pluripotent Stem Cells	

Citizenship under 37 CFR 1.41(b)	FR			
Mailing Address of Applicant:				
Address 1	I-STEM, INSERM/UEVE UMR 86			
Address 2	Genopole Campus 1, 5 rue Henri Desbrueres			
City	Evry cedex	**State/Province**		
Postal Code	91030	**Country**	FR	

Applicant 4

Applicant Authority (●) Inventor ( ) Legal Representative under 35 U.S.C. 117 ( ) Party of Interest under 35 U.S.C. 118

Prefix	**Given Name**	**Middle Name**	**Family Name**	**Suffix**
	Marc		Peschanski	

Residence Information (Select One) ( ) US Residency (●) Non US Residency ( ) Active US Military Service

City	Evry cedex	**Country Of Residence**	FR
Citizenship under 37 CFR 1.41(b)	FR		
Mailing Address of Applicant:			
Address 1	I-STEM, INSERM/UEVE UMR 86		
Address 2	Genopole Campus 1, 5 rue Henri Desbrueres		
City	Evry cedex	**State/Province**	
Postal Code	91030	**Country**	FR

All Inventors Must Be Listed - Additional Inventor Information blocks may be generated within this form by selecting the **Add** button. Add

Correspondence Information:

Enter either Customer Number or complete the Correspondence Information section below.
For further information see 37 CFR 1.33(a).

☐ **An Address is being provided for the correspondence Information of this application.**

Customer Number	23446		
Email Address	mhmpto@mcandrews-ip.com	Add Email	Remove Email

Application Information:

Title of the Invention	Methods for Preparing Human Melanocytes from Human Pluripotent Stem Cells		
Attorney Docket Number	02970-22928US01	**Small Entity Status Claimed**	☐
Application Type	Provisional		
Subject Matter	Utility		
Suggested Class (if any)		**Sub Class (if any)**	
Suggested Technology Center (if any)			
Total Number of Drawing Sheets (if any)		**Suggested Figure for Publication (if any)**	

PTO/SB/14 (07-07)
Approved for use through 06/30/2010. OMB 0651-0032
U.S. Patent and Trademark Office; U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE
Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it contains a valid OMB control number.

Application Data Sheet 37 CFR 1.76	Attorney Docket Number	02970-22928US01
	Application Number	
Title of Invention	Methods for Preparing Human Melanocytes from Human Pluripotent Stem Cells	

Publication Information:

☐	Request Early Publication (Fee required at time of Request 37 CFR 1.219)
☐	**Request Not to Publish.** I hereby request that the attached application not be published under 35 U.S. C. 122(b) and certify that the invention disclosed in the attached application **has not and will not** be the subject of an application filed in another country, or under a multilateral international agreement, that requires publication at eighteen months after filing.

Representative Information:

Representative information should be provided for all practitioners having a power of attorney in the application. Providing this information in the Application Data Sheet does not constitute a power of attorney in the application (see 37 CFR 1.32).
Enter either Customer Number or complete the Representative Name section below. If both sections are completed the Customer Number will be used for the Representative Information during processing.

Please Select One:	◉ Customer Number	○ US Patent Practitioner	○ Limited Recognition (37 CFR 11.9)
Customer Number	23446		

Domestic Benefit/National Stage Information:

This section allows for the applicant to either claim benefit under 35 U.S.C. 119(e), 120, 121, or 365(c) or indicate National Stage entry from a PCT application. Providing this information in the application data sheet constitutes the specific reference required by 35 U.S.C. 119(e) or 120, and 37 CFR 1.78(a)(2) or CFR 1.78(a)(4), and need not otherwise be made part of the specification.

Prior Application Status			Remove
Application Number	Continuity Type	Prior Application Number	Filing Date (YYYY-MM-DD)

Additional Domestic Benefit/National Stage Data may be generated within this form by selecting the **Add** button.

Foreign Priority Information:

This section allows for the applicant to claim benefit of foreign priority and to identify any prior foreign application for which priority is not claimed. Providing this information in the application data sheet constitutes the claim for priority as required by 35 U.S.C. 119(b) and 37 CFR 1.55(a).

			Remove
Application Number	Country	Parent Filing Date (YYYY-MM-DD)	Priority Claimed
			◉ Yes ○ No

Additional Foreign Priority Data may be generated within this form by selecting the **Add** button.

Assignee Information:

Providing this information in the application data sheet does not substitute for compliance with any requirement of part 3 of Title 37 of the CFR to have an assignment recorded in the Office.

Assignee 1

PTO/SB/14 (07-07)
Approved for use through 06/30/2010. OMB 0651-0032
U.S. Patent and Trademark Office; U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE
Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it contains a valid OMB control number.

Application Data Sheet 37 CFR 1.76	Attorney Docket Number	02970-22928US01
	Application Number	
Title of Invention	Methods for Preparing Human Melanocytes from Human Pluripotent Stem Cells	

If the Assignee is an Organization check here. ☐				
Prefix	**Given Name**	Middle Name	**Family Name**	Suffix

Mailing Address Information:			
Address 1			
Address 2			
City		**State/Province**	
Country		Postal Code	
Phone Number		Fax Number	
Email Address			

Additional Assignee Data may be generated within this form by selecting the **Add** button.

Signature:

A signature of the applicant or representative is required in accordance with 37 CFR 1.33 and 10.18. Please see 37 CFR 1.4(d) for the form of the signature.

Signature	/Nabeela R. McMillian, #43,363/			Date (YYYY-MM-DD)	2010-02-23
First Name	Nabeela	Last Name	McMillian	Registration Number	43363

This collection of information is required by 37 CFR 1.76. The information is required to obtain or retain a benefit by the public which is to file (and by the USPTO to process) an application. Confidentiality is governed by 35 U.S.C. 122 and 37 CFR 1.14. This collection is estimated to take 23 minutes to complete, including gathering, preparing, and submitting the completed application data sheet form to the USPTO. Time will vary depending upon the individual case. Any comments on the amount of time you require to complete this form and/or suggestions for reducing this burden, should be sent to the Chief Information Officer, U.S. Patent and Trademark Office, U.S. Department of Commerce, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450. DO NOT SEND FEES OR COMPLETED FORMS TO THIS ADDRESS. **SEND TO: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.**

Privacy Act Statement

The Privacy Act of 1974 (P.L. 93-579) requires that you be given certain information in connection with your submission of the attached form related to a patent application or patent. Accordingly, pursuant to the requirements of the Act, please be advised that: (1) the general authority for the collection of this information is 35 U.S.C. 2(b)(2); (2) furnishing of the information solicited is voluntary; and (3) the principal purpose for which the information is used by the U.S. Patent and Trademark Office is to process and/or examine your submission related to a patent application or patent. If you do not furnish the requested information, the U.S. Patent and Trademark Office may not be able to process and/or examine your submission, which may result in termination of proceedings or abandonment of the application or expiration of the patent.

The information provided by you in this form will be subject to the following routine uses:

1. The information on this form will be treated confidentially to the extent allowed under the Freedom of Information Act (5 U.S.C. 552) and the Privacy Act (5 U.S.C. 552a). Records from this system of records may be disclosed to the Department of Justice to determine whether the Freedom of Information Act requires disclosure of these records.

2. A record from this system of records may be disclosed, as a routine use, in the course of presenting evidence to a court, magistrate, or administrative tribunal, including disclosures to opposing counsel in the course of settlement negotiations.

3. A record in this system of records may be disclosed, as a routine use, to a Member of Congress submitting a request involving an individual, to whom the record pertains, when the individual has requested assistance from the Member with respect to the subject matter of the record.

4. A record in this system of records may be disclosed, as a routine use, to a contractor of the Agency having need for the information in order to perform a contract. Recipients of information shall be required to comply with the requirements of the Privacy Act of 1974, as amended, pursuant to 5 U.S.C. 552a(m).

5. A record related to an International Application filed under the Patent Cooperation Treaty in this system of records may be disclosed, as a routine use, to the International Bureau of the World Intellectual Property Organization, pursuant to the Patent Cooperation Treaty.

6. A record in this system of records may be disclosed, as a routine use, to another federal agency for purposes of National Security review (35 U.S.C. 181) and for review pursuant to the Atomic Energy Act (42 U.S.C. 218(c)).

7. A record from this system of records may be disclosed, as a routine use, to the Administrator, General Services, or his/her designee, during an inspection of records conducted by GSA as part of that agency's responsibility to recommend improvements in records management practices and programs, under authority of 44 U.S.C. 2904 and 2906. Such disclosure shall be made in accordance with the GSA regulations governing inspection of records for this purpose, and any other relevant (i.e., GSA or Commerce) directive. Such disclosure shall not be used to make determinations about individuals.

8. A record from this system of records may be disclosed, as a routine use, to the public after either publication of the application pursuant to 35 U.S.C. 122(b) or issuance of a patent pursuant to 35 U.S.C. 151. Further, a record may be disclosed, subject to the limitations of 37 CFR 1.14, as a routine use, to the public if the record was filed in an application which became abandoned or in which the proceedings were terminated and which application is referenced by either a published application, an application open to public inspections or an issued patent.

9. A record from this system of records may be disclosed, as a routine use, to a Federal, State, or local law enforcement agency, if the USPTO becomes aware of a violation or potential violation of law or regulation.

METHODS FOR PREPARING HUMAN MELANOCYTES FROM HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to ex vivo methods for obtaining populations of human melanocytes derived from human pluripotent stem cells.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Melanocytes are pigment-producing cells responsible for coloration of skin, eyes, and hair. In vertebrate development, melanocytes originate from the neural crest and undergo a complex process of fate-specification, proliferation, migration, survival, and differentiation before finally residing in the epidermis. Pigmentation is achieved by the highly regulated manufacture of the melanin pigment in specialized organelles called melanosomes. Through this process called melanogenesis, melanosomes are transported along the dendrites and transferred to growing hair, or surrounding keratinocytes to play a critical role in protecting human tissues from the deleterious effects of sun's light ultraviolet (UV) radiations that cause DNA damages and tissues cancer. Over the past 10 years, several genes have been associated with pigmentary disorders involving melanocytes. Those disorders can be classified in 3 types. First, diseases affecting the development of melanocytes from the neural crest (piebaldism, Waardenburg syndrome and dyschromatosis symmetrica hereditaria), second, diseases with defects in melanin synthesis (albinism) and third, disorders of melanosome maturation or transfer (Hermansky-Pudlak syndrome, Chediak-Higashi syndrome and Griscelli syndrome) (Rose PT et al). Interestingly, although a lot of efforts have been made to better understand about the function and regulation of mature melanocytes, very little is known with regard to the molecular and cellular mechanisms involved in melanocyte development and differentiation from embryonic precursors in the Human.

Transformation of somatic cells with a set of embryonic transcription factors produces cells with the pluripotent properties of embryonic stem cells (hESCs). These induced pluripotent stem (hiPSCs) cells have the potential to differentiate into any cell type, making them a potential source from which to produce cells as a therapeutic platform for the treatment of a wide range of diseases. As a proof of concept of the therapeutic benefits of those cells, it was demonstrated that

hiPSCs-derived bone marrow cells could reverse the sickle cell anaemia phenotype in a suitable humanized mouse model.

Induction of melanocytes in vitro was first reported by Yamane et al (1999), who cocultured mouse embryonic stem cells on monolayers of the stromal cell line ST2 during 21 days in medium containing stem cells factor (SCF), endothelin 3 (EDN3) , 12-O-tetradecanoyl-phorbel 13-acetate (TPA) and dexamethasone. More recently the Herlyn laboratory (Fang et al , 2006) have shown that melanocytes can be derived from hESCs using human embryoid bodies in the absence of feeder cells using a combination of the proteins inducers named Wnt3a, endothelin-3 and SCF.

However, there is no report in the prior art of a method for generating human melanocytes from human pluripotent stem cells using a 2D protocol.

Hence, there is still a need in the art for novel methods for generating human melanocytes from human pluripotent stem cells.

SUMMARY OF THE INVENTION:

The invention relates to an ex vivo method for obtaining a population of human melanocytes derived from human pluripotent stem cells comprising the step a) consisting of co-culturing human pluripotent stem cells with cells that support ectodermal differentiation in the presence of an agent that stimulates epidermal induction and an agent that stimulates terminal differentiation of keratinocytes.

The invention also relates to an isolated substantially pure homogenous population of human melanocytes derived from human pluripotent stem cells obtainable by the above method.

The invention also relates to a pharmaceutical composition comprising the substantially pure homogenous population of human melanocytes derived from human pluripotent stem cells described above and optionally a pharmaceutically acceptable carrier or excipient.

In a further aspect, the invention also relates to the isolated substantially pure homogenous population of human melanocytes derived from human pluripotent stem cells or the pharmaceutical composition as described above for use in a method of treatment.

The invention also relates to a method of preparing a human skin substitute comprising a step consisting of providing an isolated substantially pure homogenous population of human

melanocytes derived from human pluripotent stem cells according to the invention and a consisting of providing a population of human keratinocytes.

Further, the invention relates to a human skin substitute obtainable by the method described above and to its use in a method of treatment.

In another aspect, the invention relates to a method for screening compounds for a given biological effect on human melanocytes comprising the steps of:

i) incubating an isolated substantially pure homogenous population of human melanocytes derived from human pluripotent stem cells as described above in the presence or absence of a test compound;

ii) comparing said given biological effect in the population of melanocytes in the presence or absence of said test compound.

The invention also relates to the use of an isolated substantially pure homogenous population of human melanocytes derived from human pluripotent stem cells as defined above or a human skin substitute according to claim 12 as defined above for screening compounds.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION:

The present invention relates to an ex vivo method for obtaining a population of human melanocytes derived from human pluripotent stem cells comprising the step a) consisting of co-culturing human pluripotent stem cells with cells that support ectodermal differentiation in the presence of an agent that stimulates epidermal induction and an agent that stimulates terminal differentiation of keratinocytes.

The term “melanocytes” has its general meaning in the art. It refers to the pigmented melanin-secreting cells in the epithelium and in the hair that are responsible for the coloration of the skin and hair.

Advantageously, the ex vivo method of the invention is a 2D method that allows the monitoring of the different stages of differentiation of the human pluripotent stem cells into human melanocytes. The method of the invention can therefore be useful for screening compounds that interfere (positively or negatively) with this differentiation process.

The expression “cell culture surface” or “cell culture matrix” refers to every type of surface or matrix suitable for cell culture. The term “cell culture surface” includes but is not limited to tissue culture plate, dish, well or bottle. In a particular embodiment, the culture surface

is plastic surface of the culture plate, dish, well or bottle. The cell culture surface is compatible with the coating of dermis fibroblasts.

As used herein, the expression “cells that support ectodermal differentiation” refers to cells that provide an appropriate substrate and which secrete appropriate factors to support the growth and the differentiation of human pluripotent stem cells. In a particular embodiment, cells that support ectodermal differentiation are selected from the group of fibroblasts, more particularly of human and mice fibroblasts and more particularly of dermis fibroblasts. In a particular embodiment, the cells that support ectodermal differentiation are mitomycin-inactivated or irradiation inactivated human dermis fibroblasts.

In one embodiment, of the invention, the cells that support ectodermal differentiation are feeder fibroblasts.

As used herein, the expression “feeder fibroblasts” refers to cells that serve as a basal layer for pluripotent stem cells and provide secreted factors, extracellular matrix, and cellular contacts for the maintenance of stem cells in the undifferentiated state without losing pluripotency. Feeder cells can be inactivated by gamma irradiation or mitomycin. According to an embodiment of the invention, the feeder fibroblasts may be from the group of fibroblasts, more particularly of human fibroblasts and more particularly of dermis fibroblasts, including dermis fibroblast cell lines. Examples of dermis fibroblast cell lines include but are not limited to CCD-1112SK (Hovatta O, et al. 2003) and 3T3-J2 (Rheinwald JG et al. 1975). In a particular embodiment, dermis fibroblasts are previously treated to stop their proliferation before to be coated in the culture surface. Therefore, dermis fibroblasts may be irradiated or treated with a cell cycle blocking agent such as mitomycin.

As used herein, the term “dermis fibroblast” refers to a population of cells that synthesizes and maintains the extracellular matrix of dermis. Specific markers of dermis fibroblasts include vimentin and FAP (fibroblast activation protein).

According to an embodiment of the invention, the cell culture surface is selected in the manner that dermis fibroblasts may naturally adhere on it. Various materials of cell culture surface may be selected. Examples of such materials include but are not limited to plastic tissue culture dishes or dishes coated with gelatine.

As used herein, the expression “agent that stimulates epidermal induction” refers to an agent that is capable of inducing the expression of epidermal markers such as keratin 8 and

keratin 18. Typically an agent that stimulates epidermal induction inhibits trophoblast and mesoderm induction.

In a particular embodiment, the agent that stimulates epidermal induction is selected from the group consisting of Bone Morphogenetic Proteins (such as BMP-2, BMP-4 and BMP-7), receptor-regulated Smad proteins (such as Smad 1, Smad 5 and Smad 9) and ligands of the TGF-beta family (such as Growth and Differenciation Factor 6: GFD-6) (Moreau et al., 2004). In a preferred embodiment the agent that stimulates epidermal induction is selected from the group consisting of BMP-2, BMP-4, BMP-7, Smad1, Smad5, Smad7 and GFD-6. In a preferred embodiment, the agent that stimulates epidermal induction is BMP-4.

The term "BMP-4" refers to Bone morphogenetic protein 4. BMP-4 is a polypeptide belonging to the TGF-β superfamily of proteins. An exemplary native BMP-4 amino acid sequence is provided in GenPept database under accession number AAC72278.

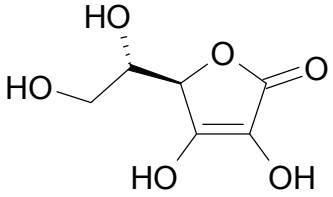
In one embodiment, the agent that stimulates epidermal induction is selected from the group consisting of BMP-2, BMP-4, BMP-7, Smad1, Smad5, Smad7 and GFD-6.

In a preferred embodiment, said agent that stimulates epidermal induction is BMP-4. The concentration of BMP-4 may vary from 0.02 nM to 77 nM or 0.3ng/mL to 1 000 ng/mL. In a particular embodiment the concentration of BMP-4 is 0.5nM.

As used herein, the expression "agent that stimulates terminal differentiation of keratinocytes" refers to an agent that stimulates the expression of keratin 5 and keratin 14. Indeed, keratin 5 and keratin 14 are markers of the basal keratinocytes which are capable of terminal differentiation in 3D culture. In one particular embodiment, the agent that stimulates terminal differentiation of keratinocytes is selected from the group consisting of ascorbic acid and retinoic acid.

In a preferred embodiment, said agent that stimulates terminal differentiation of keratinocytes is ascorbic acid.

The term "ascorbic acid" refers to (R)-3,4-dihydroxy-5-((S)- 1,2-dihydroxyethyl)furan-2(5H)-one which has the formula of :



According to an embodiment of the invention, the concentration of ascorbic acid may vary from 0.01 mM to 1 mM. In a particular embodiment the concentration of ascorbic acid is 0.3 mM.

As used herein, the term "human pluripotent stem cell" refers to any human precursor cell that has the ability to form any adult cell.

In a particular embodiment, human pluripotent stem cells include but are not limited to human embryonic stem cells (hES cells) or human induced pluripotent stem cells (hiPS cells).

As used herein, the term "human embryonic stem cells" or "hES cells" or “hESCs” refers to human precursor cells that have the ability to form any adult cell. hES cells are derived from fertilized embryos that are less than one week old.

According to an embodiment of the invention, hES cells may be selected from any hES cell lines. Examples of hES cell lines include but are not limited to, SA01, VUB-01, WA01 (H1) (Thomson JA et al 1998), and WA09 (H9) (Amit M et al. 2000). According to the invention hES cells are not previously differentiated in embryoid bodies as described in Fang et al (2006).

As used herein, the term “human induced pluripotent stem cells” or “human iPS cells” or “human iPSCs” or “hiPSCs” refers to a type of human pluripotent stem cell artificially derived from a human non-pluripotent cell (e.g. an adult somatic cell). Human induced pluripotent stem cells are identical to human embryonic stem cells in the ability to form any adult cell, but are not derived from an embryo. Typically, a human induced pluripotent stem cell may be obtained through the induced expression of Oct3/4, Sox2, Klf4, and c-Myc genes in any adult somatic cell (e.g. fibroblast). For example, human induced pluripotent stem cells may be obtained according to the protocol as described by Takahashi K. et al. (2007), by Yu et al. (2007) or else by any other protocol in which one or the other agents used for reprogramming cells in these original protocols are replaced by any gene or protein acting on or transferred to the somatic cells at the origin of the iPSC lines. Basically, adult somatic cells are transfected with viral vectors, such as retroviruses, which comprises Oct3/4, Sox2, Klf4, and c-Myc genes.

According to an embodiment of the invention human iPS cells may be selected from any human iPS cell lines. Examples of human iPS cell lines include but are not limited to clones 201B (Takahashi et al., 2007) and hiPS (Foreskin) or IMR90 (Yu et al., 2007).

Alternatively, hES cells or human iPS cells may be selected from master cell banks that may be constituted in a therapeutic purpose. In a preferred manner, hES cells or hiPS cells may

be selected to avoid or limit immune rejection in a large segment of the human population. Typically hES cells or hiPS cells are HLA-homozygous for genes encoding major histocompatibility antigens A, B and DR, meaning that they have a simple genetic profile in the HLA repertory (Nakatsuji N et al, 2008 and Taylor C et al 2003). The cells could serve to create a stem cell bank as a renewable source of cells that may be suitable for preparing melanocytes for use in cell therapy of pathologies associated with melanocyte deficiencies.

In another particular embodiment, human pluripotent stem cells may carry a mutation or a plurality of mutations that are causative for a genetic disease in human, and in particular mutation that are causative for a genetic disease of the human skin.

As used herein, the expression "pathologies associated with melanocyte deficiencies", or "pigmentation disorders", refers to any pathology or disease in which there is a lack of functional melanocytes. This can be due to a deficiency in the enzymes necessary for the synthesis of melanin, to a deficiency in the development and/or proliferation and/or survival of melanocytes.

Pathologies associated with a melanocyte deficiency, or pigmentary disorders involving melanocytes, include, but are not limited to, diseases affecting the development of melanocytes from the neural crest (piebaldism, Waardenburg syndrome and dyschromatosis symmetrica hereditaria), diseases with defects in melanin synthesis (albinism), disorders of melanosome maturation or transfer (Hermansky-Pudlak syndrome, Chediak-Higashi syndrome and Griscelli syndrome) and vitiligo.

Typically, step a) is carried out in a base culture medium supplemented an agent that stimulates epidermal induction and an agent that stimulates terminal differentiation of keratinocytes. Suitable base culture medium can be for example FAD medium (3:1 mixture of Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) and Ham's F12 media), and 10% fetal calf serum, supplemented with 5 µg/mL insulin, 0.5 µg/mL hydrocortisone, 10^{-10} mol/L cholera toxin, 1.37 ng/mL recombinant epidermal growth factor.

In one embodiment, the base culture medium is free of animal-derived substances. In a preferred embodiment, the base culture medium consists essentially of synthetic compounds, compounds of human origin and water. Advantageously, said culture medium can be used for culturing cells according to good manufacturing practices (under "GMP" conditions). Typically, the serum can be replaced by N2B27 medium, as described in Ying et al., 2003, in Lowell et al., 2006 and in Liu Y et al., 2006. N2B27 comprises DMEM/F12 and Neurobasal media in a 1/1

ratio, N2 supplement (1/100), B27 supplement (1/50) and beta-mercaptoethanol (1/1000). It is available, for example, under reference SCS-SF-NB-02 from Stem Cell Sciences UK Ltd.

In another embodiment, during step a) can be carried out in a base culture medium in the presence of an agent that stimulates epidermal induction and an agent that stimulates terminal differentiation of keratinocytes and in the presence of an agent which stimulates the differentiation of melanocytes. Typically, said agent which stimulates the differentiation of melanocytes can be selected from the group consisting of WNT family protein (such as wnt3a), stem cells factor (SCF) and endothelin 3 (EDN3) (Fang et al, 2006). These proteins are involved in the differentiation from neural crest to pigmented cells. The Wnt family of proteins induced neural cells and pigmented cells formation in mice. The absence of melanocytes in animals that are deficient in either EDN3 or its receptor suggests that this pathway is critical in the development of neural crest-derived melanocyte populations

In vitro studies show that EDN3 promotes the proliferation, survival, and differentiation of melanocyte precursors. Mutations in *KIT* (encoding the SCF receptor) do not affect specification of melanocyte lineage but instead hamper melanoblast survival at later developmental stages. In particular, SCF/KIT signaling is essential for migration, proliferation, survival, and differentiation of the precursor melanoblasts.

Wnt3a signaling determines melanocyte fate of neural crest cells, EDN3 contributes towards cell fate, and SCF promotes proliferation/survival of the committed progenitors.

According to the invention, human pluripotent stem cells (e.g. hES cells or human iPS cells) are cultivated during step a) for a time period sufficient for allowing the apparition of clones of pigmented cell populations. Said clones of pigmented cell population are easily identified by the skilled person by bare eye, without the use of a microscope.

According to a particular embodiment, step a) is carried out for at least 35 days, preferably at least 40 days, even more preferably at least 45, at least 50, at least 55, at least 60, at least 65, at least 70 or at least 75 days.

Typically, step a) is carried out for at most 120 days, preferably at most 100 days.

A further object of the invention relates to an isolated population of human melanocytes derived from human pluripotent stem cells obtainable by a method as above described.

As used herein, the term “isolated” refers to a cell or a population of cells which has been separated from at least some components of its natural environment.

A further object of the invention relates to an isolated substantially pure homogenous population of human melanocytes derived from human pluripotent stem cells obtainable by a method as above described.

The term "substantially pure homogenous population", as used herein, refers to a population of cells wherein the majority (e.g., at least about 80%, preferably at least about 90%, more preferably at least about 95%) of the total number of cells have the specified characteristics of the melanocytes of interest.

According to a further embodiment, step a) can be followed by the following steps:

b) isolating a pigmented cell from the population of cells obtained in step a);

c) culturing said isolated cell in an appropriate culture medium.

As used herein, the term "isolating", when referring to a cell in culture, refers to the cloning of said cell, i.e. the fact of separating said cell from other cells in culture in order to establish a novel clone. Typically, step b) can be carried out using standard techniques known to the person skilled in the art of cell culture.

In one embodiment, said isolating step b) can comprise cell dissociation using mechanical and/or enzymatic treatment. Typically, said isolation step b) can comprise a treatment with trypsin.

Typically, said isolation step b) can further comprise the seeding of the isolated pigmented cell on an appropriate cell culture surface.

As used herein, the term "appropriate culture medium" refers to a culture medium that contains nutrients necessary to support the growth, proliferation and survival of a particular cell population.

In particular, an appropriate culture medium for human melanocytes, also termed "melanocytes culture medium" is a culture medium that contains nutrients necessary to support the growth, proliferation and survival of human melanocytes. Typically, a melanocytes culture medium according to the invention may consist for example of 254CF medium supplemented with growth factors (Invitrogen).

Typically, an appropriate culture medium suitable for step c) according to the invention is devoid of BMP-4 and ascorbic acid.

The human melanocytes (or the substantially pure homogenous population of human melanocytes) of the invention can be used for several types of applications, which include, but are not limited to:

1) cell therapy of pigmentary disorders or skin lesions;

2) tissue engineering, by reconstituting human skin substitutes;

3) cellular models useful for pharmacological and toxicological studies;

4) studying the mechanisms of melanocyte development and identifying new therapeutic targets for the treatment of melanoma.

1) Cell therapy of pigmentary disorders or skin lesions

The substantially pure homogenous population of human melanocytes derived from human pluripotent stem cells obtained according to the method of the invention may be then suitable for use in therapy.

Over the past 10 years, several genes have been associated with pigmentary disorders involving melanocytes. Those disorders can be classified in 3 types. First, diseases affecting the development of melanocytes from the neural crest (piebaldism, Waardenburg syndrome and dyschromatosis symmetrica hereditaria), second, diseases with defects in melanin synthesis (albinism) and third, disorders of melanosome maturation or transfer (Hermansky-Pudlak syndrome, Chediak-Higashi syndrome and Griscelli syndrome). Interestingly, although a lot of efforts have been made to better understand about the function and regulation of mature melanocytes, very little is known with regard to the molecular and cellular mechanisms involved in melanocyte development and differentiation from embryonic precursors in the Human.

Moreover Vitiligo is a de-pigmented patch on the skin. It occurs where the immune system has destroyed a patch of melanocytes which are the cells that produce the dark pigment melanin.

The depigmented skin becomes photosensitive on the exposed areas of the skin, leading to redness and burning on sun exposure. Depending on the type, extent, and duration of vitiligo, conventional medical therapies such as topical and systemic corticosteroids, topical immunomodulators, and phototherapy are not always successful, and repigmentation is often incomplete.

Surgical methods become important in cases where medical therapy fails to cause repigmentation or in cases of segmental vitiligo where the response to surgery is excellent. The basic principle of surgical treatment is autologous grafting of viable melanocytes from pigmented donor skin to recipient vitiliginous areas. Various grafting methods have been described including tissue grafts and cellular grafts. Stability of the disease is the most important criterion to obtain a successful outcome.

Therefore the invention relates to a pharmaceutical composition comprising a substantially pure homogenous population of human melanocytes derived from human pluripotent stem cells of the invention and optionally a pharmaceutically acceptable carrier or excipient. In certain embodiments, a pharmaceutical composition may further comprise at least one biologically active substance or bioactive factor.

As used herein, the term "pharmaceutically acceptable carrier or excipient" refers to a carrier medium which does not interfere with the effectiveness of the biological activity of the progenitor cells, and which is not excessively toxic to the host at the concentrations at which it is administered. Examples of suitable pharmaceutically acceptable carriers or excipients include, but are not limited to, water, salt solution (e.g., Ringer's solution), oils, gelatines, carbohydrates (e.g., lactose, amylase or starch), fatty acid esters, hydroxymethylcellulose, and polyvinyl pyroline. Pharmaceutical compositions may be formulated as liquids, semi-liquids (e.g., gels) or solids (e.g., matrix, lattices, scaffolds, and the like).

As used herein the term "biologically active substance or bioactive factor" refers to any molecule or compound whose presence in a pharmaceutical composition of the invention is beneficial to the subject receiving the composition. As will be acknowledged by one skilled in the art, biologically active substances or bioactive factors suitable for use in the practice of the present invention may be found in a wide variety of families of bioactive molecules and compounds. For example, a biologically active substance or bioactive factor useful in the context of the present invention may be selected from anti-inflammatory agents, anti-apoptotic agents, immunosuppressive or immunomodulatory agents, antioxidants, growth factors, and drugs.

A related aspect of the invention relates to a method for treating a subject suffering from a pathology associated with melanin deficiencies, said method comprising a step of administering to the subject an efficient amount of a substantially pure homogenous population

of human melanocytes derived from human pluripotent stem cells of the invention (or a pharmaceutical composition thereof).

As used herein, the term “subject” refers to a mammal, preferably a human being, that can suffer from pathology associated with skin damage, but may or may not have the pathology.

In the context of the invention, the term “treating” or “treatment”, as used herein, refers to a method that is aimed at delaying or preventing the onset of a pathology, at reversing, alleviating, inhibiting, slowing down or stopping the progression, aggravation or deterioration of the symptoms of the pathology, at bringing about ameliorations of the symptoms of the pathology, and/or at curing the pathology.

As used herein, the term “efficient amount” refers to any amount of a substantially pure homogenous population of human melanocytes derived from human pluripotent stem cells (or a pharmaceutical composition thereof) that is sufficient to achieve the intended purpose.

The substantially pure homogenous population of human melanocytes derived from human pluripotent stem cells (or a pharmaceutical composition thereof) of the invention may be administered to a subject using any suitable method.

In certain embodiments, a treatment according to the present invention further comprises pharmacologically immunosuppressing the subject prior to initiating the cell-based treatment. Methods for the systemic or local immunosuppression of a subject are well known in the art.

Effective dosages and administration regimens can be readily determined by good medical practice based on the nature of the pathology of the subject, and will depend on a number of factors including, but not limited to, the extent of the symptoms of the pathology and extent of damage or degeneration of the tissue or organ of interest, and characteristics of the subject (e.g., age, body weight, gender, general health, and the like).

Typically, the human melanocytes of the invention can be used in a method for treating pigmentary disorders and pigmentary genodermatosis.

Typically, the human melanocytes of the invention can be used in a method for treating skin lesions, by establishing a melanised epidermis which resembles the human skin physiology (severely burned patients, leg ulcer such as diabetic skin ulcerations and sickle-cell anemia...).

The human melanocytes of the invention may also be used in order to provide insight onto the mechanisms involved in skin pigmentation disorders, including genetic disorders and photosensitivity.

2) Tissue engineering - reconstituting human skin substitutes

The human melanocytes derived from human pluripotent stem cells obtainable by the method as above described are able to recapitulate all morphological and functional attributes of primary human melanocytes. Indeed, the inventors demonstrated that said cells are able to produce and secrete melanin through melanosomes. When incorporated into a 3D organotypic system with human keratinocytes, they are able to participate in the formation of a melanized pluristratified epidermis.

The substantially pure homogenous population of human melanocytes derived from human pluripotent stem cells of the invention may be also suitable for preparing human skin substitutes. Advantageously, the human skin substitutes according to the invention are melanised skin substitutes.

The substantially pure homogenous population of human melanocytes derived from human pluripotent stem cells of the invention may be implanted alone or in combination with other cells, and/or in combination with other biologically active factors or reagents, and/or drugs. As will be appreciated by those skilled in the art, these other cells, biologically active factors, reagents, and drugs may be administered simultaneously or sequentially with the cells of the invention.

Typically, the substantially pure homogenous population of human melanocytes according to the invention may be implanted in combination with human keratinocytes in order to reconstruct a human epidermis. The skilled person in the art knows in what ratio to combine said cells.

Typically, the melanocyte to keratinocyte ratio can vary between 1:1 and 1:100, according to the desired result. In a preferred embodiment, the human melanocytes according to the invention are used in combination with keratinocytes in a ratio that varies between 1:3 and 1:20.

Keratinocytes useful for carrying out such a method can be any keratinocytes of human origin capable of reconstituting a human epidermis. They may be primary keratinocytes isolated from a human skin sample. Alternatively, they may be keratinocytes derived from human pluripotent stem cells.

Typically, the keratinocytes may be derived from human pluripotent stem cells according to the method described in Guenou et al. 2009.

Full stratification and histological differentiation of keratinocytes can be achieved by the use of three-dimensional organotypic culture methods (Doucet O, et al. 1998 ; Poumay y. et al. 2004 ; Gache Y. et al. 2004). For example, when in vitro cultures of human keratinocytes at an air-liquid interface, a highly ordered stratum corneum is formed.

As used herein, the term "organotypic culture" refers to a three-dimensional tissue culture where cultured cells are used reconstruct a tissue or organ in vitro.

In a particular embodiment, human skin substitutes according to the invention may be generated as described by Poumay, Y et al. 2004. Culture of keratinocytes may be performed on polycarbonate culture inserts. These cells may be maintained for 11 days in Epilife medium supplemented with 1.5 mM $CaCl_2$ and 50 µg/ml ascorbic acid. The cells are exposed to the air-liquid interface by removing the culture medium for 10 days.

In a particular embodiment, keratinocytes are seeded on a cell culture matrix populated with human dermis fibroblasts before providing an organotypic culture of it as above described. This particular technique allows obtaining a human skin substitute which comprises dermis and epidermis. Such a method may be performed through the protocol as described by Del Rio M. et al. (2002) or Larcher F. et al. (2007). For example, keratinocytes may be seeded on a fibrin matrix populated with live dermis fibroblasts. Organotypic cultures are then grown submerged up to keratinocyte confluence, and finally maintained at the air–liquid interface for 7 days to enhance stratification and differentiation of the epithelium.

Typically the human skin substitute of the invention comprises a pluristratified epidermis which results from the in vitro-derived culture of the substantially pure homogenous population of human melanocytes derived from human pluripotent stem cells as above described, together with human keratinocytes, that has stratified into melanized squamous epithelia. In a particular embodiment, the human skin substitute of the invention may comprise a melanized pluristratified epidermis as above described and a dermis.

Therefore a further aspect of the invention relates to a method of preparing a human skin substitute comprising a step consisting of providing a population of human melanocytes derived from human pluripotent stem cells as described above and providing a population of human keratinocytes.

A further object of the invention relates to a human skin substitute obtainable by the method as above described.

A further object of the invention relates to a method for grafting an animal, preferably a mammal, more preferably a mouse, with a human skin substitute as described above. In a particular embodiment said animal is an immunodeficient animal (e.g. NOD/SCID mouse). Said method may be useful to provide animal models for human skin.

In a particular embodiment, animals grafted with a human skin substitute of the invention may be generated as described by Del Rio M. et al. (2002). Briefly, animals are shaved and aseptically cleansed. Full-thickness wounds are then created on the dorsum of mice and finally grafting with the human skin substitute of the invention is performed under sterile conditions. 10-12 weeks may be then sufficient to obtain a human skin on said animal.

A further object of the invention relates to an animal model for human skin obtainable according to the method as above described.

The human skin substitutes and animal models of the present invention may have a variety of uses. These uses include, but are not limited to, use for screening compounds, substrates for culturing tumors and pathological agents (e.g., human papilloma virus), and for modelling human injuries or pathologies associated with skin damage and for pharmaco-toxicologic assays.

In particular, the skin substitutes and animal models of the present invention can be used in order to study the DNA damage induced by UV exposure and the potential effect of various drugs on DNA damage induced by UV exposure.

For example human skin substitutes and animal models of the present invention may be used for a variety of in vitro and in vivo tests. In particular but in non limiting way, the human skin substitutes and animal models of the present invention find use in the evaluation of: skin care products, drug metabolism, cellular responses to test compounds, wound healing, phototoxicity, dermal irritation, dermal inflammation, skin corrosivity, and cell damage. Typically, for animal models of the invention, the product may be administered topically on the human skin, or may be administered through an oral, sublingual, subcutaneous, intramuscular, intravenous, and transdermal route.

The present invention encompasses a variety of screening assays. In some embodiments, the screening method comprises providing a human skin substitute or an animal model of the

present invention and at least one test compound or product (e.g., a skin care product such as a moisturizer, cosmetic, dye, or fragrance; the products can be in any from, including, but not limited to, creams, lotions, liquids and sprays), applying the product or test compound to said human skin substitute or animal model , and assaying the effect of the product or test compound on the human skin substitute or animal model. Typically, for animal models of the invention, the test compound or product may be administered topically on the human skin, or may be administered through an oral, sublingual, subcutaneous, intramuscular, intravenous, and transdermal route. A wide variety of assays may be used to determine the effect of the product or test compound on the human skin substitute or animal model. The assays may be directed to the toxicity, potency, or efficacy of the compound or product. Additionally, the effect of the compound or product on growth, barrier function, or tissue strength can be tested.

In other preferred embodiments, the human skin substitutes or animal models of the invention find use for screening the efficacy of drug introduction across the skin.

In a particular embodiment, the human skin substitutes or animal models of the present invention are also useful for the culture and study of tumours that occur naturally in the skin as well as for the culture and study of pathogens that affect the skin. Accordingly, in some embodiments, it is contemplated that the human skin substitutes or animal models of the present invention are seeded with malignant cells. These reconstructed human skin substitutes or animal models can then be used to screen compounds or other treatment strategies (e.g., radiation or tomotherapy) for efficacy against the tumour in its natural environment. In some embodiments of the present invention provide methods comprising providing a reconstructed human skin substitute or animal model infected with a pathogen of interest and at least one test compound or treatment and treating the skin substitute or animal model with the test compound or treatment.

In another particular embodiment, the human skin substitutes or animal models of the present invention are also useful for modelling human injuries or pathologies associated with skin damage. For example, the human skin substitutes and animal models of the present invention may provide both in vitro and in vivo models for modelling wounds, burns (e.g. fire burns, sunburns…), or lesions caused by irradiations, pathogens…, irritations caused by chemical products or environment conditions, degenerative diseases and genetic diseases. In certain embodiments, pathologies of interest are genodermatosis such as Epidemolysis bullosa, Xeroderma pigmentosum, ichthyosis, ectodermal dysplasia, kindler syndrome and others.

Typically, the human skin substitutes or animal models of the present invention may be generated form pluripotent stem cells that may carry a mutation or a plurality of mutations that are causative for a genetic disease of the human skin. Both in vitro and in vivo models as described above may have particular interests for medical research or may be useful for screening compounds for the treatment or the prevention of said injuries and pathologies. In particular, the present invention contemplates the use of the human skin substitutes and animal models according to the invention for screening of compounds from libraries, in particular combinatorial libraries, using e.g. high throughput or high content techniques. Typically, for animal models of the invention, the test compound or product may be administered topically on the human skin, or may be administered through an oral, sublingual, subcutaneous, intramuscular, intravenous, and transdermal route.

In a further aspect of the invention, the human skin substitutes of the present invention may be used for the treatment of a pathology associated with skin damage.

Therefore the present invention relates to a method for the treatment of a pathology associated skin damage comprising a step consisting of grafting a patient in need thereof with a human skin substitute of the invention.

For example, the human skin substitutes of the present invention find use in wound closure and burn treatment applications. The use of grafts for the treatment of burns and wound closure is described U.S. Pat. Nos. 5,693,332; 5,658,331; and 6,039,760. Accordingly, the present invention provides methods for wound closure, including wounds caused by burns, comprising providing a human skin substitute according to the present invention and a patient suffering from a wound and grafting the patient with the human skin substitute under conditions such that the wound is closed.

3) Cellular models useful for pharmacological and toxicological studies

The isolated substantially pure population of human melanocytes of the present invention can provide an important source of material for various screening tests. They can therefore be used in high content screening (HCS) and high throughput screening (HTS) assays. For instance, these assays can serve to identify therapeutic targets for disorders associated with melanocytes. Other assays can be performed in order to identify cosmetically active substances or compounds which modulate skin pigmentation.

The isolated substantially pure population of human melanocytes of the present invention can be a useful alternative to animal experimentation in order to obtain predictive data in human before carrying out clinical trials.

Advantageously, the isolated substantially pure population of human melanocytes of the present invention can be obtained from a variety of different human pluripotent stem cells originating from a variety of human subjects, be they healthy or diseased. In particular, they can contain different genotypes, reflecting different ethnic origins, different genetic disorders or different phenotypes reflecting the skin sensitivity to UV radiation.

The human melanocytes of the invention can be used to study cutaneous irritation and corrosivity, in vitro phototoxicity, and response to UV radiations.

In one aspect, the invention therefore relates to a method for screening compounds for a given biological effect on human melanocytes comprising the steps of:

i) incubating an isolated substantially pure homogenous population of human melanocytes derived from human pluripotent stem cells as described above in the presence or absence of a test compound;

ii) comparing said biological effect in the population of melanocytes in the presence or absence of said test compound.

In another aspect, the invention relates to the use of the human melanocytes of the invention as an in vitro cellular model for screening compounds, in particular in cosmetology or in clinical studies of sunburns.

<u>4) Studying the mechanisms of melanocyte development and identifying new therapeutic targets for the treatment of melanoma</u>

The human melanocytes of the present invention can also be used in order to elucidate the mechanisms and the signalling pathways involved in the physiological and pathological development of melanocytes.

The human melanocytes of the present invention can also be used in order to identify new therapeutic targets for the treatment of melanoma.

The invention therefore also relates to the use of the human melanocytes as defined above as a cellular model for studying the development of melanocytes.

Embryonic development of the melanocyte initiates with cell fate specification in the neural crest, which is then followed by cell migration and niche localization. Many genes involved in melanocyte development have also been implicated in the development of melanoma, an aggressive and fatal form of skin cancer that originates in the melanocyte. Although early stage melanomas that have not spread to the lymph nodes can be excised with little risk of recurrence, patients diagnosed with metastatic melanoma have a high mortality rate due to the resistance of most tumors to radiotherapy and chemotherapy. Transformed melanocytes that develop into melanomas proliferate abnormally and often begin to grow radially in the skin. Vertical growth can then follow this radial growth, leading to an invasion through the basement membrane into the underlying dermis and subsequent metastasis. It is still unclear, however, how a normal melanocyte becomes a melanoma cell, and how melanoma utilizes the properties of the normal melanocyte and its progenitors in its progression.

Melanoma also utilizes many regulatory signals and pathways required during ontogeny and regeneration.

Uong et al in their studies described above (2010) indicate that melanoma formation shares many characteristics with melanocyte development and regeneration, though there are still a number of questions to be answered. Furthermore understanding of the normal regulation and behaviors of melanocytes and melanocyte stem cells will allow development of better strategies for cancer treatment.

The invention will be further illustrated by the following examples. However, these examples should not be interpreted in any way as limiting the scope of the present invention.

EXAMPLE: METHOD FOR PREPARING A POPULATION OF MELANOCYTES AND A HUMAN SKIN SUBSTITUTE FROM HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS

In this report, the inventors demonstrate that iPS reprogrammed cells (hiPSC) and hESC are able to generate pure and functional populations of melanocytes. These cells were obtained following a directed 2D protocol of epidermal induction on feeder cells in a FAD medium, supplemented with BMP4 and ascorbic acid. These melanocytes derived from pluripotent stem

cells express all major markers of melanocytes, develop melanosomes and synthesize melanin capable to migrate into keratinocytes

Material & Methods

hESC culture and melanocyte differentiation

hESC from two cell lines, SA01 (Cellartis, Götenborg Sweden) and WA09 (H9) (Wicell, Madison WI) and hiPSC derived using retroviruses Yamanaka factors (Takahashi et al.) and lentivirus Thomsom factors (Thomson et al.) were grown on STO mouse fibroblasts, inactivated with 10 mg/mL mitomycin C, seeded at 30 000/cm² and grown as previously described (Guenou et al., 2009).

For differentiation, hESC and hiPSC clumps were seeded onto mitomycin C-treated 3T3 fibroblasts in FAD medium composed of 2/3 DMEM, 1/3 HAM:F12 and 10% of fetal calf serum (FCII, Hyclone, Logan, UT, USA) supplemented with 5 µg/mL insulin, 0.5 µg/mL hydrocortisone, 10^{-10}M cholera toxin, 1.37 ng/mL triodothyronin, 24 µg/mL adenine and 10 ng/mL recombinant human EGF. Three independent experiments were performed using each pluripotent cell lines. Induction of ectodermal differentiation was realized using 0.5 nM of human recombinant BMP-4 (R&D, UK) and 0.3 mM ascorbic acid (Sigma-Aldrich). Cells were grown in the same medium until clones of pigmented populations were observed and isolated. After isolation pigmented cells were dissociated using trypsin 0.05% (Invitrogen) and seeded as single cells in melanocytes specific medium 254CF supplemented with growth factors (Invitrogen). After 1 week of culture in these conditions, cells presenting a morphology similar to melanocytes were mechanically isolated based on their morphology and amplified separately in the same medium during at least 12 passages.

Keratinocytes and melanocytes culture

As a control, primary human keratinocytes (HK) were cultured on mitomycin C treated 3T3 fibroblasts in FAD medium and primary human epidermal melanocytes (HEM) in 254CF medium supplemented with growth factors (Invitrogen).

Quantitative RT-PCR (Q-PCR).

Total RNA was isolated from hESC, HEM and melanocytes derived from hiPSC (mel-hiPSC) and from hESC (mel-hESC) using RNeasy Mini extraction kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's protocol. An on-column DNase I digestion was performed to avoid genomic DNA amplification. RNA level and quality were checked using the Nanodrop technology. A total of 500 ng of RNA was used for reverse transcription using the Superscript III reverse transcription kit (Invitrogen). Q-PCR analysis was performed using a LightCycler 480 system (Roche, Basel Switzerland) and SYBR Green PCR Master Mix (Roche) following the manufacturer's instructions. Quantification of gene expression was based on the DeltaCt Method and normalized on 18S expression. Melting curve and electrophoresis analysis were performed to control PCR products specificities and exclude non-specific amplification. Q-PCR arrays were prepared by loading of primer mixes (1 µM) in duplicate, in 96 well plates. Q-PCR was performed as above after addition of SYBR Green PCR Master Mix and 12.5 ng cDNA.

Immunocytochemistry.

Cells were fixed in 4% paraformaldehyde (15 minutes, room temperature) before permeabilization and blocking in PBS supplemented with 0.4% Triton X-100 and 5% BSA (Sigma-Aldrich). Primary antibodies were incubated overnight at 4°C in blocking buffer. Antibodies included mouse anti-MITF (DAKO), mouse anti-TRP1 (Abcam), rabbit anti-tyrosinase (Abcam), mouse anti-Rab27 (BD pharmingen), mouse anti-SSEA3/4 (R&D), mouse anti-TRA1-81 (eBioscience), mouse anti-RPE 65 (Abcam), rabbit anti-K14 (Novacastra) rabbit anti-PAX6 (Covance) and mouse anti-PAX3 (Santa Cruz). Cells were stained with the species specific fluorophore-conjugated secondary antibody (Invitrogen) (1 hour, room temperature); nuclei were visualized with DAPI. Three independent experiments were performed using each hESC line. Pictures were taken using a Zeiss microscope equipped with epifluorescence illumination.

FACS analyses

Cells were detached from culture plates using Trypsin-EDTA (Invitrogen) and fixed in 2% paraformaldehyde (15 minutes, room temperature). After PBS wash, cells were either

permeabilized with 0.1% Saponin (Sigma-Aldrich) or not. Primary antibodies diluted at 1:100 were incubated (one hour, room temperature) in PBS containing 0.1% FCS. Controls were made with isotype specific or no primary antibody. Species specific secondary antibodies were added (1 hour, room temperature) and cells analyzed on a FACScalibur using CellQuest software (BD Biosciences). The number of events analysed for each experiment was 10,000. Three independent experiments were performed for each cell line.

Melanosome transfer quantification

Human keratinocytes (HK) and melanocytes from primary culture or derived from pluripotent stem cells were cocultured at 1:3 ratio for three days in epilife medium supplemented with growth factors. 3 days later, immunostaining was performed with anti-TRP1 antibody to visualize melanosomes and with anti-keratin-14 antibody which is specific to keratinocytes. Fluorescence was then observed with a Zeiss fluorescence microscope. The number of melanized keratinocytes was quantified using ArrayScan (Cellomics) by the detection of keratinocytes expressing the keratin 14 and presenting TRP1 positive vesicles in their cytoplasm.

Results

Establishment of a pigmented lineage

Previously we developed a protocol from hESC that respected the chronobiology of epidermis formation during human ontogenesis to generate a homogenous population of cells exhibiting all phenotypic characteristics of basal keratinocytes (Guenou et al). In this process at 40 days of differentiation only 60 % of the cells are keratinocytes (Guenou et al), allowing the establishment of other ectodermal-derived cell types. iPS reprogramming cells using Thomsom and Yamanaka factors (IMR90 and PolyF) and undifferentiated hESC (SA01 and WA09 (H9)) and were seeded on mitomycin-treated 3T3-J2 (feeder cells in FAD medium, supplemented with BMP4 (0.5 nM) and ascorbic acid (0.3 nM) following the protocol of epidermal induction for more than 40 days.

Interestingly, a gradual pigmentation was detectable a few weeks later in the areas surrounding keratinocytes derived from hiPSC and hESC. To confirm that these pluripotent stem cell-derived pigmented populations contain cells committed to the melanocyte lineage, we

performed a molecular characterization all along the differentiation process by quantitative PCR (qPCR). For this, expression profiles were analyzed in hiPSC and hESC samples at different time points such as undifferentiated state, before and after pigmentation and purified pigmented cells. First, time course qPCR analysis demonstrated a decrease in the transcription of pluripotency gene markers *OCT4, NANOG* and *SOX2* that rapidly reached an undetectable level, comparable to the one of human adult melanocytes (HEM). Moreover, genes encoding the regulators of melanin synthesis such as *TRP1, TYROSINASE* and *MITF* increased progressively during pigmented cells enrichment in culture. Interestingly, in parallel of the increase of the levels of neural crest-derived cells markers, such as *SOX10* and *PAX3,* and we also observed an increase of neural tube-derived cell marker PAX6.

These data demonstrate the formation of several pigmented phenotypes derived from the ectodermal layer including neural crest-derived pigmented cells and neural tube-derived pigmented cells.

Characterization of a homogenous and pure population of melanocytes derived from pluripotent stem cells.

The pigmented population exhibited, after isolation and two passages, similar morphology to human adult melanocytes (HEM). These cells were named mel-iPSC for melanocytes derived from iPSCand mel-hESC for melanocytes derived from hESC. qPCR analysis of mel-iPSC and mel-hESC showed that expression of key genes involved in melanocyte biology as SOX10, PAX3, MITF-M isoform, TRP1 and TYR pointed similar expression patterns to HEM. Indeed we observed a decrease in the expression of all genes characteristic of pluripotency and self-renewal (OCT4, NANOG, SOX2) or in the expression of PAX6 and OTX2, confirming that this pigmented cell population was not retinal pigmentary epithelium . Immunostaining analysis confirmed the absence of OCT4, TRA1-81 and PAX6 expression in the mel-iPSC and mel-hESC nucleus as well as a correct nuclear localization of PAX3 and MITF and a cytoplasmic expression of TRP1, TYROSINASE (TYR) and Rab27.

Furthermore, FACS analysis after four passages revealed an absence of SSEA4 and TRA1-81 expression in mel-iPSC and mel-hESC compared to the control undifferentiated mel-iPS and mel-hESC. This analysis also showed that more than 80% of mel-iPSC and mel-hESC were TRP1- and MITF-positive just like the control culture of adult melanocytes.

Under those culture conditions, cells proliferated actively up to twelve passages and could be frozen and thawed at will, maintaining their morphology and their phenotype.

Melanocytes derived from pluripotent stem cells are functional.

To demonstrate their ability to produce and secrete melanin, melanosome transfer was evaluated by coculturing mel-iPSC or HEM with human adult keratinocytes (HK). After three days of coculture, melanosome transfers were detected into keratinocytes by a coimmunostaining of the protein TRP1 (expressed at the melanosomal membrane) and the keratin 14 (specifically expressed in keratinocytes). Arrayscan analysis showed that melanosomes were detectable in 20% of keratinocytes cultivated with mel-iPSC and 45% with HEM, whereas no TRP1 staining was detectable in HK cultivated without melanocytes.

Interestingly, after their transfer, melanosomes localization was in the peri-nuclear compartment of keratinocytes as it is expected to protect their DNA from ultraviolet radiations. Similar results were obtained with mel-hESC where 20% of melanized keratinocytes were detectable after three days of coculture.

Using a 3D organotypic system allowing the generation of melanized pluristratified epidermis we evaluated the functionality of either iPSC-derived or hESC-derived melanocytes in an in vitro physiological-like context. Thus we showed that the coculture of 90% keratinocytes (HK) and 10% melanocytes (mel-iPSC, mel-hESC and HEM) led to formation of a functional and melanized epidermis with correct homing of melanocytes in the basal layer and melanization of the upper layers of the epidermis composed by differentiated keratinocytes.

REFERENCES:

Amit, M. et al. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. Dev Biol 227, 271-278 (2000).

Del Rio M, Larcher F, Serrano F, Meana A, Muñoz M, Garcia M, Muñoz E, Martin C, Bernad A, Jorcano JL. A preclinical model for the analysis of genetically modified human skin in vivo. Hum Gene Ther. 2002 May 20;13(8):959-68.

Doucet O, Garcia N, Zastrow L Skin culture model: a possible alternative to the use of excised human skin for assessing in vitro percutaneous absorption. Toxicol In Vitro 12:423–430 (1998).

Fang D, Leishear K, Nguyen TK, Finko R, Cai K, Fukunaga M, Li L, Brafford PA, Kulp AN, Xu X, Smalley KS, Herlyn M. Defining the conditions for the generation of melanocytes from human embryonic stem cells. Stem Cells. 2006 Jul; 24(7):1668-77. Epub 2006 Mar 30.

Gache Y, Baldeschi C, Del Rio M, Gagnoux-Palacios L, Larcher F, Lacour JP, Meneguzzi G. Construction of skin equivalents for gene therapy of recessive dystrophic epidermolysis bullosa; Hum Gene Ther;; 15 (10): 921-33 (2004)

Guenou H, Nissan X, Larcher F, Feteira J, Lemaitre G, Saidani M, Del Rio M, Barrault CC, Bernard FX, Peschanski M, Baldeschi C, Waksman G. Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study. Lancet. 2009 Nov 21; 374 (9703):1745-53.

Hovatta O, Mikkola M, Gertow K, Strömberg AM, Inzunza J, Hreinsson J, Rozell B, Blennow E, Andang M, Ahrlund- Richter L. A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells. Human Reprod. 2003 Jul ; 18(7) : 1404-9.

Larcher F, Dellambra E, Rico L, Bondanza S, Murillas R, Cattoglio C, Mavilio F, Jorcano JL, Zambruno G, Del Rio M. Long-term engraftment of single genetically modified human epidermal holoclones enables safety pre-assessment of cutaneous gene therapy. Mol Ther. 2007 Sep;15(9):1670-6. Epub 2007 Jun 19.

Moreau, M., Leclerc C. The choice between epidermal and neural fate: a matter of calcium. Int. J. Dev. Biol. 48; 75-84 (2004).

Nakatsuji N, Nakajima F, Tokunaga K. HLA-haplotype banking and iPS cells. Nat Biotechnol 2008;26(7):739-40.

Poumay, Y. et al. A simple reconstructed human epidermis: preparation of the culture model and utilization in in vitro studies. Arch Dermatol Res 296, 203-211 (2004).

Rheinwald, J.G. & Green, H. Formation of a keratinizing epithelium in culture by a cloned cell line derived from a teratoma. Cell 6, 317-330 (1975).

Rheinwald, J.G. & Green, H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. Cell 6, 331-343 (1975).

Rose PT. Pigmentary disorders. Med Clin North Am. 2009 Nov; 93(6):1225-39.

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 Nov 30;131(5):861-72.

Taylor CJ, Bolton EM, Pocock S, Sharples LD, Pedersen RA, Bradley JA. Banking on human embryonic stem cells: estimating the number of donor cell lines needed for HLA matching. Lancet 2005;366(9502):2019-25.

Thomson JA ; J Itskovitz-Eldor ; SS Shapiro ; MA Waknittz ; JJ Swiergiel ; VS Marshall ; JM Jones. Embryonic stem cell line derived fron human blastocysts. “Science 282: (1998) 1145-1147

Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto, K, et al., Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. Science 318, 1917 – 1920 (2007)

Thomson JA ; J Itskovitz-Eldor ; SS Shapiro ; MA Waknittz ; JJ Swiergiel ; VS Marshall ; JM Jones. Embryonic stem cell line derived fron human blastocysts. “Science 282: (1998) 1145-1147.

Uong A, Zon LI. Melanocytes in development and cancer. J Cell Physiol. 2010 Jan; 222(1):38-41.

Yamane T., Hayashi S.-I., Mizoguchi M., Yamazaki H., Kunisada T. Derivation of Melanocytes From Embryonic Stem Cells in Culture. Developmental dynamics 1999. 216:450–458.

CLAIMS

1. An ex vivo method for obtaining a population of human melanocytes derived from human pluripotent stem cells comprising the step a) consisting of co-culturing human pluripotent stem cells with cells that support ectodermal differentiation in the presence of an agent that stimulates epidermal induction and an agent that stimulates terminal differentiation of keratinocytes.

2. The ex vivo method according to claim 1, wherein said cells that support ectodermal differentiation are feeder fibroblasts.

3. The ex vivo method according to claim 1 or 2, wherein said agent that stimulates epidermal induction is selected from the group consisting of BMP-2, BMP-4, BMP-7, Smad1, Smad5, Smad7 and GFD-6.

4. The ex vivo method according to any one of claims 1 to 3, wherein said agent that stimulates terminal differentiation of keratinocytes is selected from the group consisting of ascorbic acid and retinoic acid.

5. The ex vivo method according to any one of the preceding claims, wherein said human pluripotent stem cells are human embryonic stem cells (hES cells) or human induced pluripotent stem cells (hiPS cells).

6. The ex vivo method according to any one of the preceding claims, wherein said step a) is carried out for at least 35 days, preferably at least 40 days, even more preferably at least 45, at least 50, at least 55, at least 60, at least 65, at least 70 or at least 75 days.

7. The ex vivo method according to any one of the preceding claims, further comprising, after step a) the following steps:

b) isolating a pigmented cell from the population of cells obtained in step a);

c) culturing said isolated cell in an appropriate culture medium.

8. An isolated substantially pure homogenous population of human melanocytes derived from human pluripotent stem cells obtainable by the method according to any one of claims 1 to 7.

9. A pharmaceutical composition comprising the substantially pure homogenous population of melanocytes derived from human pluripotent stem cells of claim 8 and optionally a pharmaceutically acceptable carrier or excipient.

10. The isolated substantially pure homogenous population of human melanocytes derived from human pluripotent stem cells according to claim 8 or the pharmaceutical composition of claim 9 for use in a method of treatment.

11. A method of preparing a human skin substitute comprising a step consisting of providing an isolated substantially pure homogenous population of human melanocytes derived from human pluripotent stem cells according to claim 8 and a step consisting of providing a population of human keratinocytes.

12. A human skin substitute obtainable by the method according to claim 11.

13. A human skin substitute according to claim 12 for use in a method of treatment.

14. A method for screening compounds for a given biological effect on human melanocytes comprising the steps of:

i) incubating an isolated substantially pure homogenous population of human melanocytes derived from human pluripotent stem cells according to claim 8 in the presence or absence of a test compound;

ii) comparing said biological effect in the population of melanocytes in the presence or absence of said test compound.

15. Use of an isolated substantially pure homogenous population of human melanocytes derived from human pluripotent stem cells according to claim 8 or a human skin substitute according to claim 12 for screening compounds.

ABSTRACT OF THE INVENTION

The invention relates to an ex vivo method for obtaining a population of human melanocytes derived from human pluripotent stem cells comprising the step consisting of co-culturing human pluripotent stem cells with cells that support ectodermal differentiation in the presence of an agent that stimulates epidermal induction and an agent that stimulates terminal differentiation of keratinocytes. The invention also relates to human melanocytes obtainable by said method and to uses thereof in cell therapy and in screening assays.

II. Annexe 2 Revue publiée dans la revue Medecine/Science intitulée « Les cellules souches pluripotentes font peau neuve ».

MEDECINE/SCIENCES 2010 ; 26 : 5-41

NOUVELLE

Les cellules souches pluripotentes font peau neuve

Xavier Nissan, Gilles Lemaitre,
Marc Peschanski, Christine Baldeschi

Inserm/UEVE UMR-861, I-STEM, AFM,
Institut des cellules souches
pour le traitement et l'étude
des maladies monogéniques,
5, rue Henri Desbruères,
91030 Évry Cedex, France.
cbaldeschi@istem.fr

› Ces deux dernières décennies, les avancés technologiques effectuées dans le domaine de la thérapie cellulaire ont permis d'améliorer considérablement le pronostic vital des grands brûlés. À ce jour, le principal traitement disponible pour ces patients est l'autogreffe d'épiderme. Cette technique consiste à effectuer une biopsie cutanée de quelques mm^2 dans une zone saine, d'en isoler les progéniteurs kératinocytaires les plus immatures (souches), de les amplifier *in vitro* et de leur permettre de reconstituer un épiderme qui sera finalement greffé sur le patient [1]. L'inconvénient majeur de cette technique est le délai incompressible de trois semaines nécessaire à l'obtention d'une quantité suffisante de kératinocytes greffables. Durant cette période, les plaies du patient sont généralement recouvertes de peau prélevée sur des cadavres et décellularisée afin de limiter les risques de déshydratation et d'infection. Ces allogreffes peuvent toutefois entraîner des réactions immunitaires et elles sont disponibles en quantité limitée. Pour pallier ce manque, de nouveaux substituts ont été mis au point, telles que des matrices inertes ou biologiques contenant du collagène bovin et/ou des cellules de peau allogéniques [2]. Cependant, ces technologies ne permettent pas de s'affranchir du risque de rejet immunitaire et de transmission d'agents pathogènes.

Grâce à leurs capacités d'autorenouvellement et de pluripotence, les cellules souches embryonnaires humaines (CSEh) représentent une source illimitée de cellules dont la différenciation peut être induite « à la demande » dans l'ensemble des types cellulaires de l'organisme. La reconstitution d'un épiderme à partir de kératinocytes dérivés de CSEh représenterait donc une alternative thérapeutique à l'utilisation de ces pansements biologiques transitoires. Des études préalables ont montré que les CSEh et leurs dérivés présentaient un faible niveau d'expression d'antigènes majeurs du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité), laissant penser que la réponse de l'hôte contre le greffon pourrait être limitée ou retardée, permettant ainsi d'éviter le rejet du pansement [3]. Plusieurs équipes internationales ont essayé de transposer ce modèle à la recherche dermatologique. Ces travaux, dans un premier temps prometteurs, n'avaient cependant pas permis jusqu'alors d'aboutir à la genèse d'un épiderme fonctionnel. Notre équipe vient de publier un protocole de différenciation séquentielle qui permet de dériver - à partir de CSEh - une population pure et homogène de kératinocytes capables de reconstituer un épiderme pluristratifié aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* [4].

Un protocole de différenciation fondé sur la chronobiologie de l'ontogenèse

La réussite de notre équipe tient vraisemblablement en premier lieu à l'application d'un concept qui s'impose aujourd'hui progressivement dans toutes ces recherches, celui du respect de la chronobiologie observée durant l'ontogenèse. Cette prise en compte nous avait permis d'obtenir la différenciation de CSEh en neurones moyens-épineux GABAergiques du striatum [5]. Dans le cas de la peau, les protocoles testés précédemment s'appuyaient sur l'idée qu'une induction des CSEh limitée dans le temps permettrait d'orienter les cellules vers le lignage kératinocytaire ; notre démarche au contraire a été de maintenir le traitement par des cytokines et des agents pharmacologiques des cellules jusqu'à l'apparition du phénotype cellulaire recherché. L'engagement des CSEh dans le lignage épidermique a ainsi été rendu possible en combinant à la fois leur coculture en présence de cellules nourricières et un traitement pharmacologique de plus de 40 jours *(Figure 1A)*. Les CSEh ont été traitées avec de l'acide ascorbique et la protéine morphogène de type 4 (BMP4), et placées dans les conditions de cultures adaptées à la survie et à la prolifération de kératinocytes définies par les travaux *princeps* de Rheinwald et Green [6]. Nous avons suivi l'évolution du profil d'expression génétique des cellules au fur et à mesure du processus de différenciation et montré qu'elle respectait effectivement la chronobiologie du développement embryonnaire de la peau humaine. Dès les premiers jours, l'expression de la protéine SSEA3 diminue, suggérant la perte des capacités pluripotentes des CSEh *(Figure 1B)*. Au jour 10 de culture, parallèlement à l'acquisition d'une morphologie de type épithélial, les cellules expriment transitoirement la kératine 18, normalement exprimée

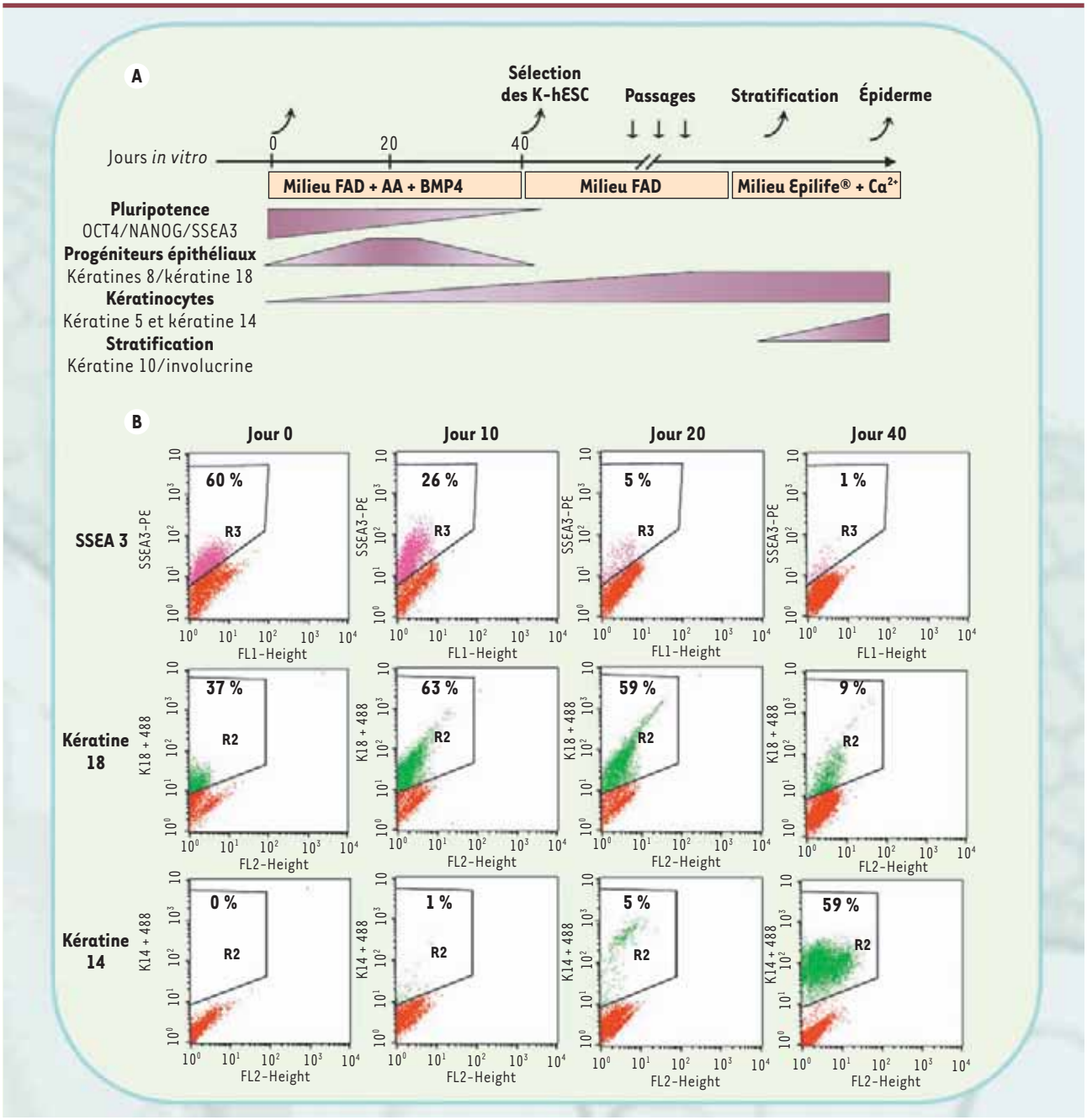


Figure 1. ***Processus de différenciation des cellules souches embryonnaires humaines en kératinocytes.*** Les CSEh sont différenciées en kératinocytes après 40 jours de traitement par différents agents pharmacologiques et par des cytokines mimant les signaux impliqués dans la formation de l'épiderme au cours du développement embryonnaire humain. On retrouve l'expression des marqueurs caractéristiques de chacune des étapes du développement ***(A)*** et une chute rapide des marqueurs de pluripotence (OCT4, NANOG et SSEA3), l'expression transitoire des marqueurs des progéniteurs épithéliaux (kératines 8 et 18), puis l'expression des marqueurs des kératinocytes basaux (kératines 5 et 14) et enfin ceux des couches supérieures de l'épiderme (la kératine 10 et l'involucrine). L'analyse par cytométrie de flux confirme qu'une fois le processus de différenciation enclenché, les CSEh perdent l'expression de SSEA3, expriment transitoirement la kératine 18 puis la kératine 14 ***(B)***. AA : acide ascorbique ; BMP4 : *bone morphogenetic protein 4* ; FAD : milieu de culture fait d'un mélange de milieu Dulbecco et Ham F12.

par les progéniteurs épithéliaux au cours du développement embryonnaire *(Figure 1B)*. Au jour 20, elles commencent à s'engager définitivement dans le lignage kératinocytaire et à exprimer la kératine 14 *(Figure 1B)*. Ce n'est toutefois qu'après 40 jours de traitement par BMP4 et l'acide ascorbique que l'ensemble des marqueurs caractéristiques des kératino-

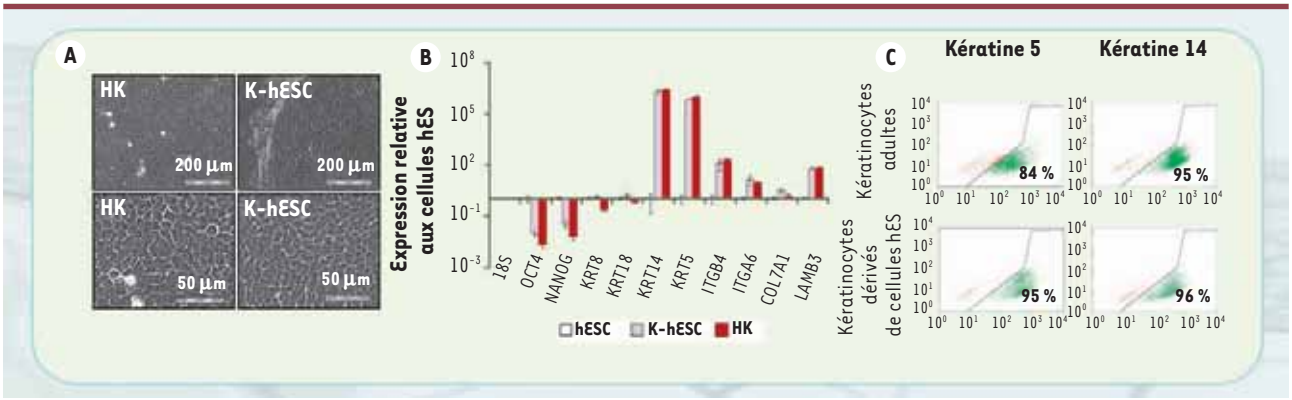


Figure 2. ***Établissement d'une population pure et homogène de kératinocytes dérivés de CSEh.*** Une fois le processus de différenciation terminé, des cellules présentant un phénotype similaire à celui des kératinocytes en culture peuvent être isolées et caractérisées. L'analyse par microscopie optique (à deux grossissements) montre que les kératinocytes dérivés des cellules souches embryonnaires (K-hESC) présentent une morphologie similaire à celle des kératinocytes adultes en culture ***(A)***, ainsi qu'un même profil d'expression de marqueurs (KRT : kératine, COL : collagène, LAM : laminine) ***(B)*** et une immunopositivité pour les kératines 5 et 14 ***(C)***.

cytes est identifié sur une population de cellules qui a pu être isolée et amplifiée. Ces cellules appelés K-hES pour « *keratinocytes-derived human embryonic stem cells* » présentent une morphologie en tout point similaire à celle des kératinocytes basaux adultes *(Figure 2A)*. Ces cellules n'expriment plus OCT4 et NANOG, les facteurs de transcription caractéristiques des CSEh ; en revanche, elles sont positives pour l'ensemble des marqueurs caractéristiques des kératinocytes, les kératines 5 et 14 (95 % de cellules positives), les chaînes alpha6 et bêta4 des intégrines et synthétisent des protéines de la matrice extracellulaire, dont le collagène de type VII et la laminine de type 5 *(Figure 2B* et *C)*.

La capacité de ces cellules à construire un épiderme pluristratifié a été mise en évidence *in vitro*, en ensemençant les cellules sur une matrice artificielle de polycarbonate ensuite placée à l'interface air/liquide pendant 10 jours. Dans ces conditions, les cellules poursuivent leur différenciation et forment un épiderme pluristratifié où l'on distingue l'ensemble des couches de l'épiderme humain *(Figure 3A)*. Nous avons ensuite réalisé des études de greffe *in vivo* chez la souris *(Figure 3B)*, préalable indispensable à une approche de thérapie cellulaire. Des épidermes dérivés *in vitro* de CSEh ont été greffés sur la région dorsale de souris immunodéficientes. Douze semaines après, le greffon présentait une architecture pluristratifiée similaire à celle d'une peau humaine adulte.

Une recherche fondamentale applicable à la clinique

Des CSEh différenciées en kératinocytes peuvent donc être utilisées comme source cellulaire pour la production d'un épiderme humain, expérimentalement du moins. Pour passer de cette preuve de concept à la clinique, nous avons bien sûr de nombreux défis à relever. Le premier est celui du changement d'échelle dont nous avons déjà eu l'occasion de présenter les différentes facettes dans ces colonnes [7]. Le second est celui de la sécurité du geste, qui se décline au moins selon deux axes, la tolérance immunitaire et le risque tumoral. En ce qui concerne ce dernier, il n'existe pas encore de réponse absolue mais la multiplication actuelle des demandes d'autorisation d'essais cliniques auprès des agences réglementaires démontre au moins que la question est désormais posée dans des termes qui n'excluent pas l'accès au patient. Pour ce qui est de la réponse immunitaire, l'espoir est grand de voir des cellules d'origine embryonnaire provoquer des réponses très limitées, ne serait-ce que parce que des cellules fœtales, un peu plus âgées, n'en ont pas elles-mêmes provoqué de massives [8].

Récemment, un nouveau type de cellules pluripotentes a vu le jour en offrant des perspectives quasi illimitées à la communauté scientifique internationale, les cellules appelées cellules souches « induites à la pluripotence (iPS) », cellules adultes reprogrammées présentant les mêmes caractéristiques de pluripotence et d'autorenouvellement que les CSEh. La création de centres de ressources biologiques inventoriant des kératinocytes dérivés d'iPS caractérisés et dont le phénotype CMH a été défini permettrait aux médecins de venir puiser, en fonction du besoin, des cellules présentant une combinaison de marqueurs du CMH compatible avec celle du malade en attente de greffe [9]. Nous proposerons d'utiliser ces lignées afin de produire des cellules de l'épiderme pour une thérapie cellulaire appliquée au traitement des grands brûlés mais également à d'autres pathologies cutanées telles que les génodermatoses ou les ulcérations qui, par exemple, sont une des complications chez un grand nombre de patients diabétiques. ◊

Pluristratified epidermis from human embryonic stem cells

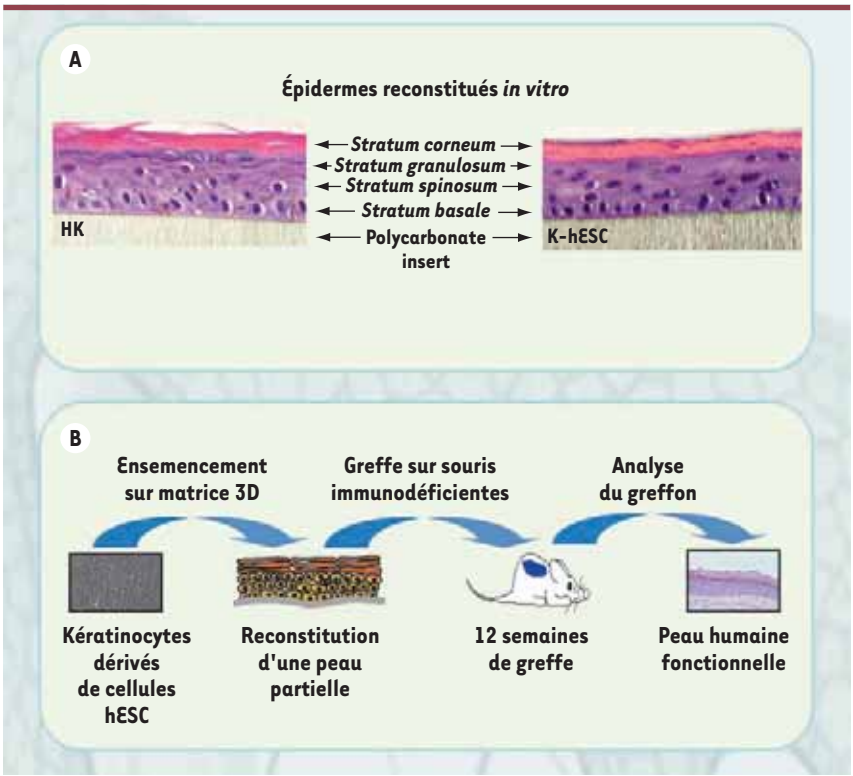


Figure 3. ***Construction d'un épiderme pluristratifié fonctionnel à partir de kératinocytes dérivés de CSEh in vitro et in vivo.*** Des kératinocytes adultes (HK) et des K-hESC ont ainsi été ensemencés en parallèle sur des matrices de polycarbonate. Après une première phase d'expansion de 48 h les cellules ont été placées à l'interface air/liquide afin d'induire leur stratification ***(A)***. Deux semaines plus tard, la coloration hématoxyline-éosine montre que les cellules K-hES sont capables de stratifier de la même façon que des kératinocytes adultes pour former l'ensemble des couches de l'épiderme ***(A)***. Des épidermes construits *in vitro* à partir de K-hESC ont été greffés chez des souris immunodéficientes ***(B)*** après avoir été ensemencés sur une matrice tridimensionnelle. Quatre mois plus tard, l'analyse de la xénogreffe confirme la présence d'une peau artificielle humaine fonctionnelle.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été soutenu par l'Institut national de la santé et de la recherche médicale (INSERM), l'Université Évry Val d'Essone (UEVE), l'Association française contre les myopathies (AFM), la Fondation René Touraine et Genopole.

CONFLIT D'INTÉRÊTS

Les auteurs déclarent n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Gallico GG, O'Connor NE, Compton CC, *et al.* Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N Engl J Med* 1984 ; 311 : 448-51.
2. Metcalfe AD, Ferguson MW. Bioengineering skin using mechanisms of regeneration and repair. *Biomaterials* 2007 ; 28 : 5100-13.
3. Taylor CJ, Bolton EM, Pocock S, *et al.* Banking on human embryonic stem cells: estimating the number of donor cell lines needed for HLA matching. *Lancet* 2005 ; 366 : 2019-25.
4. Guenou H, Nissan X, Larcher F, *et al.* Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study. *Lancet* 2009 ; 374 : 1745-53.
5. Aubry L, Peschanski M, Perrier AL. Les cellules souches embryonnaires humaines pour la thérapie cellulaire de la maladie de Huntington. *Med Sci (Paris)* 2009 ; 25 : 333-5.
6. Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 1975 ; 6 : 331-4.
7. Peschanski M. Cellules souches : l'heure venue du changement d'échelle. *Med Sci (Paris)* 2008 ; 24 : 335-8.
8. Touraine JL. Greffes de cellules souches et perspectives. *Revue Médicale Suisse* 2000 ; n° 701 (*online*).
9. Nakatsuji N, Nakajima F, Tokunaga K. HLA-haplotype banking and iPS cells. *Nat Biotechnol* 2008 ; 26 : 739-40.

Tarifs d'abonnement M/S - 2010

Abonnez-vous à Médecine/Sciences

> Grâce à *m/s*, vous vivez en direct les progrès des sciences biologiques et médicales

Bulletin d'abonnement page 110 dans ce numéro de *m/s*



III. Annexe 3: Revue publiée dans la revue Regenrative Medicine intulée « Epidermis grafting : From adult to embryonic stem cells ».

For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com

Epidermis grafting: from adult to embryonic stem cells

"[I-STEM] is a center for research and development, dedicated to the development of treatments based on the potential of pluripotent stem cells and their applicability to rare diseases of genetic origin."

Cell therapy has radically changed the lives of burn victims. For more than two decades, cell-culture techniques have been used in order to obtain a sufficiently large areas of skin to reconstruct the destroyed epidermis from a small sample harvested from the patients themselves [1]. Although this type of graft is used successfully, one of its limits is the 3 weeks required to produce a sufficient amount of epidermis to cover the affected areas, leaving the patient unprotected during this interval [2].

For several years, research has led to the development of skin substitutes to protect patients during the period before grafting. Standard temporary skin includes the use of cadaver skin or de-epidermized pig skin. Because of the burn victim's immune system activation, these types of grafts can potentially be rejected. For this reason, these biological tissues are only used as temporary biological wound dressings. Synthetic and biosynthetic matrices containing adult allogenic skin cells and bovine collagen are alternatively proposed without a guarantee of the necessary safety, especially in terms of graft rejection and presence of contaminants [3].

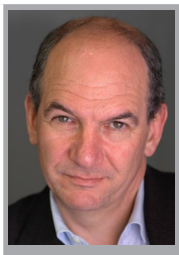
Rapid access to an unlimited source of epidermal cells from human embryonic stem cells (hESCs) that can reconstitute an epidermis, perfectly controlled in the laboratory before use, would therefore be one solution to the problems posed by existing techniques. In this context, researchers at the Institute for Stem cell Therapy and Exploration of Monogenic diseases (I-STEM; Evry, France), a laboratory of the French National Institute of Health and Medical Research (INSERM), have devised a pluristratified epidermis using keratinocyte-derived hESCs (K-hESCs).

I-STEM was opened on 1 January 2005. It is a center for research and development, dedicated to the development of treatments based on the potential of pluripotent stem cells and their applicability to rare diseases of genetic origin. Defined by three key phrases 'therapeutics', 'monogenic diseases' and 'pluripotent stem cells', the activity of I-STEM extends from basic biological research and pathological mechanisms up to the transfer of new therapies to clinical research.

"...the activity of I-STEM extends from basic biological research and pathological mechanisms up to the transfer of new therapies to clinical research."

The objective of this institute is the development of treatments intended for monogenic diseases, founded on the strong potential of stem cells for substitutive and regenerative therapies. A second objective of I-STEM is the development of cell models representative of pathologies on the basis of hESC lines, each carrying a mutant gene associated with a given disease. These should help elucidate mechanisms of pathogenesis and, consequently, reveal possible therapeutic targets. These models could also be used as a basis for screening compound libraries in order to discover new potential drugs.

In 2005, when G Waksman visited I-STEM to propose the creation of a dedicated team to develop a protocol of differentiation of ESCs towards epidermal lineage, he received the support of the French Biomedecine Agency, INSERM and the French association against myopathies (AFM). At this time, he headed a team whose work on adult keratinocytes led to the characterization of a plasma membrane protein marker of early progenitor keratinocytes from adult human skin [4]. The expertise of the team in adult stem cell research was naturally exploited and the first differentiation protocol was evaluated in 2007 using hESCs. hESCs have two essential characteristics: a capacity for unlimited proliferation capacity and pluripotency: the ability to differentiate into any cell type of the human body, especially cells of the epidermis.



Marc Peschanski
Author for correspondence: INSERM/UEVE U-861, I-STEM, AFM, Institute for Stem cell Therapy and Exploration of Monogenic diseases, 5 rue Henri Desbruères, 91030 Evry cedex, France
Tel.: +33 169 908 517
Fax: +33 169 908 521
mpeschanski@istem.fr

Gilles Lemaitre
INSERM/UEVE U-861, I-STEM, AFM, Institute for Stem cell Therapy and Exploration of Monogenic diseases, 5 rue Henri Desbruères, 91030 Evry cedex, France

Xavier Nissan
CECS, I-STEM, AFM, Institute for Stem cell Therapy & Exploration of Monogenic diseases, 5 rue Henri Desbruères, 91030 Evry cedex, France

Christine Baldeschi
INSERM/UEVE U-861, I-STEM, AFM, Institute for Stem cell Therapy and Exploration of Monogenic diseases, 5 rue Henri Desbruères, 91030 Evry cedex, France

future medicine part of fsg

The transformation of hESCs into epidermal cells was made possible by a combination of cell biology and pharmacological approaches. hESCs were seeded on feeder cells using a culture medium supplemented with bone morphogenic protein 4 and ascorbic acid. This treatment was maintained for 40 days, time that is normally required for an embryo to form its epidermis [5]. By applying this concept of respecting the chronobiology, the hESCs engaged in this differentiation process first acquired the markers of a simple epithelium and then finally those of the keratinocytes.

Once placed on an artificial matrix, keratinocytes derived from hESCs were able to form a pluristratified epidermis replicating normal human epidermis *in vitro*. In order to verify the functional capacities of hESC-derived epidermis under physiological conditions, keratinocytes derived from hESCs were grafted onto mice in collaboration with a Spanish research team [101]. For this purpose, immunodeficient mice were used to avoid graft rejection and were analyzed 12 weeks after transplantation. Results published from this study showed that grafted mice exhibited a completely normal and functional human pluristratified epidermis consistent with a mature epidermis.

> "*The objective of this institute is the development of treatments intended for monogenic diseases, founded on the strong potential of stem cells for substitutive and regenerative therapies.*"

The I-STEM team is currently the only one to have succeeded in finalizing a protocol making it possible to transform hESCs into a pure, homogenous and unlimited source of keratinocytes and able to reconstitute an epidermis both *in vitro* and *in vivo*.

The next step to produce a ready-to-use, temporary skin substitute would be to obtain a quality controlled product, produced in Good Manufacturing Protocol (GMP) conditions at all stages from derivation to safe delivery, especially by the demonstration that hESC-derived cells lack any tumorigenic capacity.

In this study, we also demonstrated that K-hESCs express little if any of the MHC antigen, certainly due to their early developmental stage. Such a result suggests an intrinsic low immunogenicity potential and, we hope, a relative immunological tolerance of the hESC-derived skin substitute during the 3-week time period of its use in patients. However, the complete demonstration of this point will be to evaluate the immune status in the longer term – whether MHC antigen expression increases as the graft matures. Encouraging data showed that skin cells obtained from fetuses following abortion – which also express very low MHC class I antigens – were successfully used for long-term treatment and presented no sign of rejection up to 21 months [6]. However, in parallel with this work, the I-STEM team will also use adult cells, which can be selected for MHC antigens that are likely to match patients, induced to pluripotency and then differentiated into keratinocytes. Another way to avoid potential MHC immunogenicity would be to use banks of cell lines preselected to represent a majority of all possible MHC antigen combinations in a population.

Human diversity, in terms of human leukocyte antigen (HLA) antigens, is mostly due to the expression of the two alleles for HLA-A, -B and -DR. Statistically, this leads to a potential set of different haplotypes in the 100 million ranges. However, one may technically reduce this diversity by choosing donors who are haplotypically homozygous for HLA-A, -B and -DR ('triple homozygous'). Using triple homozygous cell lines, one may transplant 'hemi-similar' cells in patients who express those three A, B and DR alleles and any other triplet.

Theoretical calculations have shown that a HaploBank containing only triple homozygous may meet the needs for a large majority of the analyzed populations with only a handful of well-selected cell lines [7,8]. Preliminary analyses for the French population shows that only two triple homozygous cell lines (A-1, B-8, DR-3 and A-3, B-7 and DR-7, respectively) would be sufficient for probably over 20% of the recipients. Interestingly, the first one was also number one in the UK. Registries of voluntary donors for bone marrow transplants contain over 0.5% haplotypically homozygous people. Because populations differ from one country to another in the proportion of represented haplotypes, the building of a HaploBank of cell lines capable of meeting the needs of people worldwide would be best obtained through a unified, well-coordinated effort such as the one that allowed the success of the Human Genome Project.

A cell line with the best-matching MHC antigen profiles for a specific patient, and therefore carrying a minimal risk of incompatibility with the recipient's MHC profile, could be induced to pluripotency for keratinocyte differentiation for implantation.

These cells can be proposed as a biological dressing to treat burn victims, but also to treat other skin diseases: genetic disorders of the skin such as epidermolysis bullosa (they are characterized by a detachment of the epidermis, resulting in large scars) and chronic leg ulcers.

The use of classical epidermal graft therapy will be completed by a trial using the ReCell® device from Avita Medical Ltd. This system, which produces spray-on skin, would be combined with keratinocytes derived from pluripotent stem cells in order to induce re-epithelialization by stimulating the proliferation and migration of resident epidermal cells.

One complementary application of the protocol that we have identified, which is likely as important as cell therapy, is the *in vitro* modeling of human epidermis for *in vitro* studies by industry. The pharma industry will develop models for predictive toxicology and drug discovery, based upon well-characterized, perfectly reproducible human biological resources that can be produced and differentiated at will. The cosmetic industry is currently developing *in vitro* assays for its products, in particular because of the pressure against animal use and the requirement for testing each and any of its ingredients. Selected donors expressing genotypes of interest – either for expressing genetic polymorphisms or else particular diseases – may provide banks of cell lines for specific studies.

While many other cell types than keratinocytes have been obtained over the past few years, epidermis is, to our knowledge, the first tissue that hESCs have been shown to rebuild in a full *in vitro* setup. The demonstration that those differentiated cells placed in the right experimental conditions can spontaneously organize such a complex pluristratified epithelium is encouraging in view of the development of other organs, if biomaterials can be obtained that reproduce the desired shape in order to offer a scaffold for cells of the right phenotypes. Examples of such prospects for tissue engineering include blood and lymph vessels or the bladder, and even potentially more complex structures such as kidney tubules and nephrons. This would open a new stage in regenerative medicine, moving forward from cell to tissue engineering and therapy.

Financial & competing interests disclosure

The authors have no relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Bibliography

1 Green H: The birth of therapy with cultured cells. *Bioessays* 30, 897–903 (2008).

2 Gallico GG 3rd, O'Connor NE, Compton CC, Kehinde O, Green H: Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N. Engl. J. Med.* 311, 448–451 (1984).

3 Metcalfe AD, Ferguson MW: Bioengineering skin using mechanisms of regeneration and repair. *Biomaterials* 28, 5100–5113 (2007).

4 Lemaitre G, Gonnet F, Vaigot P *et al.*: CD98, a novel marker of transient amplifying human keratinocytes. *Proteomics* 5, 3637–3645 (2005).

5 Guenou H, Nissan X, Larcher F *et al.*: Human embryonic stem-cell derivatives for full reconstruction of the pluristratified epidermis: a preclinical study. *Lancet* 374, 1745–1753 (2009).

6 Hohlfeld J, de Buys Roessingh A, Hirt-Burri N *et al.*: Tissue engineered fetal skin constructs for paediatric burns. *Lancet* 366, 840–842 (2005).

7 Nakatsuji N, Nakajima F, Tokunaga K: HLA-haplotype banking and iPS cells. *Nat. Biotechnol.* 26, 739–740 (2008).

8 Taylor CJ, Bolton EM, Pocock S *et al.*: Banking on human embryonic stem cells: estimating the number of donor cell lines needed for HLA matching. *Lancet* 366, 2019–2025 (2005).

Website

101 CIEMAT – CIBER-ER, Epithelial Biomedicine Division, Avenida Complutense, 22 E-28040, Madrid, Spain www.ciemat.es/portal.do?IDM=243&NM=3

IV. Annexe 4: Article publié dans la revue Tissue engineering intitulée « Improvement of Culture Conditions of Human Embryoid Bodies Using a Controlled Perfused and Dialyzed Bioreactor System »

TISSUE ENGINEERING: Part C
Volume 14, Number 4, 2008
© Mary Ann Liebert, Inc.
DOI: 10.1089/ten.tec.2008.0029

Improvement of Culture Conditions of Human Embryoid Bodies Using a Controlled Perfused and Dialyzed Bioreactor System

Julien Côme, M.S.,* Xavier Nissan, M.S.,* Laetitia Aubry, M.S., Johana Tournois, B.S., Mathilde Girard, Ph.D., Anselme L. Perrier, Ph.D., Marc Peschanski, M.D., Ph.D., and Michel Cailleret, M.S.

In parallel to the active search for therapeutic and industrial applications of human embryonic stem cells (hESCs), designing automated means of producing those cells is a timely goal. Slow-turning lateral vessels (STLVs) with low shear stress have shown promise for expanding the cells at the embryoid body stage. We have improved this technology by developing two complementary systems, allowing continuous optimization of the culture conditions. First, perfused STLV bioreactors were set up, to provide continuous delivery of culture medium to the cells growing in the rotating chamber. This allowed the external control of the culture medium, and consequently optimized oxygenation, pH, nutrient supply, and waste elimination. Second, a dialysis chamber was adapted. This led to a further enhanced controlled environment and a decrease in the quantity of adjunct products (e.g., growth factors) necessary to the cells inside the bioreactor chamber. hESC aggregation and initial differentiation—taking neural induction as an example—were compared between the perfused and dialyzed STLV system and static cultures. Perfused and dialyzed STLV bioreactors promoted formation of embryoid bodies that were differentiated more rapidly and were homogeneously synchronized in a statistically significant manner.

Introduction

Because of their two fundamental attributes of unlimited expansion and pluripotency, human embryonic stem cells (hESCs) have gained considerable interest for use in cell replacement therapy, as well as in drug discovery (see [1–3]).

Fulfilling these promises requires, however, making full usage of both capacities of hESCs for unlimited expansion and pluripotency. For that purpose, these two abilities have to be translated into technological platforms for cell production and controlled differentiation. Conventional stirrer vessels have the disadvantage of generating shear forces, and although manageable, these forces still damage the cells. Low-shear-stress bioreactors exist, and pioneer demonstration has been given of mass production of embryoid bodies derived from human embryoid bodies (hEBs).[4] This success relied on specific techniques used to ensure dynamic, yet mild, suspension conditions to control the aggregation processes of differentiating hESCs.

Building upon these recent developments, the present study was undertaken to promote optimizations required for therapeutic or industrial implementation of hESC progeny production, focusing on the precise control and reproducibility of cell culture conditions. Fine tuning and maintenance of cell culture conditions is a requisite for traceability of industrial processes and safety of clinical-grade cell therapy products.[5,6] Our first goal was therefore to make the closed chambers of the bioreactors fully accessible to external analysis and to addition of exogenous product, in order to provide a workable platform for implementation of any requested control and medium adaptation, without any disruption of dynamic cell suspension. In addition, our study addressed the complementary issue of the renewal of large quantities of culture medium over time. Cell production in bioreactors requires a large volume of culture medium and, in parallel, increases considerably the amount of adjunct product, some of which—particularly cytokines—are expensive.[7,8] Accordingly, our second goal in this study was the development of a system that would allow costs to be reduced by limiting the amount of adjunct product to the desired concentration in the strictly limited, necessary volume of medium.

We propose here technological developments that have been tested on a rotating slow- turning lateral vessel (STLV) and evaluated on the neural differentiation path but may be adapted to any type of low-shear-stress bioreactor or initial steps of hESC differentiation.

INSERM/UEVE U 861, I-STEM, AFM, Evry, France.
*These two authors contributed equally to this study.

Methods

hESC culture

The hESC lines VUB01 derived at the Vrije Universiteit Brussels,[9] SA01 distributed by Cellartis (Sweden), H9 (WA09, WiCell Research Institue), and HUES-9 octamer (*OCT*)-4GFP, in which green fluorescent protein (GFP) is under the control of the full-length POU5F1 (*OCT-4*) promoter, kindly given by Chad Cowan (Harvard Stem Cell Institute), were used during this study. Cells were maintained on a feeder layer of mitomycin C-inactivated murine Sim's Thioguanine Ouabaine–resistant fibroblasts in knock-out (KO)–Dulbeccos' modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 20% KO serum replacement, 1 mM L-glutamine, 0.1% penicillin/streptomycin, 1% non-essential amino acids, and 4 ng/mL fibroblast growth factor-2 (FGF2) (all from Invitrogen, Cergy, France). Culture medium was changed by half daily, supplemented with 8 ng/mL FGF2. For passaging, cells were harvested using collagenase type IV (1 mg/mL, 5 min) and gently scraped with a plastic pipette. To separate isolated cells from feeder cells and clumps a passive sedimentation was performed and hESCs were then filtered through a 70 μm cell strainer (Beckton Dickinson, Le-Pont-de-Claix, France) was performed to calibrate the aggregate's size. hESCs were re-suspended and seeded at a 1:5 ratio in a 300-cm^2 flask.

After 7 days, approximately 50 million undifferentiated hESCs per flask were harvested using 5 mL of collagenase type IV and dispase I (at 1 and 0.3 mg/mL, respectively) at 37°C, 5% carbon dioxide (CO_2) for 20 min. After elimination of remaining feeder cells using 100-μm filtration, hESC colonies were broken into small clumps and filtered again onto a 70-μm cell strainer before size control under the microscope.

hESCs were seeded in the bioreactor chamber at approximately 0.5 million cells per mL in hESC medium without FGF2. The bioreactor was set to rotate at 12 rpm, and the speed was increased daily by 1 rpm to a plateau at 20 rpm. The perfusion flow was set to renew all medium in the chamber within 24 h (10 rpm). Control hEBs formed under static culture conditions (SCC) were seeded at the same concentration to obtain the same rate of aggregation; medium was replaced by half daily.

STLV bioreactors: set-up and function

The perfused STLV system (Fig. 1) included an autoclaved 55-mL-wide chamber, variable speed motor drives with tachometers, a culture tank, a peristaltic pump, and a silicone membrane oxygenator (all from Synthecon, Cellon SA, Bereldange, Luxembourg). All components were connected using flexible silicone tubing. The medium outlet used was covered using a dialysis membrane with a 100-kDa–molecular weight cut-off at the inner cylinder of the perfused STLV to keep cells out.

Culture conditions were controlled online by connection of the medium used at the outlet of the STLV to a Bioprofile 400 (Nova Biomedical, les Ulis, France), allowing non-invasive follow-up of the culture parameters. Online analysis was performed for pH, partial pressure of oxygen (O_2), partial pressure of CO_2, osmolarity, concentration of glutamine, glutamate, glucose, lactate, sodium, potassium, and ammonium. The analyzer was programmed to initiate calibration cycles at regular intervals every 6 h.

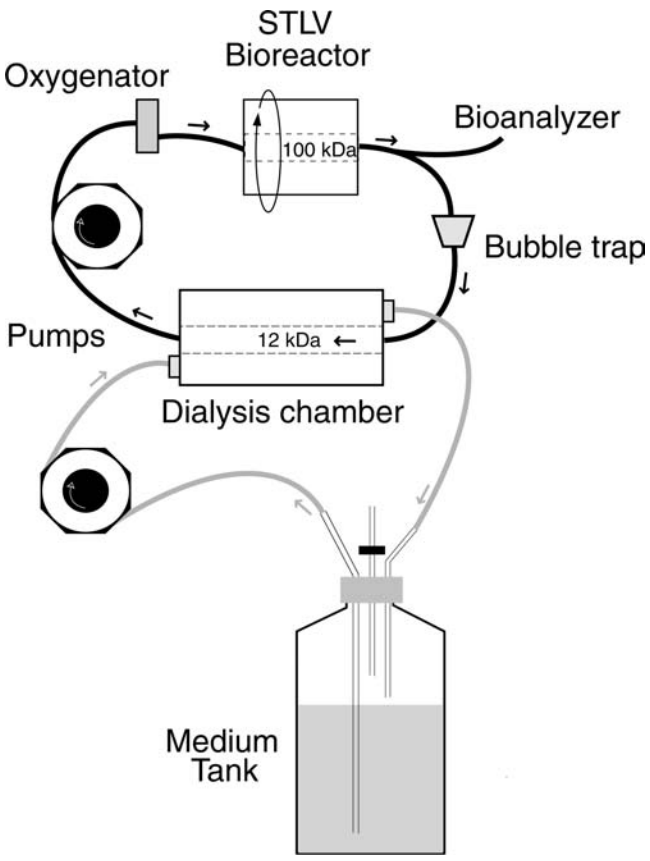


FIG. 1. Diagram of the perfused and dialyzed slow-turning lateral vessel (STLV) bioreactor. The dialysis loop (in grey) comprises the medium tank, a pump, and the outer part of the dialysis chamber equipped with a semi-permeable membrane. The culture loop (in black) comprises the STLV bioreactor, a pump, an oxygenator, a bubble trap, a bioanalyzer, and the inner part of the dialysis chamber. Only the STLV chamber rotates.

For EB sampling, the rotating vessels were stopped and placed on a clean bench to allow the cell aggregates to settle and were taken away by pipetting. hEBs were individually and randomly retrieved from the chamber of the STLV bioreactor or control SCC after 2, 4, and 8 days. Mixed samples were also retrieved on the same days. For retrieval from the STLV chamber, 500 μL of medium was retrieved and the hEBs filtered out using a 70-μm-pore nylon cell strainer (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France). The strainer was rinsed with phosphate buffered saline (PBS) to deliver the EBs to a Petri dish. Resulting aggregates were individually collected under a stereomicroscope and each placed in 100 μL of RNeasy Lysis buffer (RLT) (Qiagen, Courtaboeuf, France). Mixed samples were formed using the remaining non-individually collected filtered aggregates; they were centrifuged (900 rpm, 1 min) and collected in 1 mL RLT.

Neural differentiation protocols

Differentiation of the H9 cell line along the neural lineage was performed in two different manners. First, hEBs produced in STLV conditions were plated after 6 days of aggregation onto poly-ornithine/laminin-coated (POL) culture

Table 1. Variations over Time in the Culture Medium in the Culture Loop of the System Described in Figure 1

	Batch 1		*Batch 2*		*Batch 3*	
	Means	*SD*	*Means*	*SD*	*Means*	*SD*
pH	7.27	0.025	7.24	0.054	7.25	0.052
pCO_2 mmhg	33.7	1.6	34.5	2.3	34	2.4
pO_2mmhg	129.7	10.4	130.5	12.1	128.9	14.7
mOsm/kg	334	34	345	18.6	350	17.5

Four physicochemical parameters were measured twice a day between day 0 and day 10. Variations of the physical parameters are presented as means ± standard deviations.

dishes in DMEM/F12 with N2 supplement. Second, neural progenitors were obtained from undifferentiated hESCs by co-culture with MS5 stromal cells, as described previously.[10] In both protocols, morphologically identified neural rosettes were isolated mechanically for analysis ($n = 4$).

Real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction

Total RNA was isolated from hESCs (undifferentiated) and hEBs (differentiated) using RNeasy extraction kits (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. Quality and concentration of RNA were checked using the Nanodrop technology. Reverse transcription was performed using the Superscript II reverse transcription kit (Invitrogen).

For all samples, including isolated hEBs, real time reverse transcriptase polymerase chain reaction (PCR) was performed using a Chromo4 real-time system (Bio-Rad, Marne la Coquette, France) and SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystsem, Courtaboeuf, France) following the manufacturer's instructions. Quantification of gene expression was based on the cycle threshold value calculated using Opticon Monitor software (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Melting curve and electrophoresis analysis were performed to control PCR product specificities and exclude non-specific amplification. PCR primers are listed in Supplemental Table 1 (available online at www.liebertonline.com/ten). Samples were normalized against βTubulin. Experiments were normalized with reference to undifferentiated

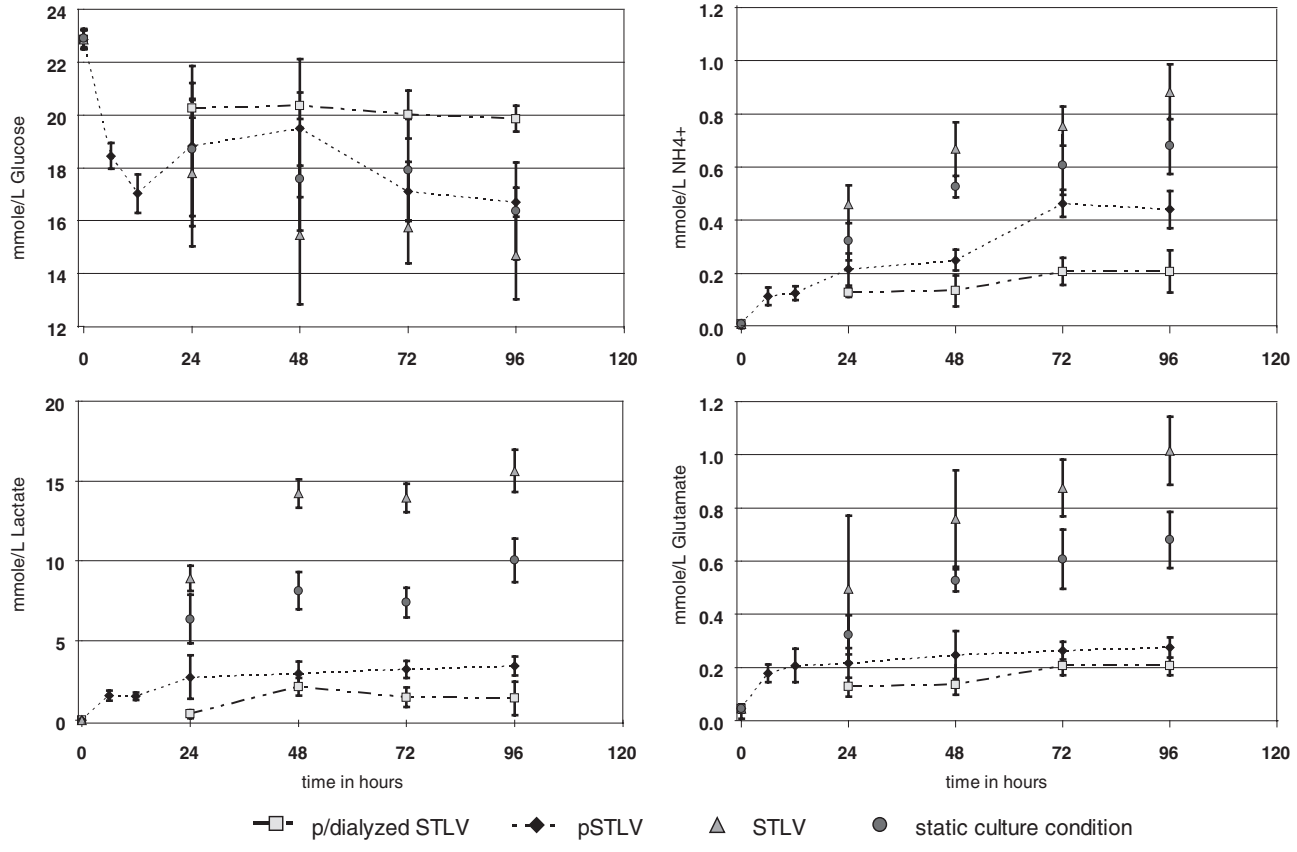


FIG. 2. Concentrations of glucose, ammonium ($NH4^+$), lactate, and glutamate in the culture medium between day 0 and day 4 of differentiation. Analyses were performed on perfused and dialyzed slow-turning lateral vessels (STLVs) (■), perfused STLVs (◆), STLVs (▲), and under static culture conditions (●). The data are presented as means ± standard deviations ($n = 3, 3, 6$, and 6, respectively). Dotted lines indicate analyses performed by the bioanalyzer on samples directly retrieved on-line. For other results, samples were retrieved manually and analysis performed secondarily using the bioanalyzer.

hESCs or to human fetal brain (Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines, France).

Fluorescence-activated cell sorting analysis

Hues-9 POU5F1/GFP EBs obtained in SCC or perfused and dialyzed STLV were enzymatically dissociated with TrypleSelect (Invitrogen) for 15 min at 37°C, washed, and resuspended in 1 mL fluorescence-activated cell sorting (FACS) buffer (2% FBS in PBS). Cells were probed for 30 min at 4°C with monoclonal r-phycoerythrin-mouse anti-human CD 56 (N-CAM) Clone B159 or r-phycoerythrin-isotype control (R&D systems, Lille, France). Stained cells were then analyzed in duplicate on a FACScalibur flowcytometer using CellQuest software (BD Biosciences, France).

Immunocytochemistry

Cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min at room temperature before blocking and permeabilizing with 2% PBS, 0,1% bovine serum albumin, and Triton X-100. Primary antibodies were incubated overnight at 4°C in blocking buffer, including rabbit polyclonal antibodies raised against PAX6 (Covance, Eurogenetec, Angers, France), mouse monoclonal antibodies raised against OCT-4 (Chemicon, St. Quentin en Yuelines, France), N-CAM clone Eric1 (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA), and class III–tubulin (Tuj1, Covance). Cells were then stained with the appropriate fluorophore-conjugated secondary antibody and 4′,6-diamidino-2-phenylindole.

Statistical analyses

Statistical analysis was performed using Analyse-it General Statistics (Analyse-it Software, Ltd, Leeds, UK). Values are presented as means ± standard deviations.

A Fisher test was performed to compare variance in samples. The statistical significance level of a difference between data sets was determined using the Student *t*-test when the Fisher test was positive; Welch *t*-test was applied (indicated in the text by Welch's approximation) when it was not.

Results

The optimized perfused and dialyzed STLV consists of two loops of medium perfusion. The first cell-perfusion loop feeds the bioreactor. Protein complementation of the medium is performed at this level. The perfusate goes though the STLV chamber equipped with a 100-kDa-molecular-weight-cut-off (MWCO) semi-permeable membrane. The second loop consists of a dialysis chamber (200 mL) with an inner cylinder covered by a dialysis membrane with a 12-kDa MWCO connected to a large medium tank. The function of the dialysis chamber is to dilute the dialysate with fresh medium. It enhances waste elimination and nutrient supply by exchange between the two compartments of the dialysis chamber through the 12 kDA MWCO semi-permeable membrane. Two pumps control the cross-flow of the two perfusion loops independently to provide full medium renewal within 24 h. Because of on-line analysis, a bubble trap has been added on the first loop to avoid pump failure while retrieving medium for analysis (Fig. 1).

Effectiveness of the dialysis chamber on the maintenance of culture conditions

To validate the effectiveness of this system, we first measured physicochemical parameters over 10 days of EB culture (Table 1), namely pH, osmolarity, and partial pressure of CO_2 and O_2. All these parameters are indirect indicators of homeostasis, glucide, and respiratory and ionic metabolism and together reveal the mass transfer capacity of the system. The results obtained indicated a robust stability for all parameters over time in the culture chamber.

Figure 2 summarizes the results of successive analyses in the culture medium of concentrations of glucose, glutamate, ammonium (NH_4), and lactate.

Results obtained under SCCs and non-perfused STLV were similar, showing on the second day a progressive decrease in glucose concentration and a rapid parallel increase in cell waste, with lactate reaching close to 7.5 and 14 mmol/L for SCC and STLV, respectively, and NH4 doubling up to 0.6 mmol/L. Daily change of half of the medium after the second day of culture under SCCs stabilized those parameters at the levels of the second day.

In sharp contrast, addition of continuous perfusion to the STLV better stabilized concentrations over time at levels compatible with cell culture.[11] Glucose concentration followed the same evolution as under SCCs and non-perfused STLV. By contrast, most parameters indicative of cell waste increased in the medium only over the first 24 h. Glutamate and lactate then remained stable for up to 4 days, at 0.2 and 4 mmol/L, respectively. NH_4 doubled again within 48 h to reach a plateau at 0.4 mmol/L, Addition of a dialysis cham-

Table 2. Cell Viability of Embryoid Bodies (EBs) Produced in the Different Culture Conditions (H9 Line)

	DAY 0		*DAY 7*		*DAY 14*	
	Means %	*SD %*	*Means %*	*SD %*	*Means %*	*SD %*
p/dialyzed STLV	98,8	0,2	88,1	10,6	71,4	12,6
STLV			88,0	8,5	57,9	14,3
pSTLV			92,6	14,7	68,4	15,6
SCC			77,0	8,6	55,9	7,7

Cell viability assays were performed using the live/dead viability cell kit from Invitrogen on day 7 and day 14 for each condition (static culture condition (SCC), slow-turning lateral vessel (STLV), perfused STLV, and perfused and dialyzed STLV) and following the manufacturer's protocol. Analyses were performed in triplicate. For the SCC and non-perfused STLV condition, the medium was changed by half every other day.

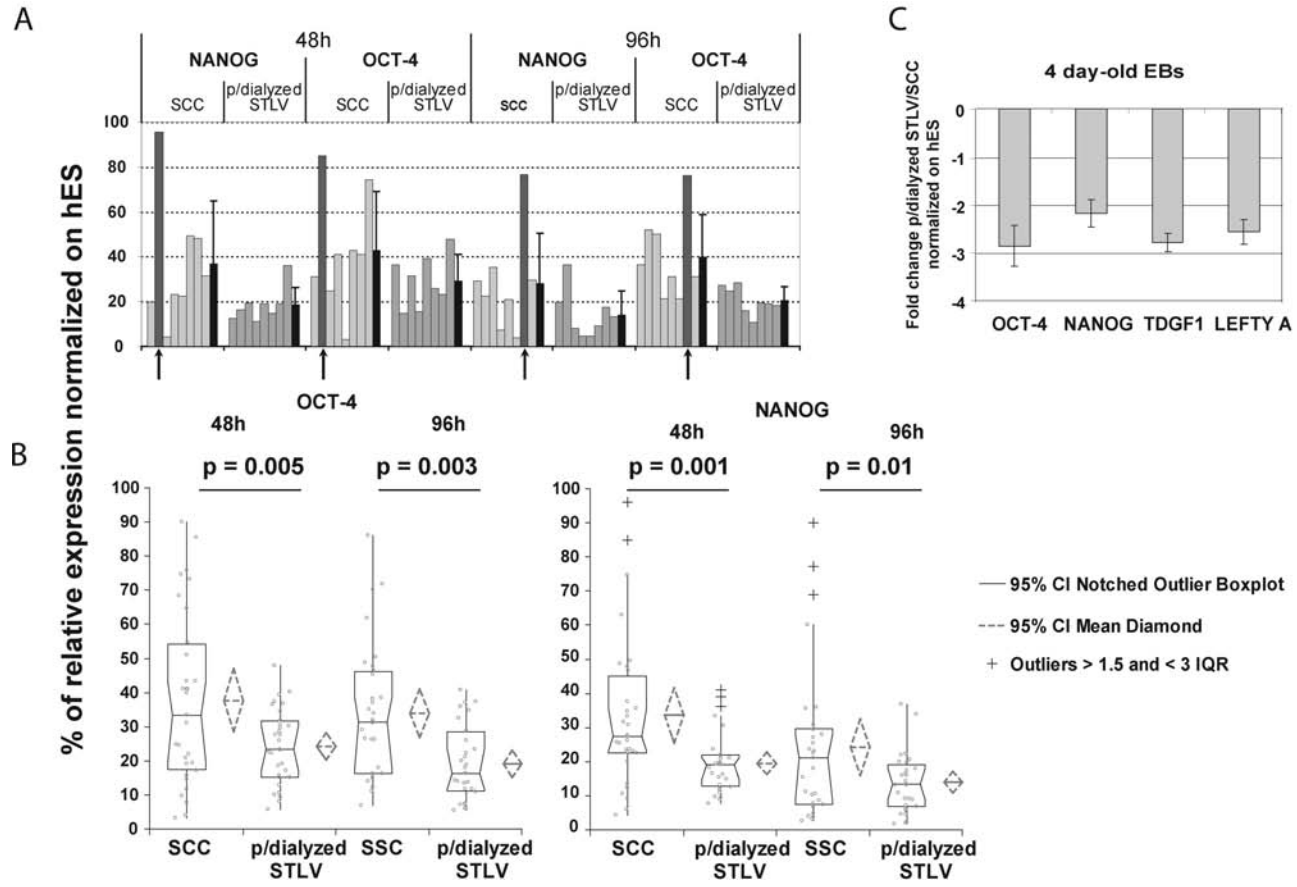


FIG. 3. Quantitative polymerase chain reaction of relative octamer-*4* and *NANOG* gene expression in embryoid bodies (Ebs) at 48 and 96 h (VUB-01 line). (**A**) Distribution represented in plot boxes of variance analyses of relative levels of octamer-*4* and *NANOG* expression in individualized EBs ($n = 32$ for each condition). *P*-values were obtained using the *t*-test after Welch correction. (**B**) Typical gene expression profiling in individual EBs. Arrows indicate an EB in which gene expression had remained comparable with that that in undifferentiated human embryonic stem cells (hESCs). Black columns show the mean values for each series. *P*-values were obtained using the *t*-test after Welch correction. (**C**) Quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of EB mixes for stemness markers (*OCT-4*, *NANOG*, teratocarcinoma derived growth factor-*1* and *LEFTY A*) at 96 h, expressed in fold change, perfused and dialyzed slow-turning lateral vessel (STLV) conditions versus static culture conditions, after normalization on βTubulin and hESC level. Data are presented as means ± standard deviations ($n = 3$). Fold changes are indicated for one-tailed one-way *t*-test with $p \leq 0.01$.

ber to the perfused STLV systematically improved all culture parameters. Glucose concentration remained at approximately 20 mmol/L up to 4 days (i.e., ~25% than in the non-dialyzed system). In parallel, all indicators of cell waste were half those of the non-dialyzed system. Lactate was in the mmol range at all times, and glutamate and NH_4 were at approximately 0.2 mmol/L. Cell viability was similar at day 14 in perfused and in perfused and dialyzed STLV, better than in non-perfused STLV and under SCCs (Table 2).

Effect of simulated microgravity on hESC differentiation

Two main features of the differentiation of hEBs were analyzed to compare results obtained using SCCs and the perfused and dialyzed STLV, namely the decrease in expression of markers of the undifferentiated stage and the increase in expression of markers of differentiation, specifically focusing on the neural lineage. For the undifferentiated stage, we chose *NANOG* and *OCT-4*, two transcription factors associated with the undifferentiated hESC stage, and the controls *TDGF1* and *LEFTY A* that also participate specifically to this stage.[12,13] Analysis of neural differentiation roughly distinguished two stages: an earlier one characterized by expression of *FGF5*, *SIX3*, *SOX1*, and *PAX6*, and later *Nestin*, CD56/N-CAM, *MAP2*, and TUJ-1.

In addition, we determined the course of expression of E-cadherin, because it has been shown to peak during the phase of aggregation and then to decrease transiently before increasing again during formation of three germ layers.[14,15] This specific time course of expression was used to mark the effectiveness of induction and the completeness of differentiation.

In the analysis of 32 randomly retrieved individual hEBs, expression of *NANOG* and *OCT-4* statistically significantly decreased more rapidly in perfused and dialyzed STLV than under SCCs at 48 and 96 h (Fig. 3A, B). This enhancement was also significantly more homogeneous in perfused and dialyzed STLV, and no undifferentiated stage patterning

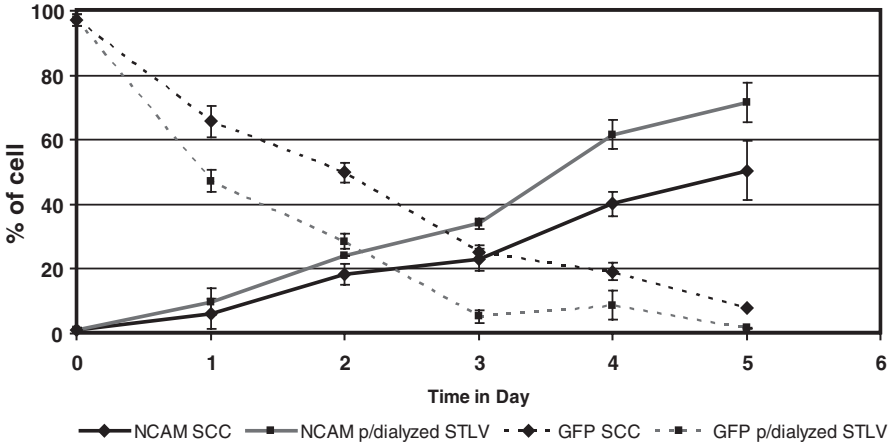


FIG. 4. Progression toward three-germ-layer stage from static culture conditions (◆) and perfused and dialyzed slow-turning lateral vessel (■) cultures in embryoid bodies (octamer (OCT)-4/green fluorescent protein (GFP) Hues-9 line). The determination of induction and progression of differentiation was performed by control of percentage of total population expressing GFP under OCT-4 full-length-promoter expression (dotted lines) and neural cell adhesion molecule (dark lines) monitoring usng flow cytometry over the first 5 days. Data are shown as means ± standard deviations ($n = 3$).

resulting in defective aggregation contrary to SCCs was seen (black arrows in Fig. 3B). These observations were confirmed with another cell line, SA-01 (Supplemental Fig. 1, available online at www.liebertonline.com/ten).

Comparison of mixes of 4-day-old hEBS showed that all markers of the undifferentiated stage were at least half those in perfused and dialyzed STLV than under SCCs (one-way Student *t*-test perfused and dialyzed STLV/ SCCs with $p < 0.01$, $n = 3$) (Fig. 3C). Those results were confirmed using FACS analysis on cells expressing GFP under the control of the promoter of *OCT-4*, which showed a 24-h delay in the differentiation kinetics at the earliest time-points for the perfused and dialyzed STLV conditions compared with SCCs (Fig. 4).

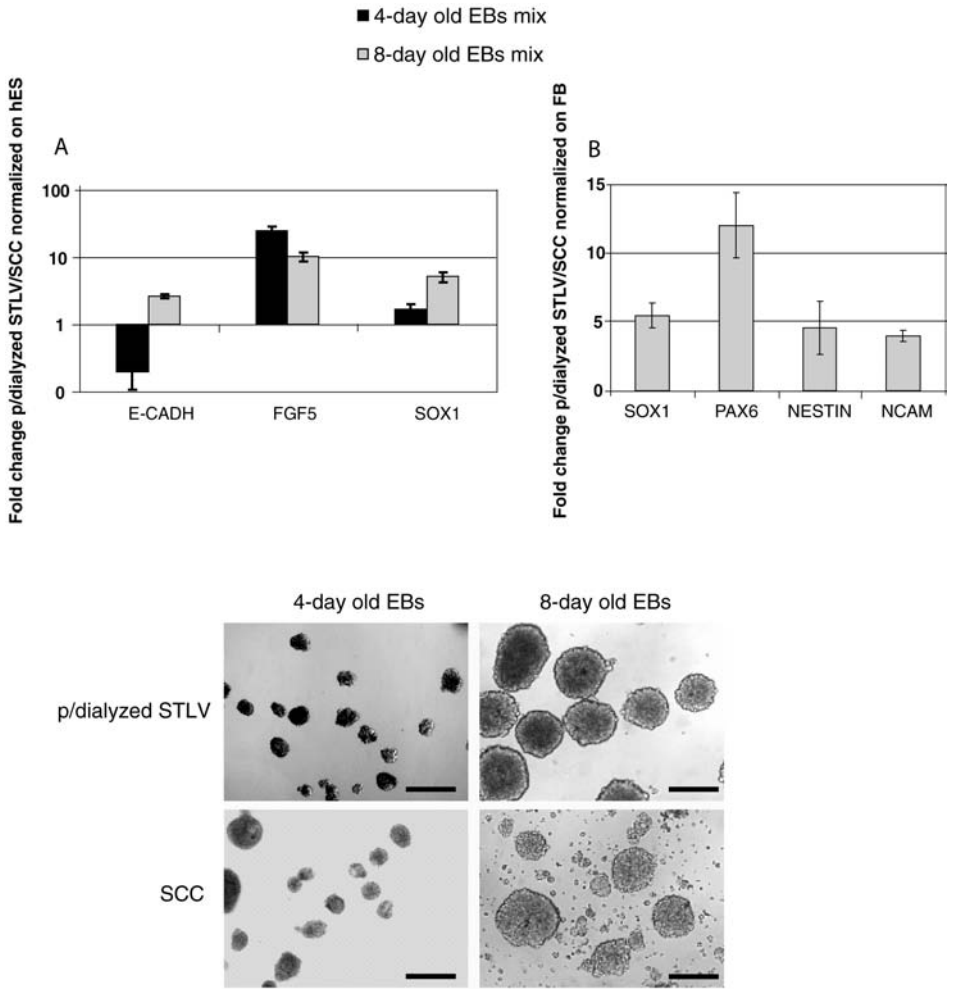


FIG. 5. Characterization of embryoid bodies (Ebs) differentiated in perfused and dialyzed slow-turning lateral vessel (STLV) conditions versus static culture conditions (SCCs) after 4 days (black bars) and 8 days (grey bars) (VUB01 line). Upper panel: (**A**) Gene expression of *E CADHERIN* and of the neuroectoderm markers *FGF5* and *SOX1* normalized on human embryonic stem cell level. Means ± standard deviations ($n = 3$). (**B**) Gene expression of neural progenitor markers: *SOX1, PAX6, NESTIN, and N-CAM* normalized on human fetal brain. Means ± standard deviations ($n = 3$). Lower panel: photomicrographs showing EBs obtained at 4 days (left) and 8 days (right) under STLV conditions (upper row) and SCCs (lower row). Scale bar is 200 μm.

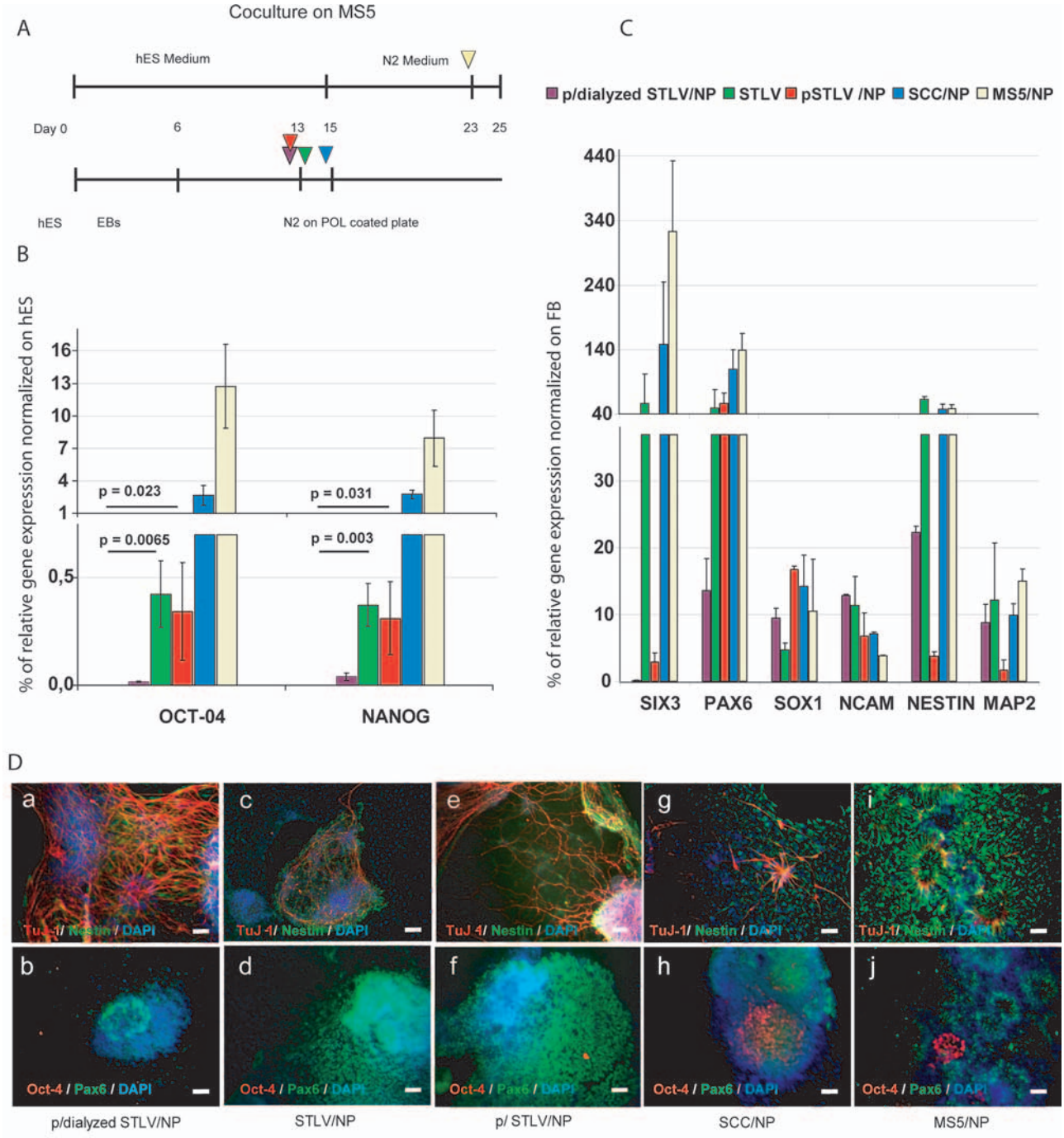


FIG. 6. Comparison of neural progenitors (NPs) generated under perfused and dialyzed slow-turning lateral vessel (STLV), perfused STLV, non-perfused STLV, static control conditions (SCCs) and after co-culture with MS5 stromal cells (H9 line). (**A**) Schematic diagram illustrating the sequential step of neural differentiation protocols: ▼signals rosettes-like cells appearance. Quantitative polymerase chain reaction analysis of octamer *(OCT)-4* and *NANOG* (**B**) and neural markers (**C**), respectively, normalized on undifferentiated human embryonic stem cells and human fetal brain ($p < 0.05$ for all conditions using the *t*-test after Welch correction). (**D**) Immunostaining of neural progenitors obtained fter a culture step in perfused and dialyzed slow-turning lateral vessel (STLV) (a, b), non-perfused STLV (c,d), perfused STLV (e,f), and static control conditions (SCCs) (g,h) and using MS5 induction (i, j). In a, c, e, g, and i, TUJ-1 and NESTIN immunoreactivity (in red and green, respectively); in b, d, f, h and j, OCT-4 and PAX-6 (in red and green, respectively). Scale bar = 50 μm.

Analysis of differentiation markers in mixed samples of EBs at 4 and 8 days confirmed the overall acceleration of the differentiation (Fig. 5). At 4 days, E-cadherin expression in STL-derived hEBs was one-fifth that under static conditions. At 8 days, the reverse was observed, with E-cadherin expressed three times more in the former than in the latter, indicating a faster progression toward gastrulation. Early neural differentiation markers (*FGF5* and *SOX-1*) showed a similar acceleration in the STLV conditions compared with SCCs (Fig. 5A). At that 8-day time point, expression of genes associated with later stages of neural differentiation was also 5 to 10 time more in the perfused and dialyzed STLV than under SCCs (Fig. 5B).

Neural differentiation of EBs produced in simulated microgravity

To analyze the effect of a rotary bioreactor on the specific neural differentiation, we compared this differentiation for hEBs derived from an H9 hESC line in the perfused and dialyzed STLV, perfused STLV, and non-perfused STLV; under SCCs; and using co-culture with stromal cells.

As shown in Figure 6A, the mean time delay to "neural rosette" formation grown was significantly shorter under all three STLV conditions than under SSCs (1 to 2 days), and all were more than 1 week shorter than after induction of stromal cells. Under STLV conditions, they were collected after only 13 to 14 days (6 days in the bioreactor and 7–8 days after plating hEBs), whereas early neural rosettes were observed only after 23 days using co-culture with MS5 feeder cells, in agreement with previous data.[10]

Undifferentiated leftover cells in neural rosettes were analyzed using real-time PCR of OCT-4 and NANOG. The expression of these markers of the undifferentiated stage was dramatically lower STLV and perfused STLV until undetectable in the perfused and dialyzed STLV-derived rosettes, whereas both remained expressed in co-culture– and SCC-derived rosettes, at lower but significant levels to the undifferentiated stage (Fig. 6B). All others markers of differentiation increased as expected under all three conditions. Once normalized on gene expression recorded in the brain of a 21- to 41-week-old human fetus, results were not significantly different for *SOX-1*, *N-CAM*, *Nestin*, and *MAP 2* (Fig. 6C). *SIX3*, a precocious and transient marker gene of neural specification, appeared down-regulated only in perfused and perfused and/dialyzed STLV conditions. The typical marker of early (rosette-associated) neural precursors, *PAX6*, was less expressed in in perfused and dialyzed STLV than under all other conditions, a result confirmed using immunocytochemical staining of cells in culture (Fig. 6D). In contrast, the cells expressing the marker of more-advanced neuronal progenitors TUJ-1 were more numerous in perfused and dialyzed STLV culture than under any other condition.

Discussion

The main result of this study is the demonstration that optimizing low-shear-stress STLV bioreactors through control of a continuously perfused culture medium allows for long-term production of hEBs that differentiate more rapidly and more homogeneously than under classic culture conditions. Addition of a regenerating dialysis loop permitted the further optimization of the medium. It also restricted the need for renewal of the medium.

Non-perfused STLV bioreactors have been shown to be a useful tool for bulk production of EBs derived from hESCs.[4] We have built upon those data in the search for technical improvements that would allow optimization of the culture medium content through adaptation to the continuously changing needs of the cells in the bioreactor chamber. Using a perfusion system allowed us to address this issue in three different and complementary ways. First, it allowed for continuously diluting cell waste while maintaining concentrations of nutriments, because the culture medium in the chamber was in permanent equilibrium with an external source. Second, it allowed the medium in the chamber to be changed whenever needed without altering the growth process. In bioreactors, interrupting stirring—and microgravity in STLV—leads to agglomeration of EBs and formation of aggregates that are too large for optimal growth and differentiation and thus disturb the evolution of the early stages of the gastrulation.[16,17] Continuous diffusion of the medium reduces the variations of free-steam concentration, because it results in a nearly constant value at the surface of the aggregates that rotate in the bioreactor.[18] Third, a perfusion system creates a derivation of the culture medium that can then be analyzed directly, allowing for precise control of the microenvironment in which the cells are growing. It is of

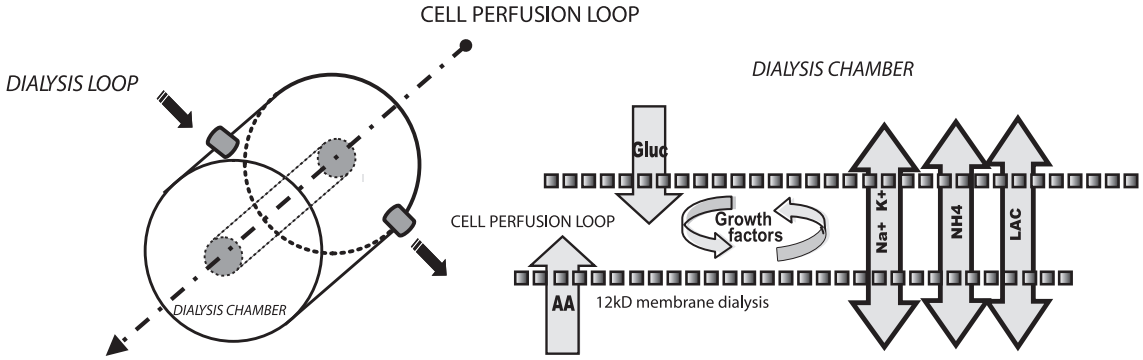


FIG. 7. Left: schematic representation of the two flows of medium in the dialysis chamber, from the slow-turning lateral vessel (STLV) chamber (perfusion loop), and of fresh medium (dialysis loop). Right: predicted gradient-driven flows of key molecules of the culture medium across the semi-permeable membrane (12-kDa cut-off).

most importance that adequate oxygen and nutrient mass transfer are essential parameters to maintain growth and differentiation of aggregated cells in suspension,[19] and they are continuously evolving over time in bioreactors. Accordingly, cell viability was better under perfused STLV conditions, dialyzed or not, than under non-perfused STLV conditions or SCCs. Microgravity culture condition has been successfully used for organic tissue growth and differentiation,[20,21] with for example, low shear stress adapted with sensitivity of the construct–liquid interface, microenvironment around the structure that include nutrient and O_2 supply, and preservation of paracrine autocrine pathways.[22] The third conditions could explain maintenance of growth and differentiation.

Moreover, to avoid disturbing this rotation frequently, which must be continuous, we also added an on-line analysis system of culture. That gives us a real-time following of the medium composition without having to intervene inside the culture chamber, thus allowing us to perform real continuous hEB cultivation while limiting direct human technical intervention on cells during the culture processes.

The use of a perfusion system with the bioreactors allowed us to move a step further in the optimization of the culture medium by adapting a dialysis chamber to the STLV bioreactors comparable with those designed for other applications.[23] The value of this addition was demonstrated on all culture medium parameters studied. Our interpretation of these results is summarized in Figure 7 and points to the differential cut-off of the membranes in the bioreactor and the dialysis chambers as one key characteristic of the system. By restricting the cut-off point in the dialysis chamber to 12 kDa, we provoked a differential dilution of the elements contained in the culture medium. Exchanges with the used medium flowing out of the bioreactor chamber will be at equilibrium for all elements that can cross the membrane, provoking movement in both directions according to gradients of concentrations. Nutrients that have been used are replenished in the culture medium. Cell waste metabolites that have increased in concentration in the bioreactor chamber will cross the membrane and dilute in the dialysis chamber. Because of their size, most proteins will not cross the membrane and will remain in the culture medium, resulting in growth factors being more effective than under static conditions.[24]

The use of low-shear-stress bioreactors to grow hEBs has been first considered for their ability to address the issue of mass cell production.[4] We have considered a complementary issue, namely the ability of a system allowing for controlled culture conditions over time to improve the differentiation process of hEBs. Our results support this hypothesis by demonstrating that EBs grown in the perfused and dialyzed STLV bioreactors underwent differentiation in a more-homogeneous manner and, as an example of the overall ability of the system, reached a characteristic stage of neural differentiation more rapidly than under other conditions tested. Micro-gravity affects expression of numerous genes, cell-to-cell interaction, and paracrine–autocrine cell pathways.[16] The minimal mechanical stress inside the vessel is also favorable for cell aggregation and aggregate culture.[25] As demonstrated, the formation of aggregates in simulated microgravity avoided the maintenance of residual undifferentiated cells, which are believed to be implicated in teratoma formation; the ability to eliminate this risk is essential for regenerative medicine.[26]

Similar to our results, Gerecht-Nir and colleagues noted that consumption of nutrients and increased concentration of cell waste metabolites characterized non-perfused STLV culture conditions. In non-perfused bioreactors, similar to what occurs under SCCs, growing cells are thus treated with culture medium, which loses optimal characteristics soon after each exchange. In perfused bioreactors, the stability of the cell culture conditions at a level much closer to the original concentrations is a likely major mechanism underlying the improved homogeneity of the differentiating EBs. Optimization of culture conditions may also be responsible for the faster speed of differentiation recorded in the present study. Indeed, under static conditions, it is likely that cells undergoing differentiation are placed in optimal conditions only for short periods of time after medium renewal. As a consequence, speed of differentiation may be cycling after each medium exchange from normal to sub-normal in static conditions. The perfused and dialyzed STLV may, in contrast, continuously preserve culture conditions closer to optimal ones, allowing molecular mechanisms of differentiation to operate more normally.

Acknowledgments

This study was supported in part by additional grants from the Agence Nationale de la Recherche (CSCelo), the cluster Medicen Paris Region (IngeCELL) and the European Commission (STEM-HD, FP6). The authors thank Dr Karen Sermon (AZ-VUB, Brussels) for the kind gift of VUB-01, Dr Chad Cowan of HUES-9 for the *OCT*-4GFP hESC line, and Bernard Prum for statistical analyses.

References

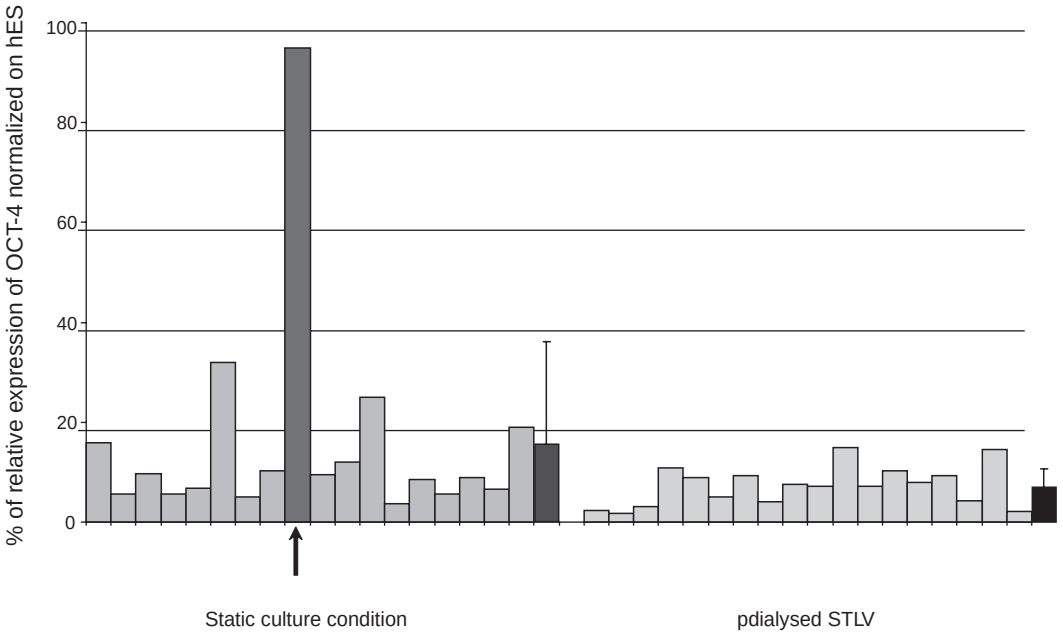
1. Gorba, T., and Allsopp, T.E. Pharmacological potential of embryonic stem cells. Pharmacol Res **47,** 269, 2003.
2. McNeish, J. Embryonic stem cells in drug discovery. Nat Rev Drug Discov **3,** 70, 2004.
3. Mitjavila-Garcia, M.T., Simonin, C., and Peschanski, M. Embryonic stem cells: meeting the needs for cell therapy. Adv Drug Deliv Rev **57,** 1935, 2005.
4. Gerecht-Nir, S., Cohen, S., and Itskovitz-Eldor, J. Bioreactor cultivation enhances the efficiency of human embryoid body (hEB) formation and differentiation. Biotechnol Bioeng **86,** 493, 2004.
5. Stacey, G., and Hunt, C.J. The UK Stem Cell Bank: a UK government-funded, international resource center for stem cell research. Regen Med **1,** 139, 2006.
6. Catalina, P., Cobo, F., Cortes, J.L., Nieto, A.I., Cabrera, C., Montes, R., Concha, A., and Menendez, P. Conventional and molecular cytogenetic diagnostic methods in stem cell research: a concise review. Cell Biol Int **31,** 861, 2007.
7. Itsykson, P., Ilouz, N., Turetsky, T., Goldstein, R.S., Pera, M.F., Fishbein, I., Segal, M., and Reubinoff, B.E. Derivation of neural precursors from human embryonic stem cells in the presence of noggin. Mol Cell Neurosci **30,** 24, 2005.
8. Tian, X., Morris, J.K., Linehan, J.L., and Kaufman, D.S. Cytokine requirements differ for stroma and embryoid body-mediated hematopoiesis from human embryonic stem cells. Exp Hematol **32,** 1000, 2004.
9. Mateizel, I., De Temmerman, N., Ullmann, U., Cauffman, G., Sermon, K., Van de Velde, H., De Rycke, M., Degreef, E., Devroey, P., Liebaers, I., and Van Steirteghem, A. Derivation of human embryonic stem cell lines from embryos obtained

after IVF and after PGD for monogenic disorders. Hum Reprod **21,** 503, 2006.
10. Perrier, A.L., Tabar, V., Barberi, T., Rubio, M.E., Bruses, J., Topf, N., Harrison, N.L., and Studer, L. Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A **101,** 12543, 2004.
11. Xu, Y., Sun, J., Mathew, G., Jeevarajan, A.S., and Anderson, M.M. Continuous glucose monitoring and control in a rotating wall perfused bioreactor. Biotechnol Bioeng **87,** 473, 2004.
12. Brandenberger, R., Wei, H., Zhang, S., Lei, S., Murage, J., Fisk, G.J., Li, Y., Xu, C., Fang, R., Guegler, K., Rao, M.S., Mandalam, R., Lebkowski, J., and Stanton, L.W. Transcriptome characterization elucidates signaling networks that control human ES cell growth and differentiation. Nat Biotechnol **22,** 707, 2004.
13. Besser, D. Expression of nodal, lefty-a, and lefty-B in undifferentiated human embryonic stem cells requires activation of Smad2/3. J Biol Chem **279,** 45076, 2004.
14. Cai, J., Olson, J.M., Rao, M.S., Stanley, M., Taylor, E., and Ni, H.T. Development of antibodies to human embryonic stem cell antigens. BMC Dev Biol **5,** 26, 2005.
15. Dang, S.M., and Zandstra, P.W. Scalable production of embryonic stem cell-derived cells. Methods Mol Biol **290,** 353, 2005.
16. Hammond, T.G., and Hammond, J.M. Optimized suspension culture: the rotating-wall vessel. Am J Physiol Renal Physiol 281, F12, 2001.
17. Dang, S.M., Gerecht-Nir, S., Chen, J., Itskovitz-Eldor, J., and Zandstra, P.W. Controlled, scalable embryonic stem cell differentiation culture. Stem Cells **22,** 275, 2004.
18. Rivera-Solorio, I., and Kleis, S.J. Model of the mass transport to the surface of animal cells cultured in a rotating bioreactor operated in micro gravity. Biotechnol Bioeng **94,** 495, 2006.
19. Gilbertson, J.A., Sen, A., Behie, L.A., and Kallos, M.S. Scaled-up production of mammalian neural precursor cell aggregates in computer-controlled suspension bioreactors. Biotechnol Bioeng **94,** 783, 2006.
20. Chen, X., Xu, H., Wan, C., McCaigue, M., and Li, G. Bioreactor expansion of human adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells. Stem Cells **24,** 2052, 2006.
21. Wang, X., Wei, G., Yu, W., Zhao, Y., Yu, X., and Ma, X. Scalable producing embryoid bodies by rotary cell culture system and constructing engineered cardiac tissue with ES-derived cardiomyocytes *in vitro*. Biotechnol Prog **22,** 811, 2006.
22. Yuge, L., Kajiume, T., Tahara, H., Kawahara, Y., Umeda, C., Yoshimoto, R., Wu, S.L., Yamaoka, K., Asashima, M., Kataoka, K., and Ide, T. Microgravity potentiates stem cell proliferation while sustaining the capability of differentiation. Stem Cells Dev **15,** 921, 2006.
23. Schumpp, B., and Schlaeger, E.J. Optimization of culture conditions for high cell prodensity liferation of HL-60 human promyelocytic leukemia cells. J Cell Sci **97 (Pt 4),** 639, 1990.
24. Liu, Y., Liu, T., Fan, X., Ma, X., and Cui, Z. *Ex vivo* expansion of hematopoietic stem cells derived from umbilical cord blood in rotating wall vessel. J Biotechnol **124,** 592, 2006.
25. Cameron, D.F., Hushen, J.J., Colina, L., Mallery, J., Willing, A., Sanberg, P.R., and Saporta, S. Formation and structure of transplantable tissue constructs generated in simulated microgravity from Sertoli cells and neuron precursors. Cell Transplant **13,** 755, 2004.
26. Brederlau, A., Correia, A.S., Anisimov, S.V., Elmi, M., Paul, G., Roybon, L., Morizane, A., Bergquist, F., Riebe, I., Nannmark, U., Carta, M., Hanse, E., Takahashi, J., Sasai, Y., Funa, K., Brundin, P., Eriksson, P.S., and Li, J.Y. Transplantation of human embryonic stem cell-derived cells to a rat model of Parkinson's disease: effect of *in vitro* differentiation on graft survival and teratoma formation. Stem Cells **24,** 1433, 2006.

Address reprint requests to:
Michel Cailleret, M.S.
INSERM/UEVE U 861
I-STEM, AFM
5 rue Henri Desbruères
Evry 91030 Cedex
France

E-mail: mcailleret@istem.genethon.fr

Received: January 16, 2008
Accepted: June 9, 2008



SUPPLEMENTAL FIG. 1. Octamer-4 gene expression in individual embryoid bodies (EBs) from SA01 cell line at day 3, analyzed using quantitative polymerase chain reactin and normalized on the human embryonic stem cell (hESC) level. The black arrows indicate EBs with expression at the level of undifferentiated hESCs; dark bars shows means of relative expression to undifferentiated level.

Supplemental Table 1.

Gene	Primer Sequences		Ref
	Forward	*Reverse*	
βTUB	ATCAGCAAGATCCGGGAAGAG	CCGTGTCTGACACCTTGGGT	(1)
HPRT1	ATGGGAGGCCATCACATTGT	ATGTAATCCAGCAGGTCAGCAA	(2)
L13a	CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA	TTGAGGACCTCTGTGTATTTGTCAA	(3)
UbC	ATTTGGGTCGCGGTTCTTG	TGCCTTGACATTCTCGATGGT	(3)
GAPDH	CCCACTAACATCAAATGGGG	CCTTCCACAATGCCAAAGTT	(4)
ßACTIN	CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT	AGCACTGTGTTGGCGTACAG	(5)
OCT-04	CTTGCTGCAGAAGTGGGTGGAGGAA	CTGCAGTGTGGGTTTCGGGCA	*
NANOG	CAAAGGCAAACAACCCACTT	TCTGCTGGAGGCTGAGGTAT	(6)
LEFTYA	GGGAATTGGGATACCTGGATTC	TAAATATGCACGGGCAAGGCTC	(7)
TDGF1	ACAGAACCTGCTGCCTGAAT	ATCACAGCCGGGTAGAAATG	(8)
SOX1	GATGCACAACTCGGAGATCA	GTCCTTCTTGAGCAGCGTCT	*
PAX6	GCCAGCAACACACCTAGTCA	TGTGAGGGCTGTGTCTGTTC	*
FGF5	TGCAAGTGCCAAGTTCACAGA	AGTTCTATGTATTGCTGAGGCATAGGTA	(9)
E-CADHERIN	AGGAATTCTTGCTTTGCTAATTCTG	CGAAGAAACAGCAAGAGCAGC	*
NESTIN	GGAAGAGAACCTGGGAAAGG	CTTGGTCCTTCTCCACCGTA	*

1. Locati, M., Deuschle, U., Massardi, M.L., Martinez, F.O., Sironi, M., Sozzani, S., Bartfai, T., and Mantovani, A. Analysis of the gene expression profile activated by the CC chemokine ligand 5/RANTES and by lipopolysaccharide in human monocytes. J Immunol **168,** 3557, 2002.

2. Kamphuis, W., Schneemann, A., van Beek, L.M., Smit, A.B., Hoyng, P.F., and Koya, E. Prostanoid receptor gene expression profile in human trabecular meshwork: a quantitative real-time PCR approach. Invest Ophthalmol Vis Sci **42,** 3209, 2001.

3. Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biol **3,** RESEARCH0034, 2002.

4. Wang, X.D., Shou, J., Wong, P., French, D.M., and Gao, W.Q. Notch1-expressing cells are indispensable for prostatic branching morphogenesis during development and re-growth following castration and androgen replacement. J Biol Chem **279,** 24733, 2004.

5. Lebbe, C., Agbalika, F., Flageul, B., Pellet, C., Rybojad, M., Cordoliani, F., Farge, D., Vignon-Pennamen, M.D., Sheldon, J., Morel, P., Calvo, F., and Schulz, T.F. No evidence for a role of human herpesvirus type 8 in sarcoidosis: molecular and serological analysis. Br J Dermatol **141,** 492, 1999.

6. Dahl, J.A., and Collas, P. Q2ChIP, a quick and quantitative chromatin immunoprecipitation assay, unravels epigenetic dynamics of developmentally regulated genes in human carcinoma cells. Stem Cells **25,** 1037, 2007.

7. Xiao, L., Yuan, X., and Sharkis, S.J. Activin A maintains self-renewal and regulates fibroblast growth factor, Wnt, and bone morphogenic protein pathways in human embryonic stem cells. Stem Cells **24,** 1476, 2006.

8. Pal, R., and Ravindran, G. Assessment of pluripotency and multilineage differentiation potential of NTERA-2 cells as a model for studying human embryonic stem cells. Cell Prolif **39,** 585, 2006.

9. Hanada, K., Perry-Lalley, D.M., Ohnmacht, G.A., Bettinotti, M.P., and Yang, J.C. Identification of fibroblast growth factor-5 as an overexpressed antigen in multiple human adenocarcinomas. Cancer Res **61,** 5511, 2001.