

Thesis, COLLÉGIALITÉ

Auteur : Stepniak, Marty

Promoteur(s) : 17444

Faculté : Faculté de Médecine

Diplôme : Master en sciences biomédicales, à finalité approfondie

Année académique : 2021-2022

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/14846>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.

Mémoire de Stepniak Marty
Master en Sciences Biomédicales à finalité

Génération de lignées hiPSC par reprogrammation de cellules PBMC et différenciation en cardiomyocytes contractiles

*Travail de fin d'étude de Stepniak Marty
dans le but de l'obtention
du grade de Master en Sciences Biomédicales
à finalité approfondie en Recherche Multidisciplinaire.*

Membres du jury :

PhD. Florence Quesada Calvo

MD.PhD. Olivier Detry

Prof. Didier Cataldo

Modérateurs :

PhD. Rachelle Franzen

PhD. Olivier Peulen

Promoteurs :

Senior Tech. Seyen Sandrine (ext)

Prof. Paul Volders (ext)

PhD. Renaud Vandenbosch (int)

Remerciements

Je voudrai tout naturellement remercier le Professeur Paul Volders du centre de Cardiologie Expérimentale (CARIM) de l'Université de Maastricht, de m'avoir pour la deuxième fois, permis d'intégrer son équipe durant ces 5 mois de stage. Mais plus particulièrement, ma promotrice externe, Sandrine Seyen. Sa patience, sa disponibilité et les conseils qu'elle a pu me distiller tout au long de ce stage, m'ont permis de grandir tant scientifiquement qu'humainement. Plus qu'une collaboration, c'est une réelle complicité qui nous a guidé durant cette demi-année. Merci infiniment.

Un grand merci également à l'Université de Liège et la faculté de Science Biomédicales, qui m'ont permis de réellement trouver ma voie. Ces 3 années furent intenses mais nous, les étudiants, avons toujours pu trouver une oreille attentive et des conseils avisés au niveau du corps enseignant. Les longues discussions entre professeurs et étudiants ont, au final, permis de faire évoluer l'option des Sciences Biomédicales dans la meilleure des directions possible pour s'adapter à la fois aux besoins des étudiants et aux désirs d'excellence des professeurs. Merci pour votre écoute.

Je voudrai également remercier Caroline Shadouh et Margaux Navez pour leur amitié sans faille, leur éternel soutien ainsi que leur intarissable besoin de contribuer à mon équilibre social et moral... que j'ai exprimé mon consentement ou pas.

Un remerciement tout particulier à Suzon Michel qui, depuis 5 ans, n'a eu de cesse de me motiver, soutenir, conseiller. C'est un bonheur quotidien de t'avoir près de moi.

Synopsis

Les cellules souches ont de tout temps, et dans l'inconscient général, fait miroiter des promesses de régénération cellulaire, traitement de maladies génétiques, greffes de nouveaux tissus fonctionnels, etc. Une solution globale à des pathologies très diverses tant le potentiel de ces cellules semble illimité.

Aujourd'hui, ces cellules si particulières ont effectivement permis des avancées significatives dans le cadre de la médecine clinique et translationnelle, à petite échelle. C'est donc la recherche fondamentale qui a enfin su tirer parti du potentiel de différenciation quasi illimité de ces cellules, permettant de caractériser des processus pathologiques ou cellulaires jusqu'alors sans réponse, dans l'attente d'un nouveau modèle.

Dans ce contexte, ce mémoire portera sur la reprogrammation de cellules somatiques sanguines de patients en cellules souches pluripotentes induites (hiPSC) et de leur différenciation en cellules cardiaques contractiles.

Les objectifs sont multiples : Le développement et l'optimisation d'un protocole de reprogrammation de cellules sanguines en cellules pluripotentes et ensuite, leur différenciation en cardiomyocytes. La caractérisation des cellules à des étapes clés de leurs développements: de la cellule souche jusqu'au cardiomyocyte. Et enfin, à court terme, l'analyse électrophysiologique des cardiomyocytes induits pour caractériser l'impact des mutations génétiques héréditaires spécifiques portés par les patients, qui présentent un phénotype d'arythmie ventriculaire.

Abstract

Stem cells have for all time, and in the general consciousness, held out the promise of cell regeneration, treatment of genetic diseases, grafts of new functional tissues, etc. A global solution to very diverse pathologies, as the potential of these cells seems unlimited.

Today, these very special cells have indeed allowed significant advances in clinical and translational medicine, on a small scale. It is therefore fundamental research that has finally been able to take advantage of the almost unlimited differentiation potential of these cells, making it possible to characterize pathological or cellular processes that were previously unanswered, while waiting for a new model.

In this context, this thesis will focus on the reprogramming of somatic blood cells from patients into induced pluripotent stem cells (hiPSC) and their differentiation into cardiac contractile cells.

The objectives are multiple: The development and optimization of a protocol for the reprogramming of blood cells into pluripotent cells and their subsequent differentiation into cardiomyocytes. The characterization of cells at key stages of their development: from stem cells to cardiomyocytes. And finally, in the short term, the electrophysiological analysis of the induced cardiomyocytes to characterize the impact of specific inherited genetic mutations carried by patients with a ventricular arrhythmia phenotype.

Liste des abréviations

- (h)iPSC / iPS → Human induced Pluripotent Stem Cell
- hiPSC-CM → Stem Cell derived human Cardiomyocytes
- ES / (h)ESC → Embryonic Stem Cell (human)
- ECM → Extra Cellular Mass
- WT → Wild Type
- PBMC → Peripheral Blood Mononuclear Cell
- AMD → Age-related Macular Degeneration
- RPE → Retinal Pigmentary Epithelium
- hAFSC (-CM) → Human Amniotic Fluid-derived Stem Cell (culture medium)
- DPSC → Dental Pulp Stem Cell
- IGF-1 → Insuline Growth Factor
- EPO → Erythropoietin
- SCF → Stem cell Factor
- IL-3 → Interleukine 3
- Oct-4 → Octamere binding transcription factor 4
- Klf4 → Kruppel like factor 4
- STRA6 → Signaling Receptor And Transporter of Retinol 6
- CRABP2 → Cellular Retinoic Acid Binding Protein 2
- LEF → Lymphoid enhancer factor
- TCF → T Cell Factor
- Mesp1 → Mesoderm posterior 1
- PRMT8 → Protein Arginine Methyltransferase 8
- TBX5 → T-box 5
- GATA 4 → GATA Binding Protein 4
- DNMT3b → DNA Methytransferase 3beta
- Chd1 → Chromodomain Helicase DNA binding protein 1

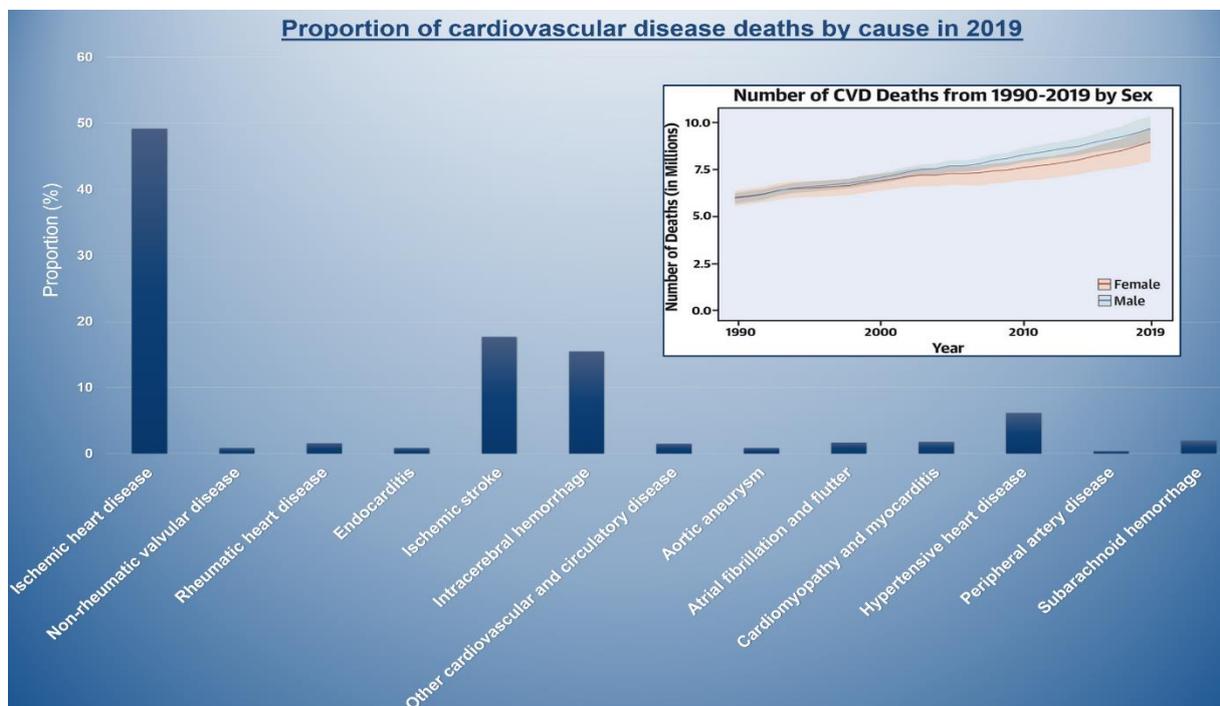
Table des matières

1. Introduction et contexte scientifique global	1
1.1. <i>Les maladies cardiovasculaires, état des lieux</i>	1
1.2. <i>Les cellules souches ? D'où nous venons</i>	3
1.3. <i>Les cellules souches ? Où nous en sommes</i>	8
1.4. <i>Les cellules souches ? Où nous allons</i>	14
2. Objectifs	18
3. Les stratégies et hypothèses de travail	19
4. Matériel et méthode	27
4.1. <i>Isolation des PBMC du sang périphérique (Ficoll)</i>	27
4.2. <i>Mise en culture des PMBC et expansion des progéniteurs érythroïdes</i>	27
4.3. <i>Reprogrammation des EPC et génération des hiPSC</i>	28
4.4. <i>Expansion des cellules souches pluripotentes induites</i>	30
4.5. <i>Vérification de la stabilité caryotypique des cellules hiPSC générées</i>	30
4.6. <i>Caractérisation des hiPSC par immunofluorescence</i>	31
4.7. <i>Différenciation des hiPSC en cardiomyocytes contractiles avec le kit Gibco®</i>	32
4.8. <i>Caractérisation des cellules par qRT-PCR et Immunofluorescence</i>	34
5. Résultats	38
5.1. <i>Isolation des PBMC par technique Ficoll</i>	38
5.2. <i>Mise en culture et expansion des PBMC</i>	38
5.3. <i>Electroporation des PBMC et génération des cellules hiPSC</i>	39
5.4. <i>Caryotypage des hiPSC générées</i>	40
5.5. <i>Caractérisation par immunofluorescence des hiPSC générées à partir des PBMC</i>	41
5.6. <i>Mise en évidence de cardiomyocytes contractiles induits</i>	42
5.7. <i>Caractérisation des cellules aux durant les étapes de la différenciation par RT-qPCR et immunofluorescence</i>	43
6. Discussion	48
6.1. <i>Le protocole GIBCO « PSC Cardiomyocytes Differentiation kit »</i>	48
6.2. <i>La stratégie de recherche</i>	50
6.3. <i>Les perspectives</i>	51
6.4. <i>Le modèle</i>	53
7. Conclusion	55
8. Bibliographie / Ressources	56

1. Introduction et contexte scientifique global

1.1. Les maladies cardiovasculaires, état des lieux ...

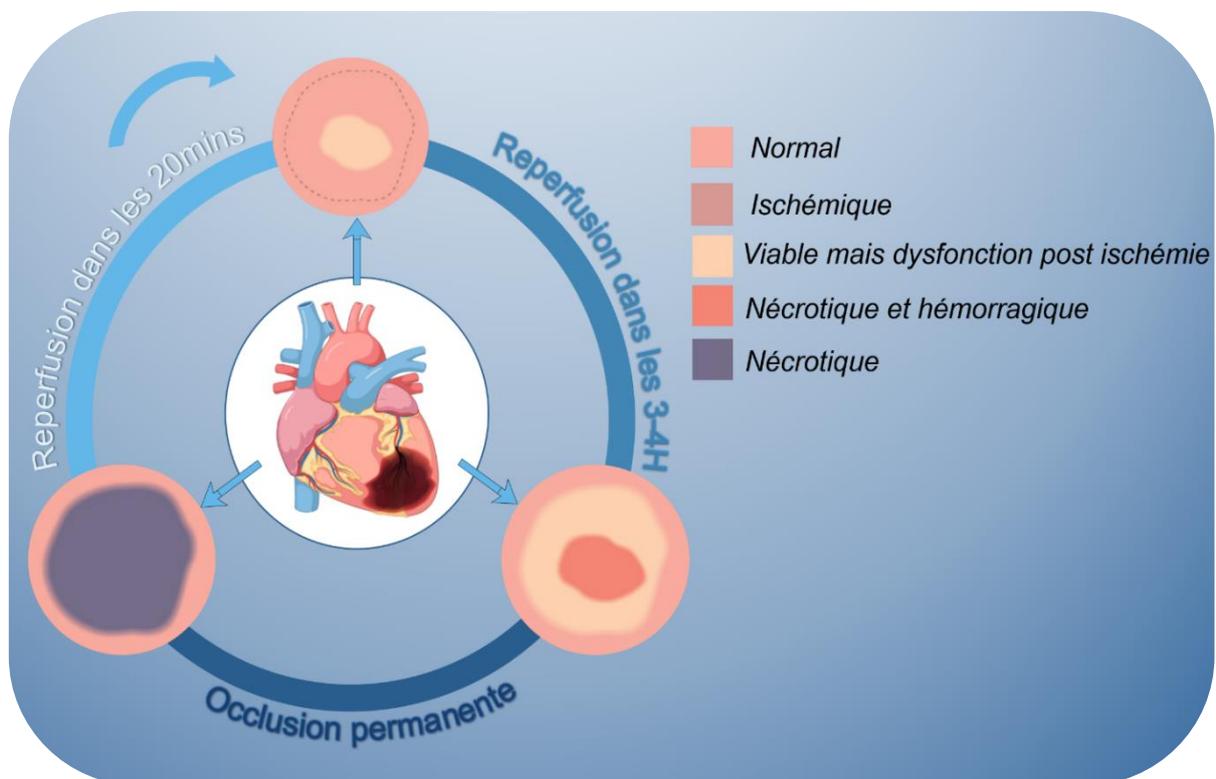
Les pathologies cardiaques sont l'une des premières causes de décès dans le monde. Dans la plupart des cas, les personnes souffrantes de ces diverses pathologies, subissent jour après jour le poids de la morbidité et mortalité qu'entraînent de telles maladies. Pour donner quelques chiffres qui offrent un aperçu de l'ampleur du phénomène : Entre 2002 et 2009, Europe et USA confondus, plus de 19 millions d'enfants étaient touchés par des pathologies cardiaques diverses et variées. Pour environ 230 000 d'entre eux, il y a un réel danger de mort associé à leurs conditions (Hogg et al., 2004). Selon l'étude (Bui et al., 2011), il a été estimé que plus de 23 millions de personnes dans le monde souffriraient d'insuffisance cardiaque. Estimation qui s'avérera trop optimiste car le nombre de patients s'élèvera à 26 millions (Savarese & Lund, 2017). Une étude en 2010 (Lloyd-Jones et al., 2010) mit en avant que même sous traitement, 20 à 30% des personnes meurent dès la première année de l'évènement, et 40 à 60% décèdent endéans les 5 ans après le diagnostic. Pour finir, il est estimé qu'environ 24 millions de personnes souffriront de pathologies cardiaques d'ici 2030 et que de manière encore plus globale, 31% de la mortalité mondiale est imputable aux maladies cardiovasculaires (Costanzo et al., 2008). Outre le problème de santé que représentent ces maladies au niveau mondial, elles induisent un surcoût économique majeur au niveau des différents pays et organismes de santé.



Répartition des décès liés aux différentes maladies cardiovasculaires dans le monde en 2019 ainsi que la distribution de ceux-ci entre 1990 et 2019 en fonction du sexe. (MS) selon (Roth et al., 2020)

Les maladies cardio-vasculaires sont un ensemble de pathologies extrêmement larges et variées, dont un des versants concerne le cœur. Dans sa forme la plus simple, le cœur est une « pompe » principalement composée de cellules musculaires (cardiomyocytes) permettant par leurs contractions synchronisées, la perfusion continue des organes. Cependant, comme montré ci-dessus, son fonctionnement pourtant vital est défaillant chez des millions de personnes à travers le monde tant les pathologies cardiovasculaires sont nombreuses et fréquentes.

A titre d'exemple, l'infarctus aigu du myocarde décrit un processus pathologique lors duquel l'obstruction d'une artère coronaire par un thrombus engendre une perte de la perfusion d'un territoire au niveau du myocarde. Cette zone ischémisée, en souffrance, provoque la perte de fonction globale du tissu (Boateng & Sanborn, 2013). L'arythmie résultante ne permet plus de perfuser suffisamment le patient qui encoure alors un risque vital. Si la prise en charge du patient est rapide, ce dernier sera sauvé, mais l'issue la plus probable pour le territoire ischémié est le remplacement du tissu musculaire lésé par du tissu cicatriciel fibrotique non fonctionnel. Pour le patient, la prise d'une médication sur le long terme devient souvent la norme étant donné la très faible capacité de régénération du tissu cardiaque (Parrotta et al., 2020). En Belgique, en 2017, un peu plus de 20 000 personnes ont reçu un diagnostic d'infarctus du myocarde. 1 personne sur 5 en est morte (SPF Santé Publique).



Chronologie d'un infarctus aigu du myocarde et l'atteinte tissulaire associée. (MS) selon (Lorenzi et al., 2005) d'après ©Elsevier 2005

1.2. Les cellules souches ? D'où nous venons...

Il naquit très vite l'intérêt de se pencher plus avant sur une technique qui pourrait remplacer le tissu non fonctionnel cicatriciel par un tissu doué d'un potentiel contractile et/ou conducteur, offrant ainsi une solution durable et définitive aux patients.

Les récentes avancées en matière de biologie cellulaire ont permis de mieux cerner, dans sa globalité, le fonctionnement et le devenir des cellules souches et ceci permettant d'envisager à moyen et long terme leur probable utilisation dans un cadre clinique.

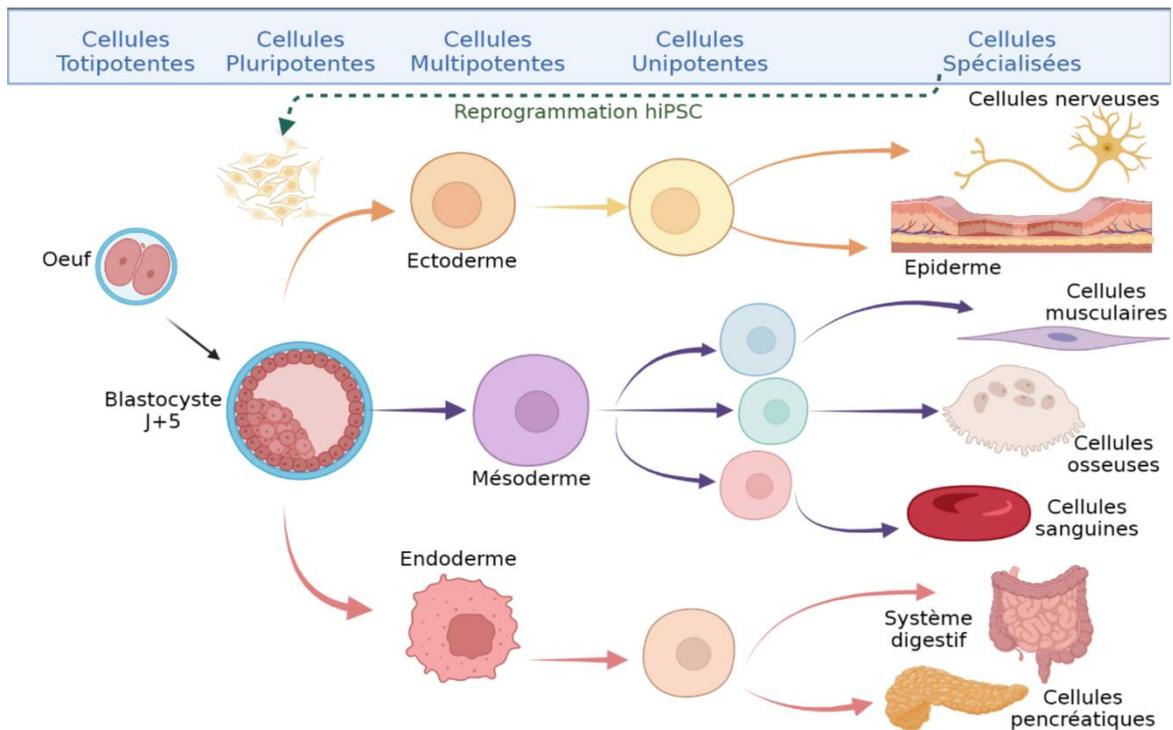
L'idée de pouvoir régénérer et réparer un tissu lésé ayant perdu sa fonction grâce à l'utilisation de cellules souches, différenciées en le type cellulaire dont le patient aurait besoin, serait un nouvel objectif au travers duquel les cliniciens pourraient regarder lors de la mise en place d'un traitement pour leurs patients. Mais est-ce réellement envisageable ?

Historiquement, les cellules souches somatiques sont décrites comme des cellules spécialisées possédant à elles seules le pouvoir de régénération d'un tissu. En générant un pool de cellules bien particulières, par leurs divisions et différenciations successives, elles présentent un ensemble de caractéristiques spécifiques « cadencées » par le tissu dont elles sont issues. Les cellules résultantes une fois pleinement différenciées et fonctionnelles, adoptent un schéma transcriptionnel unique tout au long de leur vie qui sera en accord avec l'exécution de leurs tâches physiologiques jusqu'à leur mort.

Typiquement ces cellules souches sont dites multipotentes, oligopotentes ou unipotentes en fonction de nombre de types cellulaires qu'elles peuvent générer par leurs propres divisions et différenciations au sein de leurs tissus. (Ota, 2008)

Deux autres types cellulaires demeurent, les cellules souches **totipotentes**, qui sont les cellules souches capables de donner à elles seules les cellules des 3 feuillets embryonnaires mais également des cellules des annexes extra-embryonnaires (allantoïde, membrane amniotique). Elles sont générées seulement quelques jours après la fécondation de l'ovule par le spermatozoïde. Ces cellules donneront un organisme dans son entièreté et sont les moins différenciées/spécialisées de l'ensemble du panel des cellules souches connues à ce jour (Ap & Bo, 2014).

Le dernier type de cellules souches est celui qui vous portera au travers de ces 50 prochaines pages, sont les cellules souches **pluripotentes**. Elles prennent place, de manière naturelle, dans ce que l'on appelle la masse cellulaire interne du blastocyste. Ces cellules souches embryonnaires (ES ou ESC) possèdent la capacité de se différencier en cellules des 3 feuillets embryonnaires à savoir le mésoderme, l'endoderme et l'ectoderme mais ne donneront plus les annexes extra embryonnaires.

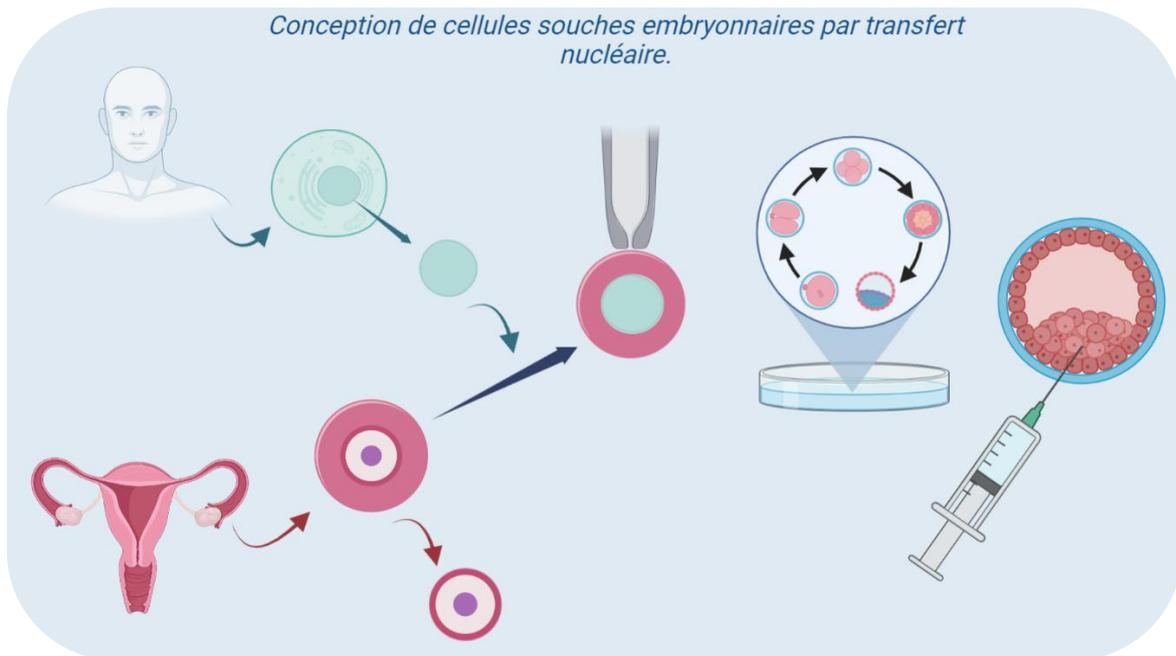


Distinction entre les différents types de cellules souches : les cellules souches pluripotentes, du blastocyste, donnent les cellules souches formant les trois feuillets embryonnaires. Ces dernières donnant elles-mêmes des cellules souches tissu-spécifiques. Enfin, ces dernières sont elles-mêmes à l'origine des cellules spécialisées fonctionnelles. Les cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPSC) sont issues de la reprogrammation de cellules spécialisées. (MS via Biorender) d'après (Magalon et al., 2018)

Au vu de leur capacité intrinsèque de différenciation et de division illimitée, l'optique de pouvoir disposer de ces cellules à des fins thérapeutiques a rapidement vu le jour. Mais extraire ces cellules représentait un challenge malgré plusieurs sources potentielles différentes de ESC (Embryonic Stem Cell).

L'une des principales techniques (qui par la même occasion, initiera une autre découverte majeure dans le domaine des cellules souches) consiste à partir d'un ovocyte dont on en retire le noyau et que l'on fusionne avec le noyau d'une cellule somatique. Cette cellule résultante, une fois mise en culture et/ou inséminée, donne un embryon tout à fait viable (Campbell et al., 1996). Le prénom « Dolly » n'a aujourd'hui plus de secret pour personne.

Plusieurs conclusions peuvent être décrites à partir de cette technique nommée « transfert nucléaire » et que l'on doit initialement à Sir John Gurdon (John B. Gurdon, 1962).



Principe de la génération de cellules souches embryonnaires par la technique de transfert nucléaire. (MS via Biorender)

Tout d'abord l'idée que les cellules ne peuvent qu'irréremdiablement se différencier de manière linéaire de la cellule souche vers la cellule différenciée somatique sans possible retour en arrière est remise en doute.

De plus l'ovocyte, sans son noyau, possède vraisemblablement la capacité de rendre à une cellule somatique son plein potentiel de différenciation. Pour finir, les gènes de pluripotence ne sont donc pas perdus pendant le processus de différenciation mais ils sont pleinement conservés. Ils sont en dormance.

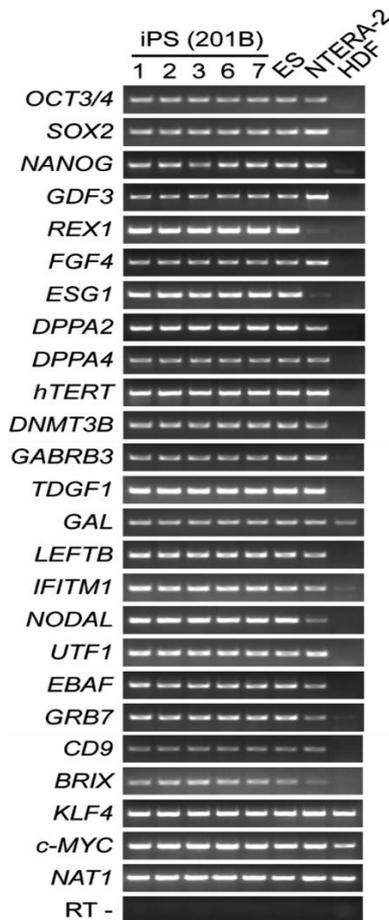
Toutes ces découvertes en ont appelé d'autres dans les années qui suivirent. Mais rapidement, des problèmes d'éthiques liés à la production et à l'utilisation de ces hESC (human embryonic stem cell) virent le jour. En effet, cette technique nécessite dans un premier temps la destruction d'un embryon humain potentiellement viable dont sont prélevées les cellules de la masse interne.

Bien que l'on fit appel à des embryons surnuméraires venant de fécondation in-vitro dans les années qui suivirent, cette question éthique demeure toujours. Si bien que de nombreux pays ont tout simplement interdit l'utilisation de hESC. De plus, dans un contexte thérapeutique, ces cellules non différenciées présentent un risque non maîtrisable de transformation en tératome (tumeur dérivée des 3 feuillets germinaux). (Volarevic et al., 2018).

Malgré leur potentiel de screening de molécules thérapeutiques ou les réponses à des questions d'embryogenèse et de développement cellulaire qu'elles ont pu apporter (Thomson, 1998),

ces hESC ont finalement hérité du pseudonyme « Gold Standard » avant de disparaître du paysage scientifique quelques années plus tard.

La solution face à cette impasse fut apportée début des années 2000 par le Docteur Yamanaka qui identifia les gènes de pluripotences humains sur base de ceux identifiés chez la souris et les testa un à un sur des cellules somatiques humaines, pour voir si certains d'entre eux étaient nécessaires et suffisants à la génération des premières cellules souches pluripotentes induites ... humaines.



Dans son expérience de 2007, Yamanaka testa les principaux facteurs de transcriptions murins à savoir notamment Oct4, Sox2, c-Myc et Klf4 par transduction (virus) sur des fibroblastes d'origine humaine (épiderme) (Takahashi et al., 2007).

Les cellules résultantes, reprogrammées, présentèrent les mêmes marqueurs que ceux trouvés au préalable chez les cellules hESC. Bien que légèrement différents, les profils transcriptionnels de ces 2 lignées sont tout à fait semblables. Il s'agit des premières cellules souches induites générées à partir de cellules somatiques humaines : les hiPSC.

Présence des différents marqueurs de pluripotences (RT-PCR) chez les cellules souches pluripotentes induites (iPS), cellules souches embryonnaires (ES), cellules pluripotentes carcinoïdes (NTERA-2) et chez un fibroblaste humain (HDF). (Takahashi et al., 2007)

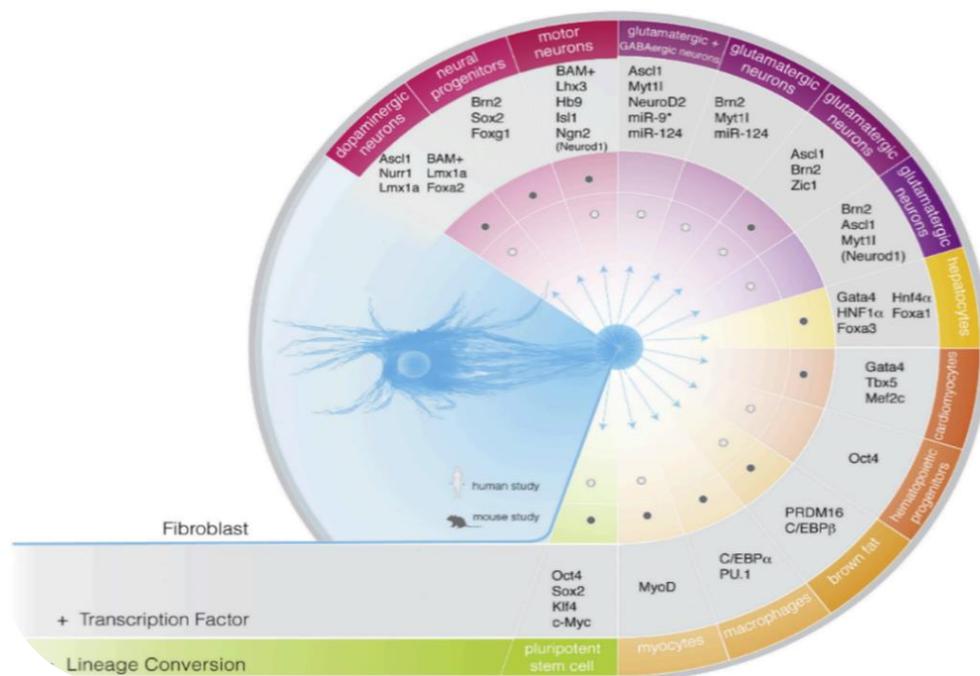
Ces hiPSC (Human Induced Pluripotent Stem Cell) obtenues, Yamanaka fit également la démonstration que l'on pouvait partir de ces cellules souches induites et générer n'importe quelle lignée cellulaire voulue en les cultivant dans des milieux spécifiques contenant les différentes cytokines nécessaires à la différenciation de celles-ci.

Ainsi, il obtint des cardiomyocytes ainsi que des neurones. Il remarqua également que ces cellules hiPSC induiraient un tératome (tumeur dérivée des 3 feuilletts embryonnaires) une fois transplantées dans le flanc d'une souris, ceci confirmant une nouvelle fois qu'il était bien en présence de cellules pluripotentes, ayant les mêmes caractéristiques fonctionnelles que les cellules embryonnaires normalement issues de la masse cellulaire interne (Müller et al., 2010).

Dans les années qui suivirent, l'engouement pour la génération de cellules pluripotentes induites ne cessa de prendre de l'ampleur et le nombre d'articles multipliant les essais de reprogrammation de cellules somatiques ainsi que leurs différenciations en tout un panel d'autres types cellulaires « explosa ». Ces différentes recherches déboucheront sur une plus profonde compréhension des différentes voies de signalisations impliquées dans ces processus reprogrammation ainsi que leur impact sur l'épigénétique des cellules (Song et al., 2007) (Saadeldin et al., 2021) (Mossahebi-Mohammadi et al., 2020).

De nouvelles théories impliquent que ces différentes voies de signalisations cellulaires, stimulées par des ligands spécifiques conditionnent également des nouveaux états de « pré-différenciation » (Weinberger et al., 2016). On découvre ainsi les cellules souches pluripotentes dites « naïves » et « primées » toutes deux séparées par une temporalité différente, des variations des ligands et des profils transcriptionnels sensiblement différents qui permettent d'encore mieux maîtriser les procédés de reprogrammations et de différenciations.

En se basant sur les travaux de Davis en 1987 (Davis et al., 1987), des procédés de transdifférenciations (reprogrammation directe de la cellule somatique vers une autre cellule somatique sans passer par l'étape « cellule souche pluripotente ») voient le jour. Ils sont appliqués de manières courantes et optimisées en utilisant de manière très ciblée des acteurs du remodelage de la chromatine ou des facteurs de transcriptions spécifiques de la lignée cellulaire désirée.



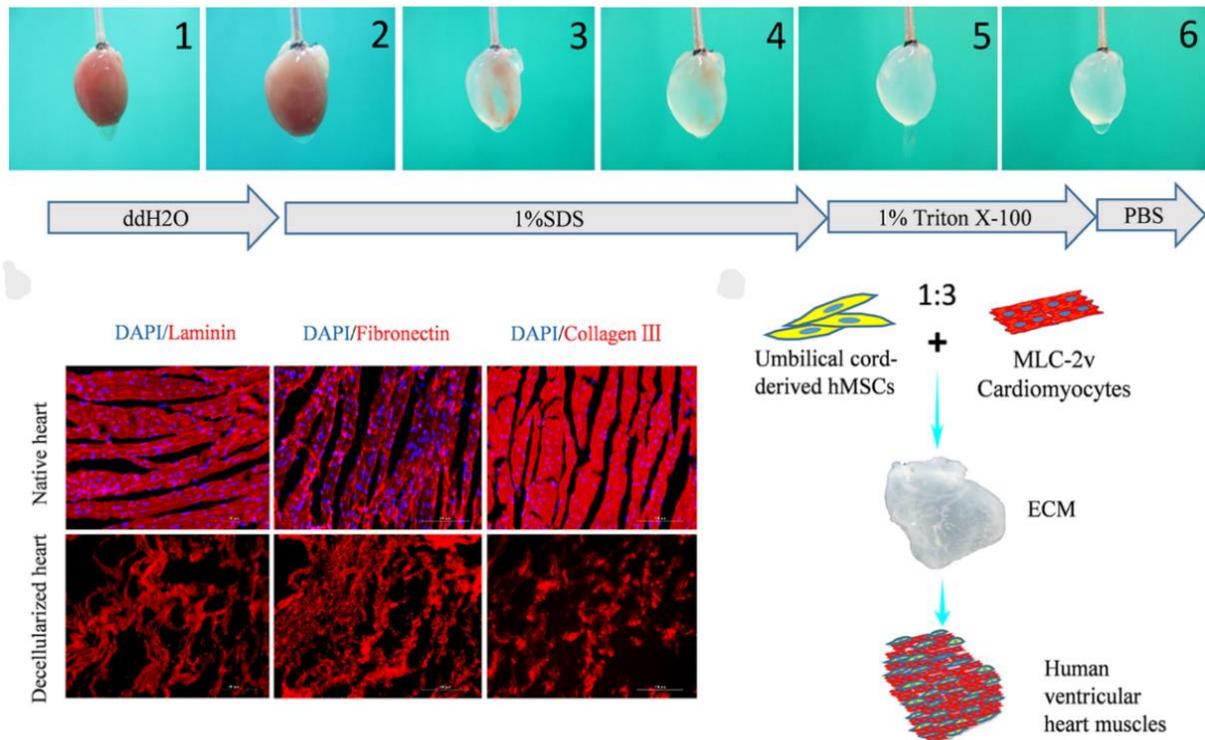
Transdifférenciation de fibroblastes vers de multiples types cellulaires (dont iPSC) en fonction de divers « cocktails » de facteurs de transcription. (Vierbuchen & Wernig, 2012)

1.3. Les cellules souches ? Où nous en sommes...

Ces quelques pages ont « brossé » le chemin parcouru, ainsi que les avancées technologiques qui ont permis de maîtriser au mieux la mise en culture de ces cellules si particulières. Nous avons déjà abordé l'aspect thérapeutiques que pourraient avoir ces cellules mais pour le moment, leur utilisation dans ce cadre reste de l'ordre de l'anecdotique mais sera tout de même abordé un peu plus tard car les perspectives restent nombreuses. Là où en revanche elles se révèlent très utiles est dans la compréhension de processus embryonnaires et développementaux comme les ESC l'ont été il y a quelques années.

Ainsi les travaux de Li de l'Université de Fudan (B. Li et al., 2017) ont permis de déterminer que lors de phases extrêmement précoces de développement du tissu cardiaque, de très faibles différences de concentration de BMP (Bone Morphogenic Protein) et d'Activine/Nodal permettaient d'engendrer des cellules qui se différencieraient en cellules de l'atrium ou du ventricule. Ce que confirma d'ailleurs l'étude de Lee de l'Université de Toronto en 2017, qui distingua deux populations distinctes de progéniteurs issus du mésoderme. Séparés d'une part spatialement lors de l'embryogenèse et la formation du tube cardiaque primitif dans lequel, les cellules progénitrices qui se retrouvent au pôle antérieur donneront les cellules ventriculaires et au pôle postérieur celles qui donneront les cellules atriales. Mais pas seulement. Ces cellules (CD235a+ pour les progéniteurs ventriculaire et ALDH+ pour les progéniteurs des cellules atriales) se distinguent également par leur imprégnation en Activine A et en Acide Rétinoïque (plus importante au niveau atrial). A l'opposé, les cellules ventriculaires sont favorisées par une imprégnation plus importante en BMP4. (Lee et al., 2017). En suivant cette logique l'équipe de Li, généra deux lignées cellulaires à partir d'hiPSC, à savoir des cellules mésenchymateuses ombilicales et des cellules musculaire cardiaques ventriculaires exprimant le MLC2v.

Un procédé de dé-cellularisation est en premier lieu appliqué à un cœur d'origine murin. Cette technique consiste en un passage du tissu dans plusieurs bains de solvants successifs (SDS et triton). Seule reste la matrice extra-cellulaire (ECM) qui servira d'échafaudage 3D aux cellules souches précédemment générées. Lors de leur prolifération sur la matrice, les cellules démontrèrent étape par étape le développement d'un ventricule « humain ». Les cellules ont été caractérisées tout au long du processus développemental et la résultante finale prit la forme d'une matrice contractile sur laquelle divers tests d'électrophysiologie et de molécules pharmacologiques purent avoir lieu. Le fait de disposer d'un tissu contractile et non plus d'une cellule unique, comme classiquement en patch-clamp, est un pas en plus vers l'obtention d'un modèle physiologiquement plus représentatif des pathologies retrouvées chez les patients.

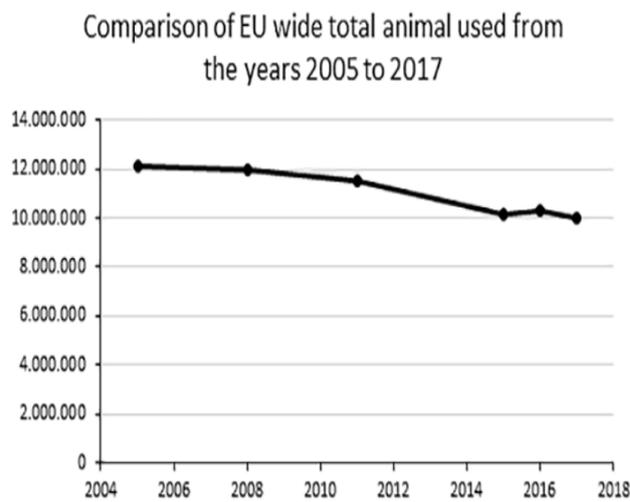


Procédé de dé-cellularisation et l'effet observé sur la matrice extra-cellulaire au niveau des différentes fibres qui la composent. Repeuplement de cellules souches sur matrice ECM. (B. Li et al., 2017)

S'ils ont toujours besoin d'utiliser des modèles animaux pour réaliser certaines de leurs expériences, les chercheurs s'efforcent de trouver des moyens de réduire leur nombre, voire de trouver des méthodes alternatives. L'utilisation des cellules souches engendre une diminution de la quantité d'animaux de laboratoire utilisés pour la recherche et dans de nombreux cas, il constitue un meilleur modèle. En effet, notamment pour le screening de molécules thérapeutiques, l'histoire nous a parfois durement rappelé avec le Tirilazad que la physiologie des rongeurs ou des plus gros animaux n'est pas le reflet exact de celle de l'homme et la sensibilité de ces animaux de laboratoire peut se révéler bien différente de la nôtre concernant certaines molécules thérapeutiques (Perel et al., 2007) (Justice & Dhillon, 2016) et que le choix, de manière approfondie, de ces animaux n'est pas toujours le fruit d'une réflexion suffisante (Robinson et al., 2019). De plus, les coûts associés à la génération et la maintenance de ces animaux de laboratoire peuvent, en fonction des expériences, prendre des proportions considérables.

Un concept inhérent à toute recherche scientifique quel que soit son domaine, est la répétabilité des résultats et des protocoles de recherche. Ce qui, dans le cas d'études reposant sur des animaux de laboratoire, passe automatiquement par un sacrifice d'un plus grand nombre de ceux-ci. Les études pilotes se posent évidemment en « garde-fou » mais requièrent elles-aussi généralement des animaux.

Peut-être qu'outre leur utilisation en recherche fondamentale, les cellules souches pluripotentes induites pourraient également jouer ce rôle d'optimisation de protocoles pour les laboratoires dont les thématiques de recherche ne peuvent se passer d'animaux de laboratoire ?



Country	Year	Number of animals / procedures (vertebrates)	Number of mammals / procedures excluding mice and rats*
Canada*	2018	3,832,817	2,132,069
Israel	2018	428,993	130,672
New Zealand	2016	254,453	175,647
Northern Ireland	2018	28,790	6,324
Norway	2018	1,686,658	1,618,494
South Korea	2018	3,727,163	593,236
Switzerland	2018	586,643	119,328
United States (US)	2018	~ 11-23 million**	780,070

* These figures are only for CCAC members, which account for most major research institutions in Canada.

** This estimate is based on the number of animals being 15-30 times higher than the number of mammals excluding mice and rats.

Quantité d'animaux de laboratoire utilisés en Europe et ailleurs dans le monde. (Busquet et al., 2020)

Par la même occasion, un prélèvement de cellules primaires chez les patients ne peut se faire de manière répétée et la quantité de cellules demeurer illimitée et hétérogène. L'optique de pouvoir « reprogrammer » des cellules possédant la capacité de se différencier en n'importe quelles autres types cellulaires, et de leur donner des caractéristiques pathologiques retrouvées chez les patients (patrimoine génétique) semble être un schéma aussi robuste que l'induction de pathologies chez des animaux de laboratoire (Chang et al., 2020).

Générer un tissu à partir de ces mêmes cellules hiPSC portants les caractéristiques génétiques spécifiques d'un patient et de sa pathologie, s'avère être un procédé encore plus cohérent pour comprendre la complexité de certains mécanismes physio-pathologiques spécifiques chez l'Homme (Nishihara et al., 2020).

En suivant cette idée, de multiples études à travers le monde utilisent les cellules souches comme base pour modéliser des pathologies cardiaques observées chez les patients. Lorsque la pathologie est issue d'une mutation héréditaire connue, il devient alors « aisé » de soit partir des cellules des patients comme les PBMC, étant donné que les mutations héréditaires se retrouvent dans l'ensemble des cellules aussi bien somatiques que germinales, ou de partir d'une lignée de cellules souches pluripotentes induites WT et de générer par génie génétique la mutation qui doit être caractérisée.

Ces cellules souches peuvent servir aux screenings de molécules pharmacologiques et les mutations génétiques associés à ces mêmes maladies peuvent être caractérisées.

De manière imagée, ces cellules permettent de construire un pont entre la recherche fondamentale et le patient dans un laps de temps relativement court et avec une répétabilité élevée.

À titre d'exemple, les syndromes du QT long peuvent être modélisés par cette technique. Il s'agit d'un ensemble de syndromes qui provoquent « une augmentation de l'intervalle QT sur l'ECG avec un risque non négligeable de torsade de pointes »(Al, 2012). Les deux formes les plus communes de ce syndrome sont LQTS1 et LQTS2. Elles résultent de la perte de fonction de la sous-unité alpha des canaux potassiques dont la cause est une mutation génétique sur les gènes KCNQ1 et KCNH2 respectivement (Moretti et al., 2010). Les résultats montrent une reproduction in-vitro fidèle des effets physiologiques retrouvés chez les patients. Cette approche fonctionne également pour des syndromes plus complexes comme le Timothy Syndrome dans lequel on retrouve une mutation gain de fonction qui affecte les canaux Na⁺/K⁺ et dont la physiologie, jusqu'alors, restait incomprise. Un modèle hiPSC a pu être généré et différents essais de molécules pharmaceutiques ont aidé à mieux comprendre des maladies complexes telles que celle-ci (Yazawa et al., 2011).

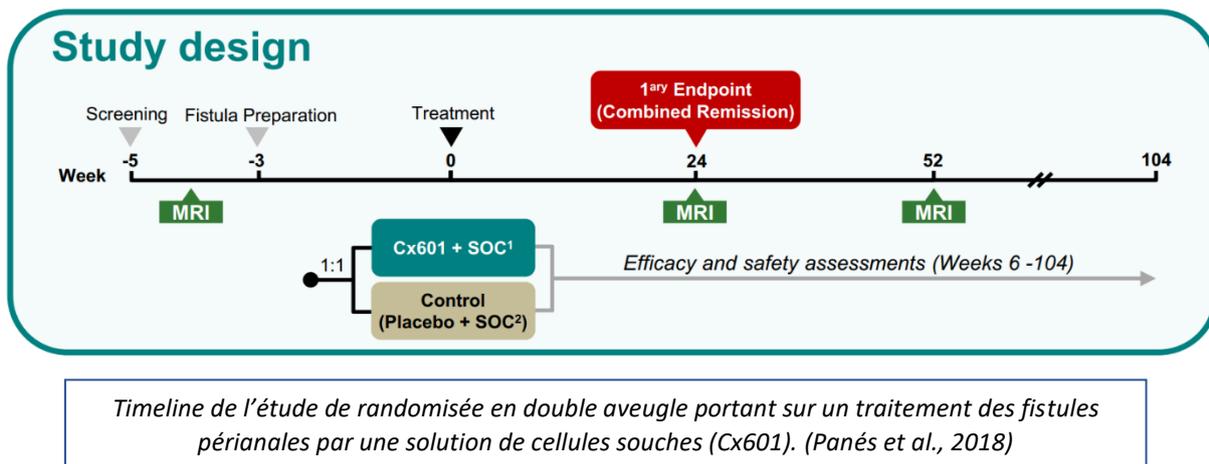
Le Léopard syndrome, les cardiomyopathies dilatées, syndrome hypoplasique gauche du cœur, et bien d'autres pathologies furent l'objet d'une meilleure compréhension alors qu'elles manquaient d'un modèle représentatif et accessible. Les cellules souches pluripotentes induites ont donné aux chercheurs un nouveau moyen d'apprendre et de consolider leurs connaissances sur tout un panel de pathologies jusqu' alors impossible à caractériser.

Si jusqu'ici nous avons essentiellement décrit l'état des avancées du point de vue de la recherche fondamentale, la recherche translationnelle s'est également penchée sur l'utilisation des cellules souches pluripotentes induites. Mais ici, dans l'optique de directement en faire bénéficier les patients.

Divers essais cliniques « à succès » ont eu lieu et leurs enseignements ont été mis à disposition des patients à petite échelle dans le milieu hospitalier. Telle que l'injection de cellules souches mésenchymateuses dérivées d'adipocytes chez des patients souffrants de lésions périanales consécutives à la maladie de Crohn. Les fistules périanales sont l'une des plus fréquentes et des plus graves complications auxquelles les patients sont exposés. Des solutions chirurgicales existent, elles fonctionnent, mais dans 37% des cas les patients n'y répondent pas. Pour 40% de ces patients, la morbidité associée est forte, l'impact sur la vie sociale du patient est catastrophique et la prise de médicaments chroniques devient la norme (Carvello et al., 2019). L'injection de ces cellules souches mésenchymateuses dans les parois rectales qui jouxtent la lésion permet d'augmenter le taux de fermeture de ces fistules.

Les cellules souches mésenchymateuses possèdent en plus une activité paracrine anti-inflammatoire régulant positivement l'activité de lymphocytes T régulateurs, ce qui fait défaut chez les personnes souffrants d'un Crohn.

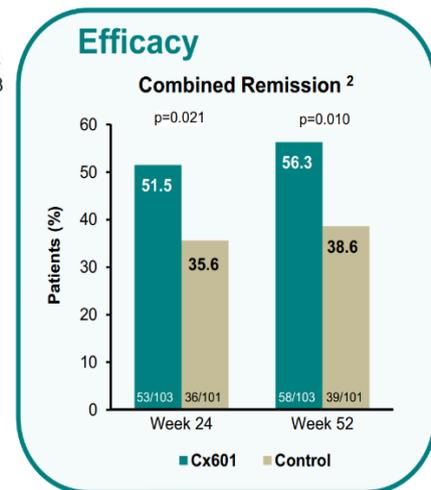
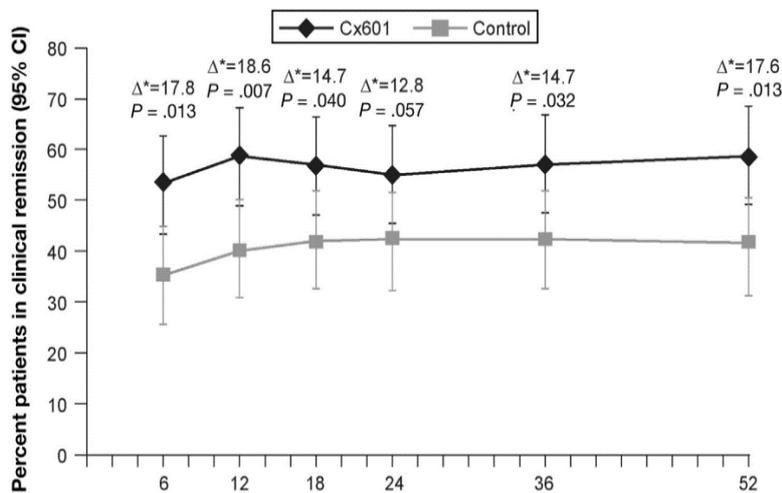
La plus grosse étude randomisée en double aveugle sur le sujet s'est étendue de 2012 à 2016 et regroupa 212 patients présentant une maladie de Crohn associée à des fistules périanales dites « complexes ».



Après curetage de la lésion, le mix de cellules souches ou la solution saline sont injectés dans les parois à proximité de la fistule. La rémission combinée, (à savoir la rémission clinique et la réponse clinique) est l'objectif principal de cette étude. Elle s'avéra significativement plus élevée chez les patients traités que chez les patients ayant reçu le placebo (50% contre 34%).

Sur le long terme, après 52 semaines, le résultat semble se confirmer (56% contre 38%) de même que la rémission clinique significativement plus élevée chez les patients ayant reçus les cellule souches (60% contre 41%) (Panés et al., 2018). Les effets secondaires sont variés mais leur survenue ne semble pas différente entre les deux cohortes.

Ces résultats, bien qu'encourageants, sont bien toujours à remettre dans la perspective d'autres nouveaux essais cliniques qui auront lieu dans le futur et qui confirmeront si oui ou non l'utilisation clinique routinière de cellules souches mésenchymateuses apporte réellement une plus-value thérapeutique. Un autre aspect à prendre évidemment en compte est le coût associé à une telle technique par rapport aux différents traitements de référence.



Pourcentage de rémission clinique et rémission combinée chez les patients en fonction du temps (semaines). Cx601 étant le traitement expérimental à base de cellules souches. (Panés et al., 2018)

Dans un tout autre domaine, la dégénérescence maculaire liée à l'âge (AMD) est également une thématique de recherche largement étudiée. Sans rentrer dans les détails l'AMD survient chez les populations âgées et est le fruit d'une prolifération ectopique de vaisseaux sanguins dans l'espace sub-rétinien. Cette prolifération provoque la disruption et donc la perte de fonction progressive de l'épithélium pigmentaire de la rétine (RPE) qui est le support des cellules photoréceptrices (Bindewald et al., 2005).

Pour les patients cela se traduit par une perte progressive de l'acuité visuelle. Les traitements disponibles sont l'injection anti-VEGF directement dans l'œil, la chirurgie ou encore le traitement laser. Plusieurs centres de recherche se sont déjà lancés dans les traitements expérimentaux à base de cellules pluripotentes induites pour faire face à cette pathologie. L'étude de Mandai de l'Université de Kyoto (Mandai et al., 2017) est un essai clinique lors duquel des fibroblastes de patients présentant une AMD ont été prélevés et redifférenciés en feuillet monocouche RPE, ceci dans l'optique d'une autogreffe.

Après 25 mois de suivis post-traitement il en est ressorti que les patients n'ont pas rejeté la greffe et ce, en l'absence d'immunosuppresseurs. Leur acuité visuelle ne semble pas avoir changé mais n'a pas empiré non plus. Le score VFQ (visual fonction questionnaire) s'est amélioré. Les patients présentent une vision plus « claire ».

Cette étude reste également à nuancer, tant du point de vue des résultats qui peuvent être en partie dus à l'acte chirurgical de la greffe, et pas exclusivement au greffon seul, que sur le ressenti des patients qui sont des données subjectives prises à un temps T après l'intervention.

1.4. Les cellules souches ? Où nous allons...

Ces quelques pages ont dressé la genèse des hiPSC. Grâce aux travaux de Gurdon en 1962 et par la suite ceux de Yamanaka en 2007 les connaissances sur ce « nouveau » type cellulaire ont émergé depuis des laboratoires aux quatre coins du monde. Embryogenèse d'organes, modélisation de pathologies diverses et variées, création d'organoïdes, screening médicamenteux, décryptage de voies de communications cellulaires ; autant de domaines qui ont bénéficié de la puissance et de la disponibilité de ce nouveau modèle de recherche. Une brève description d'essais cliniques en cours a également été abordé, à travers d'une part le traitement d'un des effets secondaires les plus délétère de la maladie de Crohn, mais aussi le possible traitement d'une des formes de la DMLA qui touche, 240 millions de personnes à travers le monde (Gagliardi et al., 2019).

Le futur de la recherche basé sur ces cellules semble lui aussi tout aussi riche en découvertes et en possibilités de traitements.

Les termes « cellules souches » vont souvent de pair, dans l'inconscient général, avec la « régénération tissulaire ». Comme précédemment développé, l'utilisation de ces dernières au début des années 2000 a souvent fait miroiter une possible voie vers le remplacement de tissus lésés, ou pour les plus ambitieux un exutoire au vieillissement cellulaire naturel.

Stopper ou du moins ralentir le vieillissement de la peau a de tous temps été une thématique de recherche qui mobilisa énormément de moyens pour des résultats... rarement à la hauteur des attentes.

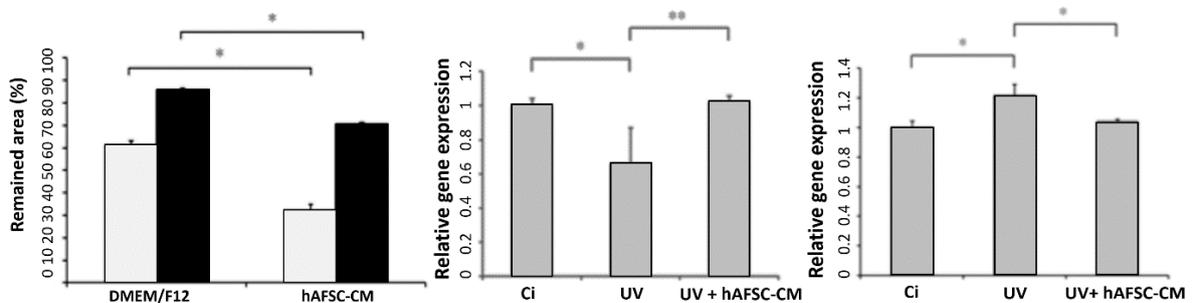
Les UVA auxquels nous sommes tous exposés accélèrent ce processus de vieillissement, ils pénètrent en profondeur le derme et ils induisent la sécrétions de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-1 β , IL-6 et 8 (Ota, 2019).

Les voies empruntées par ces dernières sont nombreuses mais la résultante générale est une augmentation de la production de collagénases et une diminution de la sécrétion de collagène de type 1, le plus abondant dans la matrice extra-cellulaire. Ce déséquilibre est à l'origine de la perte d'élasticité de la peau et de son vieillissement accéléré.

Les cellules souches mésenchymateuses comme le sont celles que l'on retrouve dans le liquide amniotique, ont des propriétés immunomodulatrices via leurs actions paracrine ou la sécrétion d'exosomes.

Dans l'étude de Huh (Huh et al., 2014), une co-culture composée de cellules épithéliales et de fibroblastes sont irradiés afin de reproduire le derme. A cette culture on y ajoute des cellules souches dérivées du liquide amniotiques les hAFSC (Human Amniotic Fluid-Derived Stem Cells). Il a donc été mis en évidence, dans le milieu de culture, une sécrétion par les cellules souches de β FGF, EGF, et TGF- α . Ce milieu de culture (hAFSC-CM) montra plusieurs propriétés :

Une diminution de la sécrétion de collagénases, une augmentation de sécrétion de collagène de type 1, une augmentation de la migration des fibroblastes et des cellules épidermiques ainsi qu'une régénération/ réparation beaucoup plus efficace de la matrice irradiée après 24H. De plus, lorsque que l'on ajoute ce milieu de culture à un milieu de culture classique censé reproduire les conditions physiologiques normales en absence de cellules souches mésenchymateuses et irradiées, on constate que celui-ci inverse la tendance naturelle à la dégradation et à l'inflammation jusqu'à obtenir les mêmes effets que ceux observés dans la co-culture.



De gauche à droite : la distance en pourcentage de lésion restante entre le milieu standard de culture (DMEM/F12) et le milieu généré par les cellules souches. L'expression de collagène de type 1 en condition non irradié, irradié et irradié avec milieu de culture hAFSC-CM. L'expression de MMP en condition non irradié, irradié, irradié avec milieu de culture hAFSC-CM.

Même si cette étude doit encore être approfondie et le protocole d'irradiation optimisé, la mise en évidence du caractère sécrétoire et bénéfique des cellules souches sur la régénération des constituants du derme après irradiation semble établi et ouvre la voie à d'autres expériences dans le domaine.

Toujours dans la sphère de la reconstruction tissulaire, un type de cellules souches très particulières s'annonce très prometteuse, les DPSC ou « Dental Pulp Stem Cell ».

On les retrouve au niveau de la pulpe dentaire (la partie la plus interne de la dent), ces cellules sont uniques dans le sens où elles sont facilement accessibles, leur culture ne représente pas un challenge, elles supportent très bien la congélation et surtout elles ont la capacité intrinsèque de donner des colonies de cellules produisant de la matrice extra-cellulaire hautement calcifiée.

Elles peuvent également aisément se différencier en odontoblastes et en cémentoblastes extrêmement utiles dans le cas d'affection dentaires mais pas seulement.

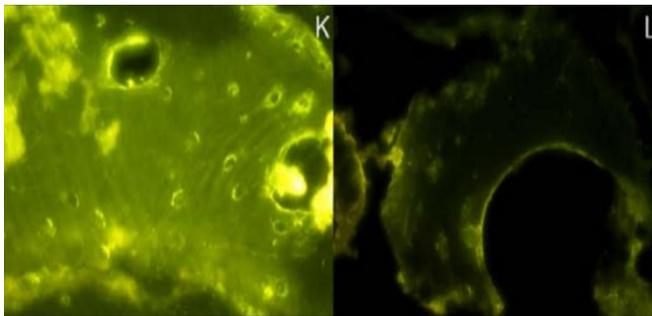
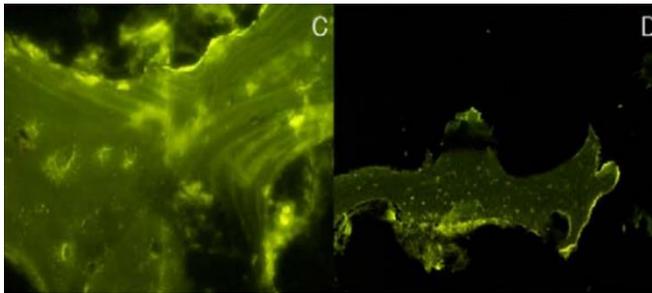
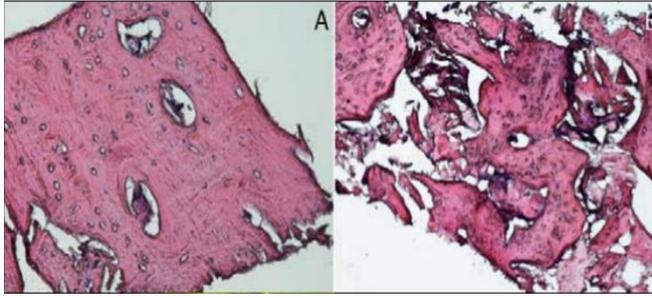
Ces DPSC peuvent également produire du tissu minéralisé et de la matrice extracellulaire ouvrant la voie à de la reconstruction osseuse, aussi bien au niveau maxillo-facial qu'ailleurs au niveau du squelette moteur.

Les maladies parodontales, tous degrés confondus, affectent entre 10 et 15% de la population mondiale (Baelum & Lopez, 2004). Aux Etats-Unis, près de 47% des personnes de plus de 30 ans sont touchés par ces maladies (CDC). Les affections moyennes à sévères de cette maladie (parodontite) affectent tous les tissus de soutien des dents, de la gencive jusqu'à l'os alvéolaire (arcade maxillaire) provoquant un déchaussement complet des dents.

Des solutions existent pour ces patients comme l'allogreffe, l'autogreffe ou l'utilisation de matériaux de synthèses. Mais ces solutions ne permettent pas toujours de s'adapter à toutes les situations cliniques. L'optique de pouvoir régénérer entièrement une arcade maxillaire touchée par une parodontite modérée ou sévère offrirait une solution durable pour des millions de personnes.

Dans l'essai clinique (D'Aquino et al., 2009) les cellules DPSC de la pulpe dentaire ont été prélevées à partir d'une molaire, cultivées et juste avant la greffe déposées sur une matrice de collagène (en guise d'échafaudage). Chez chaque patient, souffrant de parodontite avec perte de matrice osseuse au niveau mandibulaire on a donc deux sites, un recevant la greffe et le deuxième uniquement la matrice de collagène.

Entre le premier et le troisième mois après l'intervention, le site ayant reçu le greffon complet présente une minéralisation beaucoup plus forte, une régénération verticale de l'os cortical et un attachement beaucoup plus solide de la dent. Aucune infection, gêne ou douleur n'est à déplorer.



Images d'immunofluorescence de biopsies de matrice osseuse chez les patients après 3 mois.

Coloration hématoxyline éosine :

- A) Site traité DPSC + matrice collagène
- B) Site ayant reçu la matrice collagène seule

Marquage IF Ostéonectine :

- C) Site traité DPSC + matrice collagène
- D) Site ayant reçu la matrice collagène seule

Marquage IF VEGF :

- K) Site traité DPSC + matrice collagène
- L) Site ayant reçu la matrice collagène seule

L'ensemble de ces résultats est extrêmement encourageant pour le devenir des traitements de telles parodontites, bien que cette étude doive en appeler d'autres afin d'augmenter le nombre de patients inclus et les suivre plus longtemps. Et pourquoi pas, sortir de la sphère crânio-faciale et exploiter la capacité des DPSC à sécréter de la matrice minéralisée pour régénérer divers os du squelette moteur ?

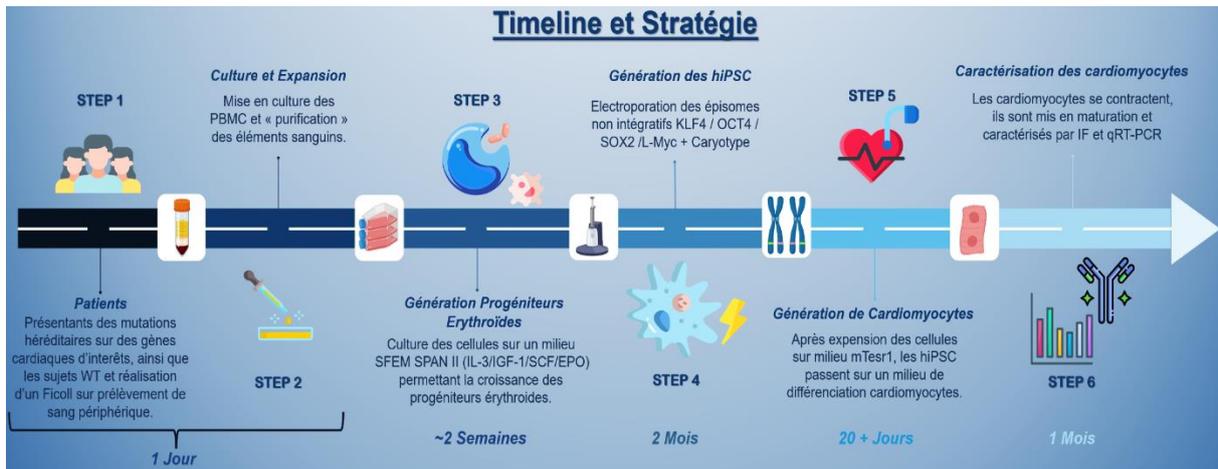
Comme précédemment évoqué, les possibilités d'utilisation des cellules souches semblent virtuellement infinies. Ce qui a été évoqué ici ne relate qu'une infime partie de ce qui a été fait et n'est qu'une goutte d'eau dans l'immensité de ce qu'il reste à faire, mais là est justement tout l'intérêt de ce domaine de recherche : tout reste encore à faire, optimiser et créer. Tous les domaines de la recherche médicale fondamentale et translationnelle peuvent bénéficier de l'apport de ces cellules si particulières, que ce soit en tant que matrice pour comprendre ou comme futur moyen pour guérir.

J'espère que vous prendrez autant de plaisir à lire que j'en ai eu à découvrir...

2. Objectifs

- 1) Le but premier de ce mémoire est de générer de manière stable et reproductible, des lignées hiPSC (human induced Pluripotent Stem Cell) en reprogrammant des cellules PBMC (peripheral blood mononuclear cell) prélevées dans du sang frais à l'aide de facteurs de transcriptions spécifiques. Ces hiPSC seront ensuite différenciées en cardiomyocytes contractiles. Ces cardiomyocytes induits seront caractérisés à des moments clés du processus de différenciation. La caractérisation prendra 2 formes : une analyse par qRT-PCR afin d'étudier les changements du transcriptome des cellules tout au long de cette différenciation à travers l'expression de 10 ARNm spécifiques différents. Mais également une analyse par immunofluorescence qui permettra de confirmer la présence des constituants cellulaires spécifiques des cellules souches et des cellules cardiaques.
- 2) Étant donné qu'aucun protocole de différenciation n'a jamais eu lieu au sein du CARIM, ce mémoire a donc également pour but l'optimisation de l'ensemble des techniques et protocoles que vous y retrouverez, afin de donner à cette reprogrammation de PBMC et leur différenciation en cardiomyocytes induits un caractère « routinier », dont chacune des étapes est maîtrisée tant d'un point de vue de la manipulation en laboratoire, que de l'optimisation des coûts que ce soit en termes temps et de moyens. La finalité de cette partie du mémoire est donc la rédaction d'un protocole complet de reprogrammation et de différenciation des PBMC en cardiomyocytes contractiles à destination du centre de cardiologie expérimentale de l'Université de Maastricht (CARIM).
- 3) L'objectif tertiaire de ce mémoire est la comparaison de deux protocoles de différenciation. Un protocole commercial provenant de la firme GIBCO, et un autre appelé « Small molecules protocol » fourni par un laboratoire de référence de l'Université de Stanford. La comparaison se basera sur les coûts, la facilité de mise en œuvre, la reproductibilité, ainsi que sur les caractéristiques des cellules qui seront générées par les deux protocoles.

3. Les stratégies et hypothèses de travail

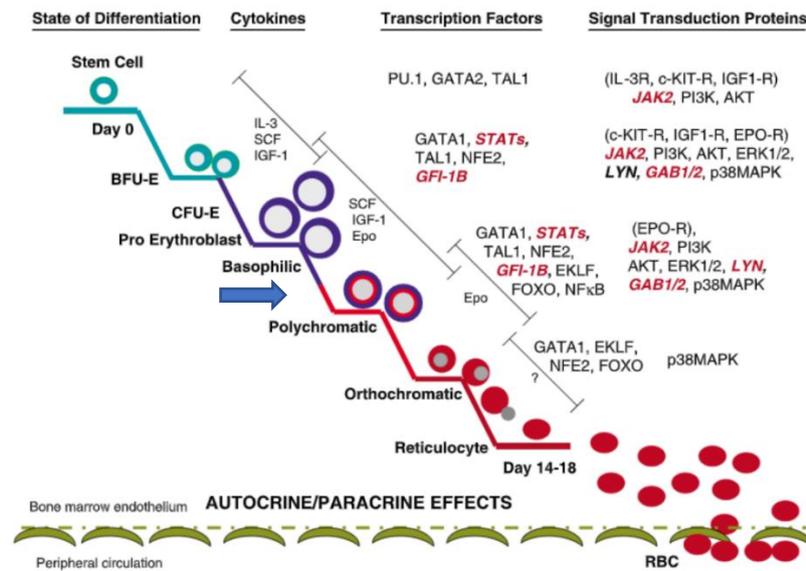


Dans un premier temps, le sang d'un des patients portant les polymorphismes génétiques incriminés, à l'origine de phénomènes arythmiques sévères, sera prélevé dans un tube BD vacutainer hépariné. Ce dernier sera alors traité par une solution de Ficoll, le but de celle-ci est de séparer par gradient de densité les différents constituants sanguins. Les érythrocytes et granulocytes étant plus denses, ils passent lors de la centrifugation, à travers le coussin de polysaccharides contrairement aux lymphocytes et autres monocytes qui formeront, alors, un anneau blanchâtre qui sera prélevé et lavé (Jaatinen & Laine, 2007). Les composants du sérum, nettement moins denses, composeront la première phase de surnageant au-dessus de cet anneau de PBMC.

Partir des PBMC sanguins, permet d'avoir une source de cellules en quantité suffisante et l'intervention demeure très peu invasive pour le patient.

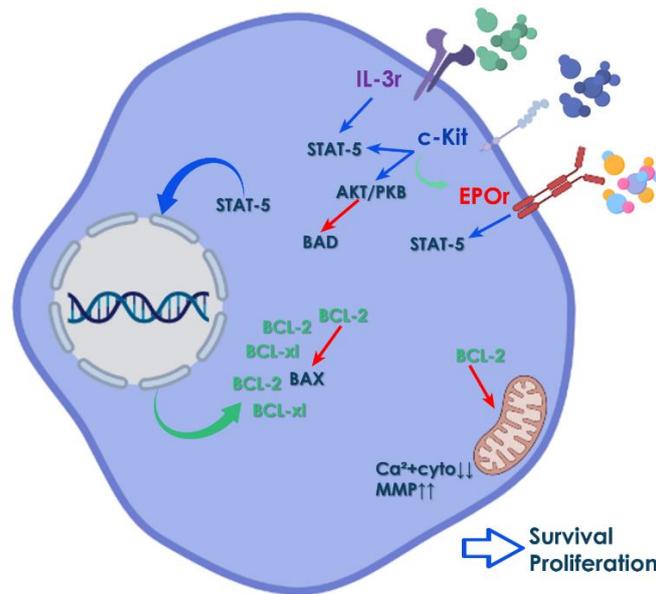
Ces cellules PBMC seront disposées dans du « StemSpan SFEM II » et son mix de cytokines/ facteurs de croissance. Ce milieu, se compose notamment des cytokines et facteurs de transcription tels que l'Interleukine 3 (IL-3), l'Insulin Growth Factor 1 (IGF-1), le Stem Cell Factor (SCF) et de l'Erythropoïétine (EPO).

Les différents composants du milieu agissent concurremment afin de maintenir et d'expandre les PBMC. Dans cette population hétérogène de cellules, se trouvent des progéniteurs érythroïdes. Les différents constituants du milieu vont permettre leur croissance, prolifération et survie. Ce sont eux la véritable cible de ce milieu et également eux qui serviront de base pour la future reprogrammation en hiPSC. Ces progéniteurs érythroïdes sont des cellules immatures qui une fois différenciées donnent les érythrocytes et les mégacaryocytes.



Différenciation des progéniteurs érythroïdes, passage d'un cytoplasme basophile vers un cytoplasme qui se charge en hémoglobine. La flèche bleue indique le stade de maturation désiré. (Wickrema & Crispino, 2007)

Les mécanismes associés à ces différentes cytokines et facteurs de transcription sont nombreux et complexes. L'apoptose cellulaire peut soit être initiée depuis l'extérieur de la cellule via la liaison de facteurs « pro-mort » sur sa surface, soit via une voie intrinsèque qui a comme point de départ la mitochondrie. Lorsque cette dernière est activée, les MPTP (mitochondrial permeability transition pore) s'ouvrent, le calcium intermembranaire quitte la mitochondrie pour le cytoplasme de même que des protéines pro-apoptotiques telles que les pro-caspase 9 ou le cytochrome C. On observe donc une diminution du potentiel membranaire mitochondrial et une augmentation de la concentration en calcium cytoplasmique. Ce calcium est indispensable pour les endonucléases qui sont à l'origine de la dégradation de l'ADN lors de l'apoptose. SCF, IL-3 et EPO agissent tous de concert pour contrecarrer cette voie intrinsèque. EPO, par son récepteur EPOr, active la voie Jak-STAT dont STAT5 se fixe au niveau du promoteur BCL-x qui engendrera la transcription de la protéine anti-apoptotique BCL-xl. SCF, via la voie Pi3k et son récepteur c-Kit, active AKT/PKB à l'origine de la phosphorylation de BAD (pro-apoptotique), ce dernier ne peut plus se fixer à la protéine BCL-2 (anti-apoptotique) qui peut alors pleinement bloquer les mécanismes apoptotiques tels que le blocage de la sortie du cytochrome C hors de la mitochondrie et la liaison avec BAX, pro-apoptotique. De plus la présence en forte concentration de BCL-2 ne permet plus le passage de l'état procaspase vers la caspase activée. Par ailleurs, IL-3 augmente encore plus cette concentration en BCL-2 par l'intermédiaire de STAT5. De son côté, IGF-1 par l'intermédiaire de son récepteur IGF-1r (tyrosine kinase), semble induire la sécrétion par les PBMC de EPO et donc augmenter l'effet anti-apoptotique et de prolifération développé ci-dessus.



Les différents mécanismes permettant la survie et la prolifération des progéniteurs érythroïdes. (MS sur base de (Wang et al., 2007)

Selon la littérature, cet état de « progéniteur » rend les cellules plus aptes sur le plan de l'épigénétique à subir leur reprogrammation complète en cellules souches pluripotentes induites. En effet, étant des cellules elles-mêmes peu différenciées elles sont déjà « armées » pour être entièrement reprogrammées. Les cellules progénitrices, reprogrammées en cellules souches pluripotentes induites, semblent indistinguables des cellules souches embryonnaires du point de vue de leur potentiel de différenciation (Kaneko et al., 2010). Il existe d'autres sources de progéniteurs, mais encore une fois, l'invasivité de la procédure de prélèvement et la disponibilité / quantité de cellules ont orienté le choix vers les PBMC.

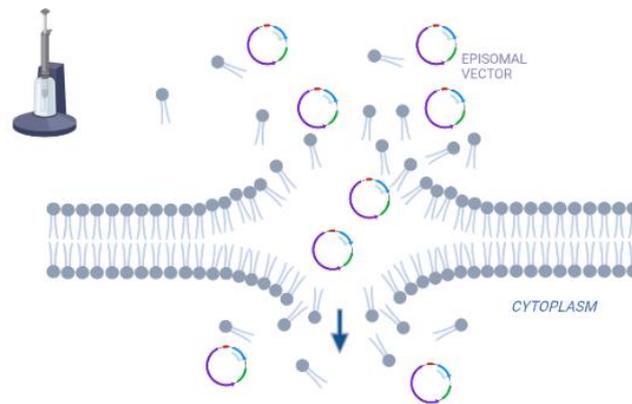
Après un peu moins d'une dizaine de jours de culture, les progéniteurs commencent progressivement à se charger en hémoglobine et changent de morphologie, leurs tailles diminuent légèrement et leur noyau devient hyperchromatique. Au 8^{ème} jour de culture, ce qui correspond à un stade entre le progéniteur érythroïde basophile 2 et le polychromatophile, ces cellules peuvent donc être reprogrammées en cellules souches pluripotentes induites.

Erythroid Development



Développement des progéniteurs érythroïdes étape par étape et la synthèse d'hémoglobine dans le cytoplasme. La flèche indique le stade requis pour entamer la reprogrammation en hiPSC. (Wickrema & Crispino, 2007)

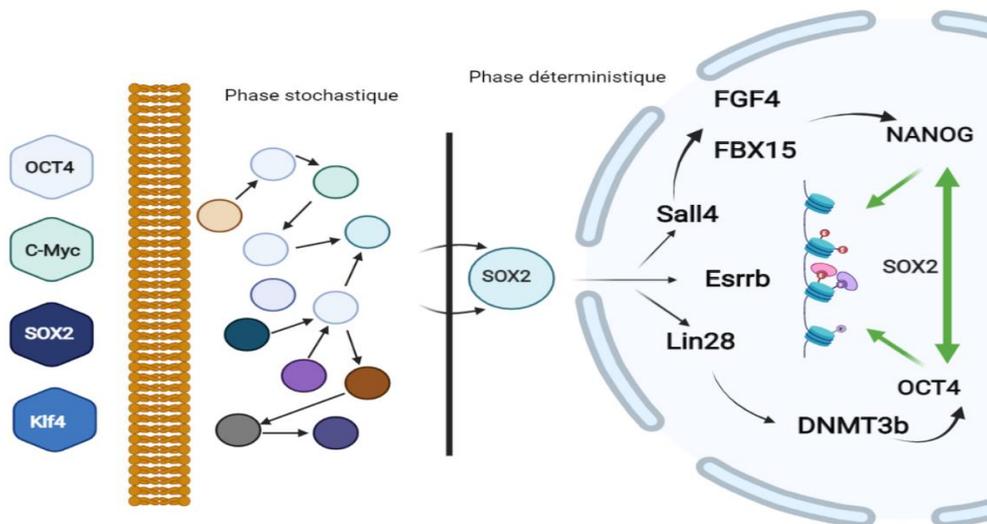
L'électroporation peut alors avoir lieu. L'électroporation est une technique qui consiste en la création de « trous » dans la membrane cytoplasmique des cellules via le passage de celles-ci sous un courant électrique de haute intensité mais de très brève durée.



Principe de l'électroporation selon ThermoFischer. (MS via BioRender)

L'électroporation effectuée, les cellules (fortement fragilisées) sont délicatement remises en culture durant 2 jours. Un contrôle GFP sera également réalisé dans le même temps sur une partie des cellules afin de valider le bon déroulement de la technique. Obtenir des cellules GFP positives confirmera que la technique s'est correctement déroulée même si mortalité cellulaire de la technique reste élevé.

La « solution » d'électroporation contiendra les cellules EPC au jour 8, mais également différents facteurs de transcription inhérents aux cellules souches et responsables de la reprogrammation des cellules progénitrices sanguines, à savoir Oct4/Sox2/Klf4/L-Myc. Ces facteurs sous forme de vecteurs épisomiaux non intégratifs, passeront à travers les « trous » de la membrane plasmique. Une fois traduit sous leur forme protéique dans le cytoplasme de la cellule, ils iront fixer leurs cibles au niveau de l'ADN dans le noyau et induire la reprogrammation des EPC en cellules souches pluripotentes. Ces facteurs de transcription agissent de manière sensiblement différente mais de concert, afin de rendre à la cellule ses caractéristiques transcriptionnelles de pluripotence.

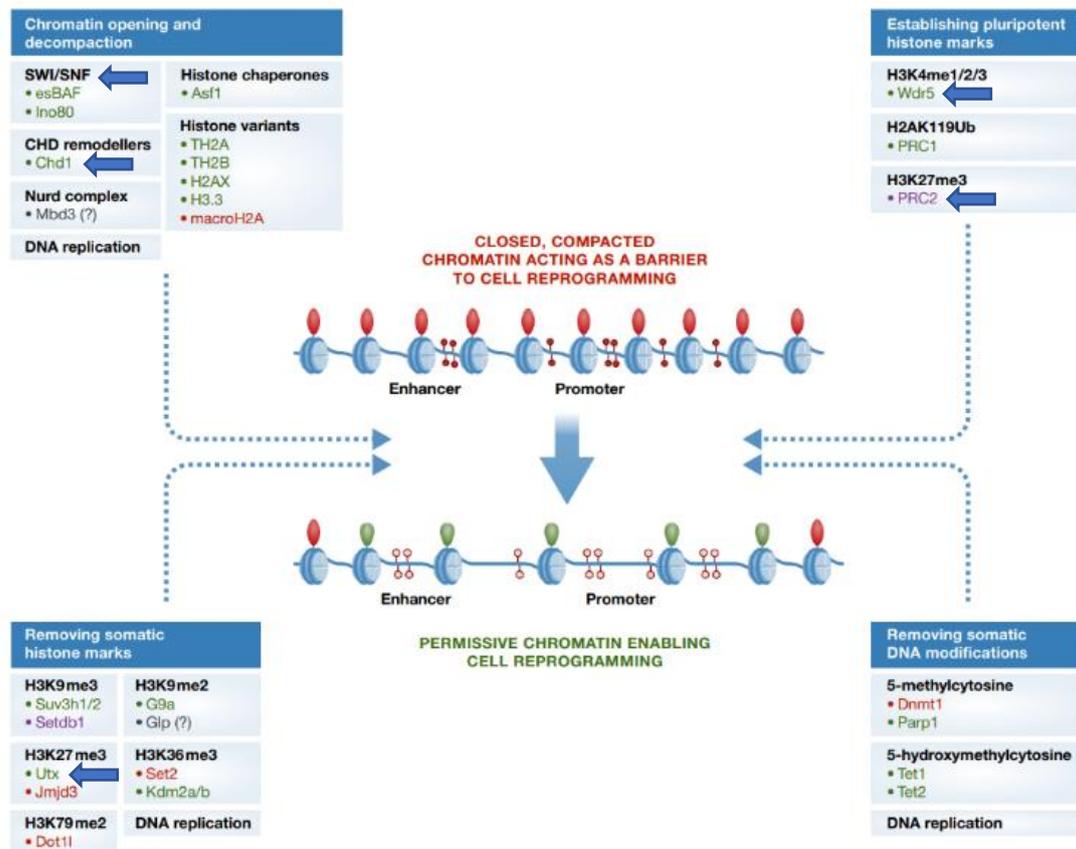


Reprogramming de cellules somatiques en cellules pluripotentes induites par épisomes non intégratifs.

(MS) selon (Kulcenty et al., 2015) via Biorender

Sox2, en début de phase déterministique, conjointement avec Oct4 (exogène dans un premier temps), se lie à des cassettes HMG/POU dont les promoteurs de Nanog, Oct4, FBX15 et FGF4 font partie (Rodda et al., 2005). Ceci afin de réaliser une boucle activatrice positive d'expression de ces gènes. Sox2 est également impliqué dans une autre boucle positive avec PRMT8, une méthyltransférase chargée d'empêcher l'accès à des promoteurs impliqués dans des schémas de différenciation (JEONG et al., 2017). L'induction de DNMT3b permet à la cellule d'adopter un profil de méthylation typique des cellules ES *in-vivo*. Klf4, un facteur de transcription en doigt de zinc de la super famille des TGF- β , engendre une augmentation du nombre de Chd 1 ainsi que la quantité de P21, bloquant le cycle cellulaire et inhibant les protéines pro-apoptotiques telles que P53, BAD et BAX (Ghaleb & Yang, 2017) en phase stochastique. La survie cellulaire est améliorée et les risques de différenciations diminués. Il est également connu pour physiquement interagir avec Sox2, Oct4 et Nanog sur les promoteurs de ces derniers pour réaliser une boucle activatrice positive (Wei et al., 2009) en phase tardive. Oct4 quant à lui, se lie à des sites ectopiques sur plusieurs endroits de l'ADN, activant, *de facto*, différents promoteurs de gènes connus pour maintenir un état de pluripotence (Boyer et al., 2005), dont Sox2 et Nanog. Une fois réalisé, conjointement avec WDR5 et UTX ainsi que le complexe SWI-SNF, des acteurs du remodelage de la chromatine (Ang et al., 2011), Oct4 se lie à son propre promoteur et enclenche sa propre transcription (Patra, 2020). L-Myc (utilisé ici) de son côté, contrairement à son homologue c-Myc, possède un pouvoir transformant bien moindre et semble capable d'induire la génération d'iPSC de manière bien plus efficace que ce dernier. Là où c-Myc engendre l'arrêt de la transcription de certains gènes impliqués dans la différenciation cellulaire et l'induction d'autres gènes donnant des caractéristiques transcriptionnelles de cellules souches et donc potentiellement transformants,

L-Myc supprime uniquement la transcription de gènes impliqués dans la différenciation. Cette différence rend L-Myc plus apte à générer des lignées iPSC exemptes de toutes transformations malignes (Yoshida, 2018). L'ensemble de ces différents facteurs de pluripotence, une fois activés, rendent à la cellule ses pleines capacités de différenciation.



Les différents acteurs du remodelage de la chromatine dont certains sont impliqués dans la reprogrammation de cellules somatiques en cellules souches. (Nashun et al., 2015). Les flèches bleues représentent les principaux acteurs développés ci-dessus.

Les cellules électroporées seront ensuite remises en culture pour expansion dans un milieu de maintenance « ReproTeSR1 » (StemCell technologies) sur des plaques préalablement coatées avec du « Matrigel » (Corning). Le rôle du Matrigel® est de mimer la présence d'une matrice extracellulaire à laquelle les cellules hiPSC pourront adhérer et proliférer (Hughes et al., 2010). On y retrouve les composants classiques de la matrice extracellulaire *in vivo* à savoir des fibres de collagènes de type 4, fibronectines, entactines et protéoglycans. Les cultures des différentes lignées seront suivies et passées comme toutes cultures cellulaires. Juste avant le début de l'étape de différenciation en cardiomyocytes, les cellules souches seront caractérisées sur base de plusieurs marquages d'immunofluorescence. Progressivement, un milieu de maintenance sera ajouté « mTeSR1 » qui sera le milieu définitif des cellules souches jusqu'à leur différenciation.

Une fois en nombre suffisant et après une dizaine de passages, une partie de ces cellules sera traitée de manière à effectuer une analyse du caryotype. L'idée étant de s'assurer de l'absence d'aberrations chromosomiques qui peuvent apparaître après des temps de cultures prolongées. Indispensable car le panel de cellules générées servira de future base à des études de patch-clamp.

En amont, les patients ont également été « screenés » pour s'assurer de la présence des mutations héréditaires sur le gène SCN5a (H558R et F1617del) par technique de Nested PCR et séquençage.

Des aliquotes de ces cellules seront alors créés et congelés dans l'azote liquide comme back-up. Au besoin, ces cellules seront décongelées et sorties de leur milieu de cryopréservation « Cryostor Cell Preservation Media CS10 (Sigma-Aldrich) ».

Les cellules souches induites pourront être caractérisées à travers l'expression des facteurs de pluripotence classiques repris dans le tableau ci-dessous, à la fois par immunofluorescence mais également par qRT-PCR. En fonction du matériel de microscopie qui sera utilisé, il sera possible de distinguer les états de pluripotence des cellules souches induites.

IF	Naives Stem cells	Primed Stem cells
SOX2	Nuclear	Nuclear AND cytoplasm
OCT4	High	Lower
SSEA4	High	Very Low
TRA 1-60	Expressed	Not Expressed
RT/q-PCR		
SOX2	High	Low
NANOG	High	Low
OCT4	High	Low

Caractérisées et cultivées en nombre suffisant, les cellules seront préparées à la différenciation. Un changement de milieu sera effectué dans l'E8 Medium (Thermo Fischer Scientifics) un inhibiteur de Rho GTPase (Rock inhibitor) sera ajouté, ce qui boostera la survie cellulaire. Dès le 4^{ème} jour, l'addition du premier milieu de différenciation entamera la différenciation des hiPSC en cardiomyocytes. Il deviendra important durant cette période d'avoir suffisamment de cellules pour effectuer parallèlement la caractérisation. D'une part s'assurer par technique de RT-qPCR de la disparition graduelle des marqueurs de pluripotences (Sox2/Nanog) mais également de l'apparition de marqueurs de la transition mésodermique qui s'effectuera sur les cellules.

qRT-PCR	Mesodermal transition State
Brachyury (T-Box) (TBXT)	+

Entre le 10^{ème} et le 15^{ème} jour, la différenciation se terminant, des cardiomyocytes contractiles précoces seront mis en évidence. Des marqueurs spécifiques « classiques » des cellules musculaires cardiaques matures, à savoir la Connexine 40 (CX40), la Troponine T cardiaque (TnTc) et l'alpha-actine sarcomérique seront utilisés. Leur présence servira à démontrer que ces cellules contractiles sont bien des cardiomyocytes et donnera, potentiellement, un aperçu de l'organisation des fibres contractiles intracytoplasmiques. La culture se poursuivra pendant 1 à 2 mois afin d'obtenir une maturation de ces cardiomyocytes et la mise en place d'autres marqueurs plus spécifiques à travers la distinction de plusieurs populations de cellules cardiomyocytaires.

Dans un souci de curiosité scientifique, et parce que dans une culture cellulaire, toutes les cellules ne sont pas en contact avec les différents constituants du milieu de différenciation de manière égale, elles peuvent prendre des chemins de différenciation différents aboutissant par exemple, à un destin « ventriculaire » ou « atrial ». Différents marqueurs spécifiques de ces populations cellulaires seront appliqués aux cultures.

IF	Ventricular CardioM	Atrial CardioM	Cardiomyocytes
CX40			+
Alpha-Actinine sarcomérique			+
TnTc			+
MLC2V	+	-	
MLC2a	-	+	
RT/q-PCR			
IRX4	+	-	
KCNJ3	-	+	
NR2F2	-	+	
MYL2	+	-	
MYH6	+	-	
TNNT2/TnTc			+

Un second protocole de différenciation sera également utilisé. Protocole pour l'heure confidentiel venant du laboratoire de référence de l'Université de Stanford et appelé « Small Molecules Protocol ».

Une comparaison en termes de coûts, de facilité de manipulations, de temps et de disponibilité des différents réactifs sera faite. Un protocole standard de « Reprogrammation de PBMC en hiPSC et différenciation en cardiomyocytes » sera rédigé et gardé au sein du laboratoire de cardiologie expérimentale de l'Université de Maastricht afin de pouvoir répéter l'ensemble des manipulations qui vont suivre de manière routinière et optimisée.

4. Matériel et méthode

4.1. Isolation des PBMC du sang périphérique (Ficoll).

Matériel	Fabricant	Référence
Histopaque 1077	Sigma	10771
DPBS 10X stérile	Gibco	14200-067
EDTA 0,5M pH8	Invitrogen	AM9260G
Plaque 6 puits	Corning	3506

4 tubes de sang de 10 ml sont prélevés chez les « patients » ainsi que chez les sujets WT dans des tubes vacutainers héparinés. Le sang frais est directement pris en charge. Le sang est dilué à 50% dans du PBS 1X + 200µL EDTA 0,5M.

Dans un falcon de 50ml, 1 volume de Ficoll Histopaque®1077 pour deux volumes de sang dilué, soit 24ml de solution sanguine pour 12ml de solution de Ficoll utilisée pure à température ambiante. Le Ficoll est déposé en premier et la solution sanguine délicatement ajoutée au-dessus, pour éviter la lyse des globules rouges. La centrifugeuse est thermostatée à 20°C et programmée à 400g pendant 30 mins, sans frein et avec accélération lente.

Le sérum (phase jaune) est aspirée et éliminée jusqu'à la limite de l'anneau blanchâtre contenant les PBMC. Les cellules peuvent être directement cultivées dans des plaques 6 puits en re-suspendant le culot de cellules dans du milieu de culture. La plaque sera ensuite incubée à 37 degrés et 5% de CO₂.

4.2. Mise en culture des PMBC et expansion des progéniteurs érythroïdes.

Une fois récoltés, les monocytes sanguins peuvent être mis en culture pour expansion.

Matériel	Fabricant	Référence
Plaque 6 puits	Corning	3516
STEM SPAN SFEM II	Stem cell Technologies	09655
Cryostor CS10	Sigma	C2874
Cellules de Bürker -Türk	Brand	631-1159
Bleu de trypan 0,4%	Gibco	15250061

Le milieu de culture Stemspan FEM II nécessite l'ajout de cytokines et facteurs de croissance spécifiques à la prolifération des progéniteurs érythroïdes présents parmi les PBMC. Il est préparé comme suit :

Réactifs	Fabricant	Référence	Concentration Stock	Volume
STEM SPAN SFEM II	Stem cell Technologies	09655	/	10ml
IGF-1	Confidentiel	?	40µg/µL	10µL
EPO	Confidentiel	?	?	10µL
IL-3	Confidentiel	?	10µg/µL	10µL
SCF	Confidentiel	?	100µg/mL	10µL
Dexamethasone	Confidentiel	?	3,5mg	1µL
Pénicilline/Streptomycine	Eurobio scientific	CABPES01-0U	10000UI/ml	100µL

Le culot de cellules est re-suspendu dans 2ml de StemSpan FEM II à température ambiante et 10µL de cellules sont prélevées et mélangées avec 10µL de bleu de Trypan. Le mélange est disposé sur une cellule de burker-turk pour comptage, ainsi que pour avoir un aperçu de la mortalité cellulaire. Le reste des cellules est mis en culture pour expansion à 37°C / 5% CO₂.

Tous les 2 jours les cellules seront récoltées, centrifugées à 300g pendant 5 mins à température ambiante. Le culot sera re-suspendu dans 6ml de milieu complet StemSpan SFEM II (préparé extemporanément) et les cellules remises en culture dans 3 puits toujours dans les mêmes conditions. Cette phase de re-suspension est le moment de noter l'apparition de l'hémoglobine au cours du temps et déterminer le meilleur moment pour la reprogrammation. Ce procédé durera 8 jours.

4.3. Reprogrammation des EPC et génération des hiPSC.

Les cellules au jour 8 de leur culture, présentent l'apparence souhaitée. La cible est une cellule présentant les caractéristiques morphologiques du progéniteur érythroïde polychromatophile. Cela se traduit par une baisse nette de la basophilie des cellules et l'apparition évidente d'hémoglobine dans le cytoplasme (lors des centrifugations, les cellules donnent un culot blanchâtre qui, au fil du temps, devient rosé). Le noyau des cellules devient hyperchromatique et diminue, la cellule possède à ce stade une forme très ronde.

Le kit d'électroporation utilisé ici est fourni par la société Invitrogen « Neon™ Transfection System » qui fournit également les vecteurs épisomiaux non intégratifs SOX2/KLF4/OCT4/L-MYC et le témoin GFP.

Matériel	Fabricant	Référence
Neon™ Transfection System	Invitrogen	MPK5000
Epi5™ Episomal iPSC Reprogramming Kit	Invitrogen	A15960
Pmax-GFP (Episomal vector)	SIGMA Aldrich	D00077
DMEM F12	GIBCO	11330-32
STEM SPAN SFEM II + "Cytokines"	Stem Cell Technologies	09655

Les cellules sont récoltées de leur puit et disposées dans un Falcon de 15ml. Elles sont ensuite centrifugées à 300G pendant 5 mins à température ambiante. Le culot est re suspendu dans 1ml de DMEM-F12 préchauffé. Les cellules sont ensuite comptées, environs 4 millions de cellules sont nécessaire.

Préparations requises en amont :

- Préparer 2 plaques 6 puits dont un puit doit contenir 2 ml de milieu Stemspan SFEM II complet, les autres puits seront remplis avec 2 ml de PBS 1X. Les plaques seront mises à incuber jusqu'à ce que les cellules soient électroporées.
- Préparer 2 tubes Eppendorf de 1,5ml. Le premier contiendra 1µL de solution Epi5™ Episomal iPSC **A** et 1µL de solution Epi5™ Episomal iPSC **B**. Le deuxième contiendra 2µL de Pmax-GFP D00077 qui sera le contrôle de la technique en elle-même.
- Paramétrer la machine d'électroporation avec les réglages : 1600 Volts / 10ms / 3 pulses.



Organisation de l'appareillage d'électroporation. La solution de cellules à électroporer est enfermée dans le tips de la pipette d'électroporation et celui-ci en contact avec une solution ionique. Les plaques de cultures contiennent déjà le milieu de culture préchauffé et recevront directement les cellules, fortement fragilisées, après le passage du courant.

Pour le reste de la manipulation, le protocole du fournisseur a été suivi à la lettre. Les cellules retournent ensuite à l'incubation durant deux jours.

4.4. Expansion des cellules souches pluripotentes induites.

Les cellules électroporées, toujours dans leur milieu complet StemsSpan SFEM II, reçoivent un complément de 500µL de ReproTeSR™ au 3^{ème} jour et au 5^{ème} jour après leur reprogrammation. Ce milieu spécifique fera la transition entre le milieu de culture des PBMC et le futur milieu de culture définitif des cellules souches, mTeSR1™.

Matériel	Fabricant	Référence
ReproTeSR medium	Stem Cell Technologies	05926
mTeSR1	Stem Cell Technologies	85850
Matrigel	Corning	354248

Au 6^{ème} jour, les cellules, toujours en suspension dans le milieu de culture, sont récoltées et disposées dans un Falcon contenant 6ml de ReproTeSR. La solution cellulaire est ensuite passée dans 9 puits d'une plaque 12 puits coaté avec du Matrigel et remise à incuber.

Les changements de morphologie sont observés pendant une vingtaine de jours et le changement de milieu est quotidien. Au 21^{ème} jour, les cellules (souches induites) sont passées dans leur milieu définitif mTeSR1.

4.5. Vérification de la stabilité caryotypique des cellules hiPSC générées.

La cohorte WT CARIM1 S1 est vérifiée après 10 passages par caryotype, afin de s'assurer qu'elles ne présentent pas d'aberrations caryotypiques qui mettraient un terme à leur utilisation ultérieure.

Le protocole est fourni par le service de génétique de l'hôpital de Maastricht (UMC+). Les cellules sélectionnées sont en phase de croissance, la confluence doit être d'environ 50% ou moins.

Réactifs	Fabricants	Références	Volume /concentration
Colcémide	GIBCO	15210-040	1ml à 0,05µg/ml
TrypLE 1X	GIBCO	12604013	1X
KCL	Sigma Aldrich	7447-40-7	0,075M

Les cellules sont dans un premier temps détachées de leur Matrigel via le TrypLE 1X à raison de 1ml par puit (plaque 6 puits), l'incubation dure environ 3 mins. Les cellules sont alors récoltées dans leur milieu de culture adjuvanté de « rock inhibitor ».

Une centrifugation est effectuée et le surnageant est enlevé, la solution de colcémide (blocage de l'étape de métaphase) est ajoutée aux cellules et celles-ci placées en incubation à 37°C pour 30 mins. Les cellules sont centrifugées, et re-suspendues dans une solution de KCL (choc osmotique et libération des chromosomes) et mises à incuber une dizaine de minute. Les cellules subissent ensuite 3 cycles de fixation-centrifugation avec une solution de méthanol - acide acétique (3 :1). Elles sont ensuite conservées dans cette solution et apportées au service de génétique où le caryotypage sera effectué.

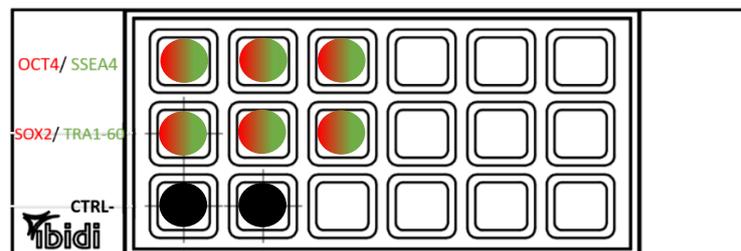
4.6. Caractérisation des hiPSC par immunofluorescence.

Le puit sélectionné sur la plaque 6 puits présente une confluence entre 60 et 70% et est exempt de contamination, à savoir la présence de cellules différenciées non désirées.

Le travail d'immunofluorescence sera réalisé dans une « 18 wells chamber » (IBIDI) préalablement « coatée » avec du Matrigel®. Les cellules seront passées le jour avant le marquage dans cette plaque. 2ml de milieu de culture mTser1 contenant les cellules souches seront repartis à raison de 100µL par puits. La plaque IBIDI sera alors mise à incuber une nuit.

Le marqueur DAPI fait également partie du kit mais ne sera pas utilisé, il lui sera préféré le « DAPI Fluoromount-G® » qui est un milieu de montage couvre-objet contenant directement le marqueur nucléaire. Pour le reste, le protocole fabricant a été respecté.

Les contrôles négatifs seront les anticorps primaires sans les anticorps secondaires.



Organisation de la plaque « 18 wells chamber » et la répartition des puits de culture et des marquages effectués.

Tableau des concentrations et volumes requis pour l'ensemble de la manipulation.

Le kit utilisé est fourni par Invitrogen « PSC immunochemistry KIT » ref : A 24821 / LOT : 2416860.

Réactifs	Concentration initiale	Volume Total	
Fixative solution	1X	800µL	
Permeabilization buffer	1X	800µL	
Washing buffer	10X	240µL(dans MQ)	
Blocking Buffer (BB)*	1X	2000µL	
Anticorps Primaires*		Volume requis	
Anti-OCT4**	200X	4 X 0.5µL	
anti-SSEA4	100X	4 X 1µL	
anti-SOX2	100X	4 x 1µL	
anti-TRA-1-60	100X	4 X 1µL	
Anticorps Secondaire*		Volume requis	
Alexa Fluor™ 594 goat anti-rabbit**	200X	3 X 0.5µL	
Alexa Fluor™ 488 goat anti-mouse	250X	3 X 0.4µL	
Alexa Fluor™ 488 donkey anti-rat	250X	3 X 0.4µL	
Alexa Fluor™ 594 goat anti-mouse	250X	3 X 0.4µL	
Matériel additionnel	Fabricant	Référence	Volume/ dilution
DAPI Fluoromount-G®	Southern Biotech	0100-20	20ml/1X
µ-Slide 18 Well Glass Bottom	IBIDI	81817	100µL

* Les solutions d'anticorps sont diluées dans le blocking buffer. ** Optimisation faite en amont a révélé que l'anticorps secondaire prévu pour OCT4 ne donnait pas un signal suffisant, aussi l'anticorps primaire et secondaire ont donc été changés par respectivement : ABCAM AB19857 et Invitrogen A11012 (dans le tableau).

La plaque sera observée sous microscope automatisé Cytation 5® de Agilent au grossissement 200X.

4.7. Différenciation des hiPSC en cardiomyocytes contractiles avec le kit Gibco®.

Les cellules peuvent entamer le processus de différenciation. Le puit sélectionné présente une confluence entre 70 et 80%. Le puit est passé dans une plaque 12 puits afin d'optimiser le nombre d'observations et de conditions, ainsi que les quantité de réactifs utilisés.

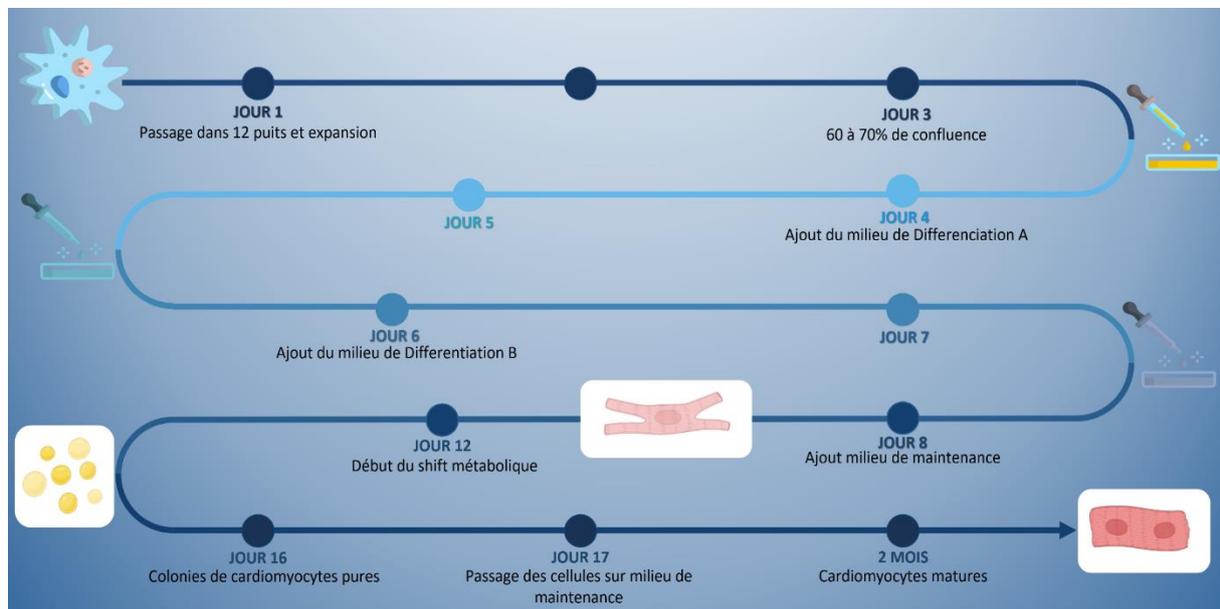
Le protocole utilisé ici est celui de GIBCO « PSC Cardiomyocytes Differentiation kit » ref : A29212-01.

Il est composé de 3 milieux de cultures « commerciaux » dont la composition est en grande partie inconnue : « cardiomyocytes differentiation medium A et B » ainsi que le « cardiomyocytes maintenance medium ».

Un milieu de sélection/ enrichissement sera composé selon les guidelines de GIBCO. Il est destiné à purifier la culture de cardiomyocytes en induisant un shift métabolique (privation de glucose, acidification du milieu), le but est d'induire une forte mortalité chez les cellules qui ne sont pas des cardiomyocytes.

5 phases principales auront lieu :

- Expansion des hiPSC
- Induction de la différenciation en cardiomyocytes
- Sélection métabolique
- Passage des cardiomyocytes contractiles
- Maintenance et maturation des cardiomyocytes.



La chronologie théorique de la différenciation des hiPSC en cardiomyocytes contractiles in vitro selon GIBCO. (MS)

Réactifs requis pour le jour 1 de la différenciation des hiPSC en cardiomyocytes contractiles.

Réactifs	Fabricant	Référence	Concentration	Volume final
E8 Medium	GIBCO	A1517001	/	10ml
TrypLE™ Selected Enzyme 1X	GIBCO	A1217701	1X	1ml
Rock inhibitor	ABCAM	ab120129	1 /2000	10µl
12 wells plate	SIGMA	SIAL0513	/	1ml
Matrigel	Corning	354248	/	12 X 1ml
DMEM F12	GIBCO	11320033	/	12.5ml

Composition du milieu de sélection/ enrichissement.

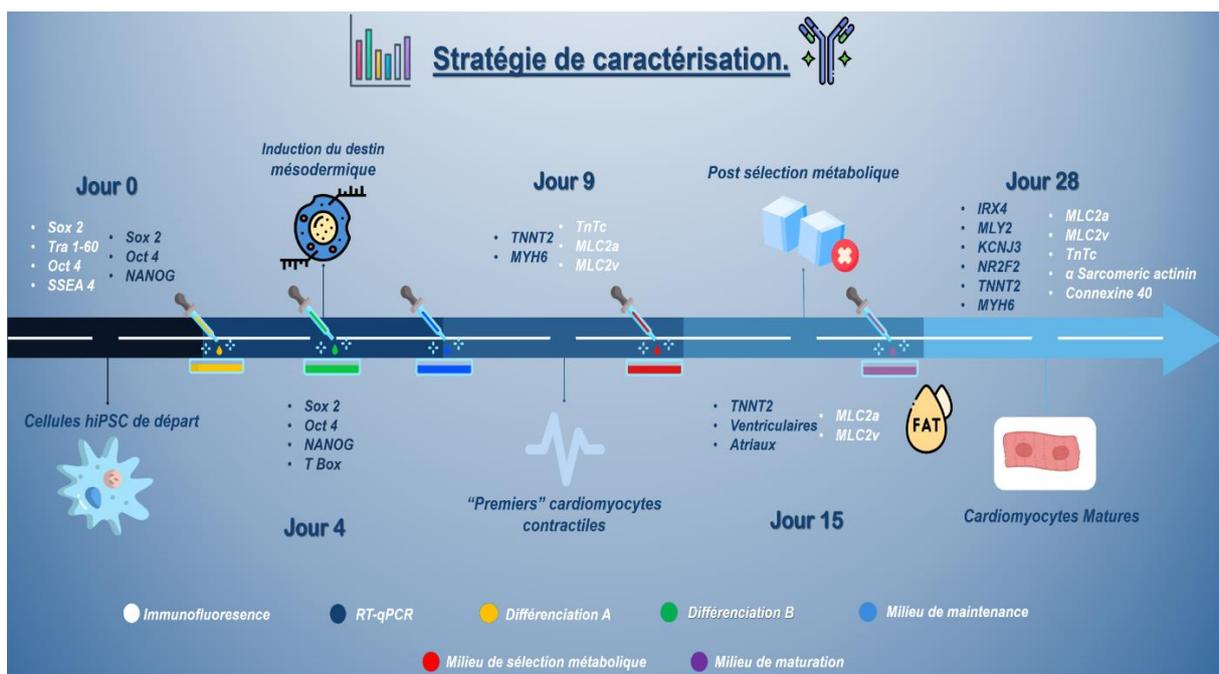
Matériel	Fabricant	Référence	Concentration finale	Volume
RPMI1640 sans glucose	GIBCO	11879020	/	49,68ml
Beta-Mercaptoéthanol	SIGMA Aldrich	444203	0,1mM	100µL
Lactate de Sodium 60%	SIGMA Aldrich	L1375	4,4mM	220µL

Protocole de différenciation d'hiPSC en cardiomyocytes contractiles.

PRE-REQUIS : Commencer avec une culture entre 65 et 80% de confluence. Au préalable, préparer une plaque 12 puits « coatée » avec du Matrigel. Préchauffer à 37°C le milieu E8+Rock inhibitor ainsi le que TrypLE™ 1X Enzyme.

Guidelines générales : les cellules une fois passées doivent pousser au moins 2 jours et atteindre une confluence comprise entre 60 et 70% et les colonies doivent être espacées. Le milieu de différenciation A peut alors être ajouté (1ml) et sera remplacé par le milieu de différenciation B 48H plus tard. De nouveau 48H plus tard, le milieu de maintenance est à son tour ajouté. La suite du protocole dépendra de la réaction des cellules, la manière dont elles battent et l'architecture qu'elles prennent. La sélection métabolique aura lieu entre 2 et 4 jours. Les cardiomyocytes sont alors passés et mis en culture dans du milieu de maintenance adjuvanté d'acide oléique pour une période prolongée (maturation).

4.8. Caractérisation des cellules par qRT-PCR et Immunofluorescence.



La caractérisation prendra 2 formes, une analyse par immunofluorescence sur des cultures cellulaires fixées au formaldéhyde 4%. Et une analyse par RT-qPCR qui mettra en évidence les propriétés transcriptionnelles des cellules à différents instants de leurs processus de différenciation vers le cardiomyocyte contractile mature.

L'extraction de l'ARN messager des cellules en différenciation a été réalisé par traitement de celles-ci avec du Trizol « TRI-reagent » fourni par la société Zymo Research (ref : R2050-1-200) et la purification / isolation de celui-ci a été réalisé via le kit Direct-zol RNA Miniprep Plus (ref : R2070).

Transcriptase inverse

Le kit est fourni par Invitrogen « M-MLV Reverse Transcriptase » (ref : 28025013) et comprend le buffer, l'enzyme et une solution de DTT 0,1M. Le reste des réactifs nécessaires figurent dans le tableau ci-dessous :

Réactifs	Fabricant	Référence
dNTP mix 10mM	ThermoFischer	R0192
Random Primer 50-250ng	ThermoFischer	48190011
mRNA 1-500ng	/	/

Le protocole fabricant a été suivi à la lettre. 100ng d'ARNm ont été utilisé par réaction.

Concentrations obtenues après 2 extractions ARN et après rétrotranscription en cDNA :

Conditions échantillons	Concentrations après extraction ARNm 1	Concentrations en cDNA après RT 1	Concentrations après extraction ARNm 2	Concentrations en cDNA après RT 2
Jour 0 hiPSC WT	311,3ng/μL	933ng/μL	334ng/μL	1093ng/μL
Jour 3 Induction Mésodermique	82, 2ng/μL	1093ng/μL	198ng/μL	1617ng/μL
Jour 9 cardiomyocytes contractiles	70,8ng/μL	1235,6ng/μl	80,3ng/μL	1859ng/μL
Jour 15 après sélection métabolique	10ng/μL	1217ng/μl	38ng/μL	761,3ng/μL
Jour 28 cardiomyocytes « matures »	0,4ng/μl	1295ng/μl	1,9ng/μL	1200ng/μL

Quantitative Polymerase chain reaction

L'analyse est réalisée sur l'automate BIO-RAD CFX Opus 96 et celui-ci paramétré comme suit :

- 95°C → 10 mins
 - 94°C → 15 sec
 - 63,9°C → 30 sec
 - 72°C → 1 min
 - 95°C → 1min
- } 44X

La totalité des primers spécifiques sont fournis par la firme IDT™ et leur concentration a été ramenée à 10µM. La liste et la séquence de ceux-ci est disponible en annexe. iQ™ SYBR® Green Supermix (ref : 1708886) de la firme BIO-RAD sera utilisé comme mix pour la quantification lors de la qPCR.

La quantité de cDNA nécessaire est fixée à 1µg/25µL.

Le master mix standard :

Réactifs	Volume
SYBER IQ MIX	12µL
ddH ₂ O (PCR grade)	9µL
10µM Primer F	1µL
10µM Primer R	1µL
cDNA dilué	2µL

Les 11 marqueurs choisis seront utilisés pour toutes les étapes de la différenciation, chaque fois en duplo, et chaque duplo provient de deux différenciations distinctes dont le protocole est identique afin d'augmenter la robustesse des résultats. Ces résultats seront traités par quantification relative selon la technique du double Δ Ct grâce à un gène de référence L7 (housekeeping) et selon deux modalités : Chaque étape de différenciation sera traitée de manière singulière et l'expression relative de chaque ARNm sera normalisé par le gène L7. La deuxième modalité sera de considérer l'étape de différenciation « Jour 0 hiPSC » comme la norme d'expression de chaque marqueur et de comparer la variation d'expression de ces derniers aux différentes étapes de la différenciation pour obtenir un « fold change expression ».

Immunofluorescence

Les cellules seront fixées directement dans leur boîte de culture ou plaque IBIDI® avec une solution de formol 4% durant 20 mins et ensuite perméabilisé durant 15mins avec une solution de PBS 1%/ BSA 1% / Triton 0,1%. Une étape de blocage sera effectuée durant 1H à température ambiante. Les anticorps primaires seront dilués dans la solution de BSA 1% et mis à incuber dans les plaques de culture durant toute une nuit à 4°C. Les plaques seront rincées au Tween 0,2% et les anticorps secondaires mis à incuber durant 1H à température ambiante.

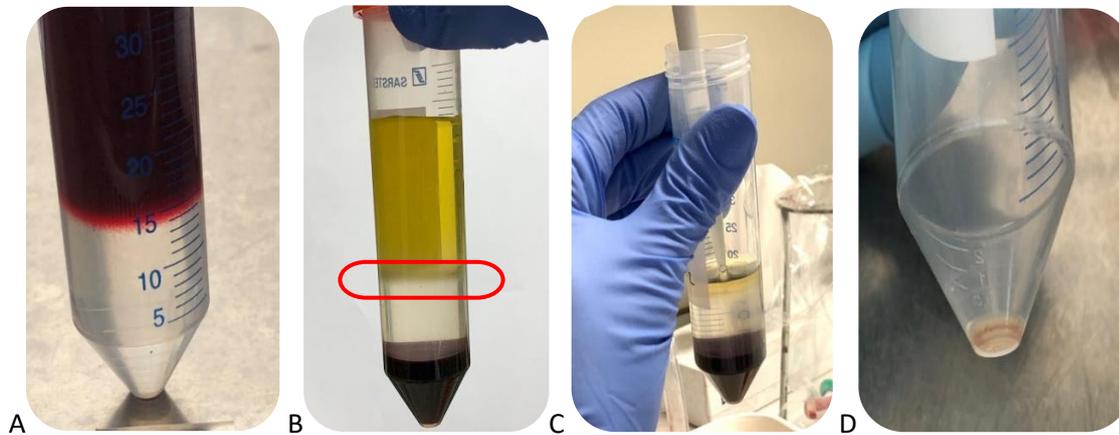
Les cultures de cellules seront observées au 200X, sur plaques Ibidi® ou directement dans leur plaques de culture sous microscope Cytation 5™ (épifluorescence) de la firme Agilent Biotek

Anticorps et dilutions utilisées ci-dessous :

Anticorps	Fabricants	Références	Dilutions
Connexine 40 (Rabbit)	Merck	AB1726	200X
Troponine T Cardiaque (Mouse)	R&D System	RND-MAB 1874	50X
α Sarcomeric actinine (Mouse)	Abcam	AB9465	50X
MLC2a (Mouse)	Synaptic Sytsem	311011	200X
MLC2v (Rabbit)	ProteinTech	10906-1-AP	200X
DAPI	Sigma-aldrich	D9542	2000X
Anticorps secondaires			
Goat anti-Rabbit IgG Alexa Fluor™ 488	Invitrogen	A-11008	500X
Goat anti-Mouse IgG Texas Red-X	Invitrogen	T-862	1000X

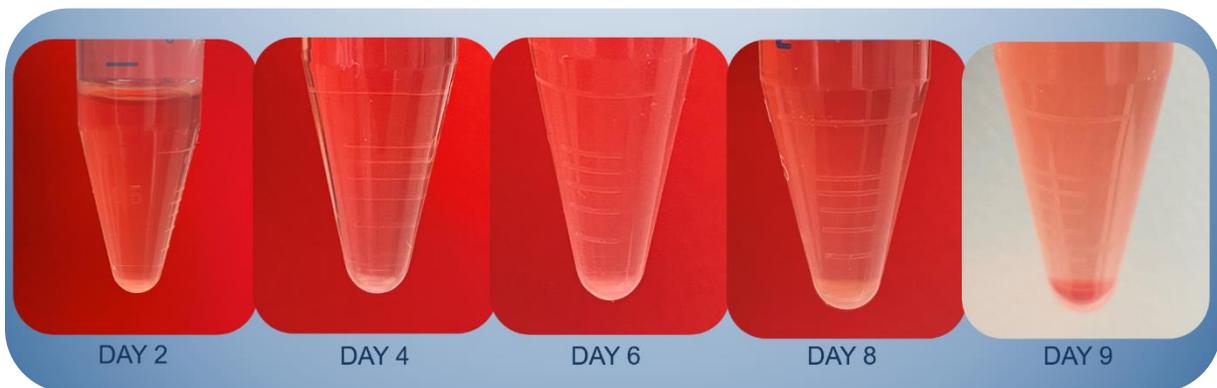
5. Résultats

5.1. Isolation des PBMC par technique Ficoll.



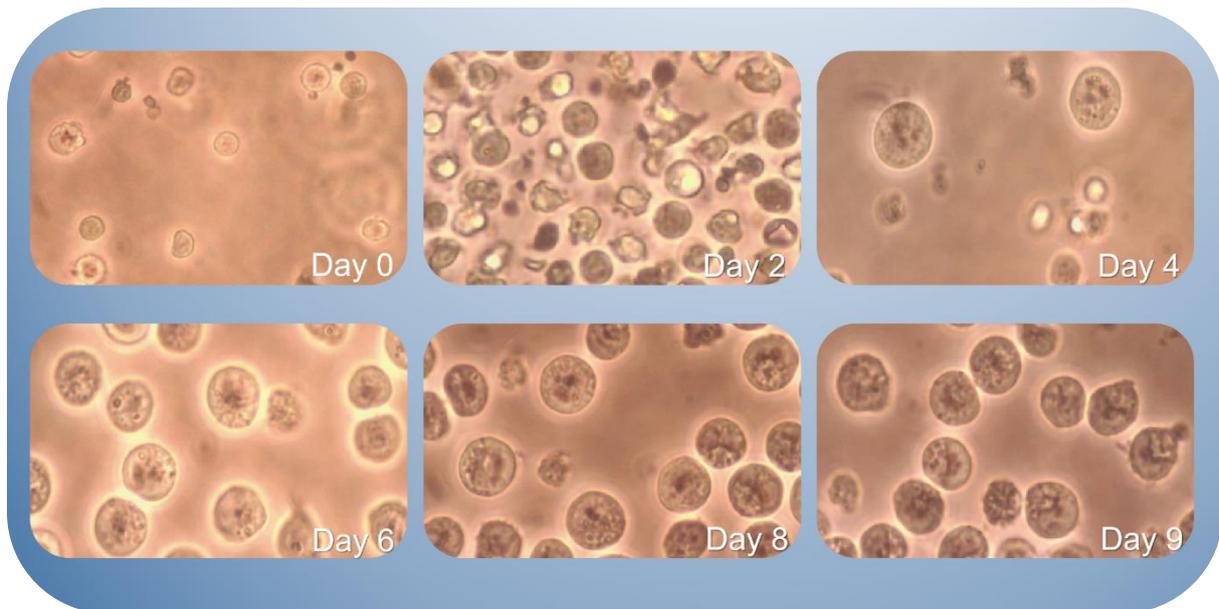
Résultat 1 : De gauche à droite : A) le dépôt de la dilution de sang sur la solution de Ficoll. B) Après centrifugation, la séparation des constituants sanguins et apparition de l'anneau contenant les monocytes. C) Aspiration de la couche de sérum avant prélèvement des monocytes. D) Après 2 rinçages, les PBMC sont concentrés dans le culot. L'apparence rosée est due à des érythrocytes résiduels.

5.2. Mise en culture et expansion des PBMC.



Résultat 2 : Succession des étapes de culture et de centrifugation des progéniteurs érythroïdes dans leur milieu de culture STEM SPAN SFEM II au cours du temps.

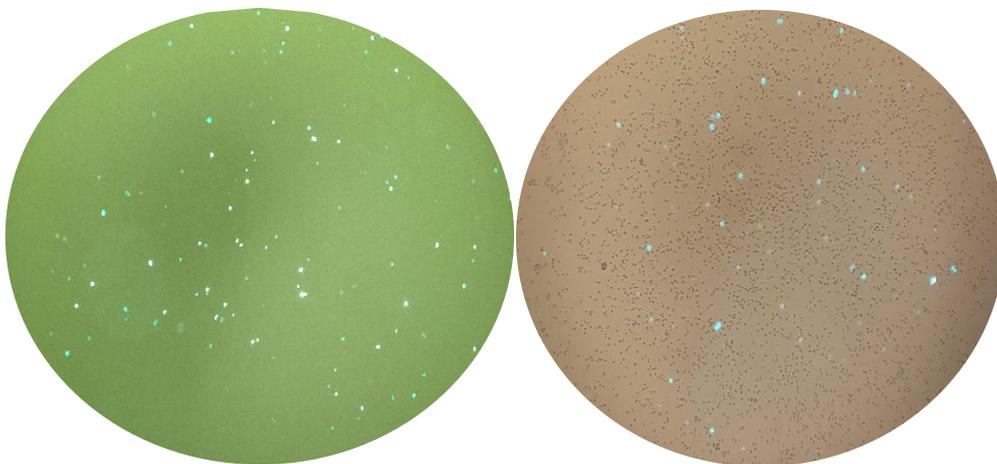
Apparition au cours du temps d'une teinte rosée au fur et à mesure de l'expansion des progéniteurs érythroïdes dans leur milieu spécifique. Ce qui est synonyme de début de synthèse d'hémoglobine dans leur cytoplasme. La cible est le jour 8, la teinte est très légèrement rosée et l'expansion des cellules suffisante pour être électroporées. Au jour 9 les progéniteurs sont trop différenciés pour être reprogrammés car l'étape « réticulocyte » a déjà été amorcé pour la majorité d'entre eux (perte progressive du noyau).



Résultat 3 : Observation au microscope grossissement 200 et 400X des PBMC mit en culture dans le STEM SPANFEM II.

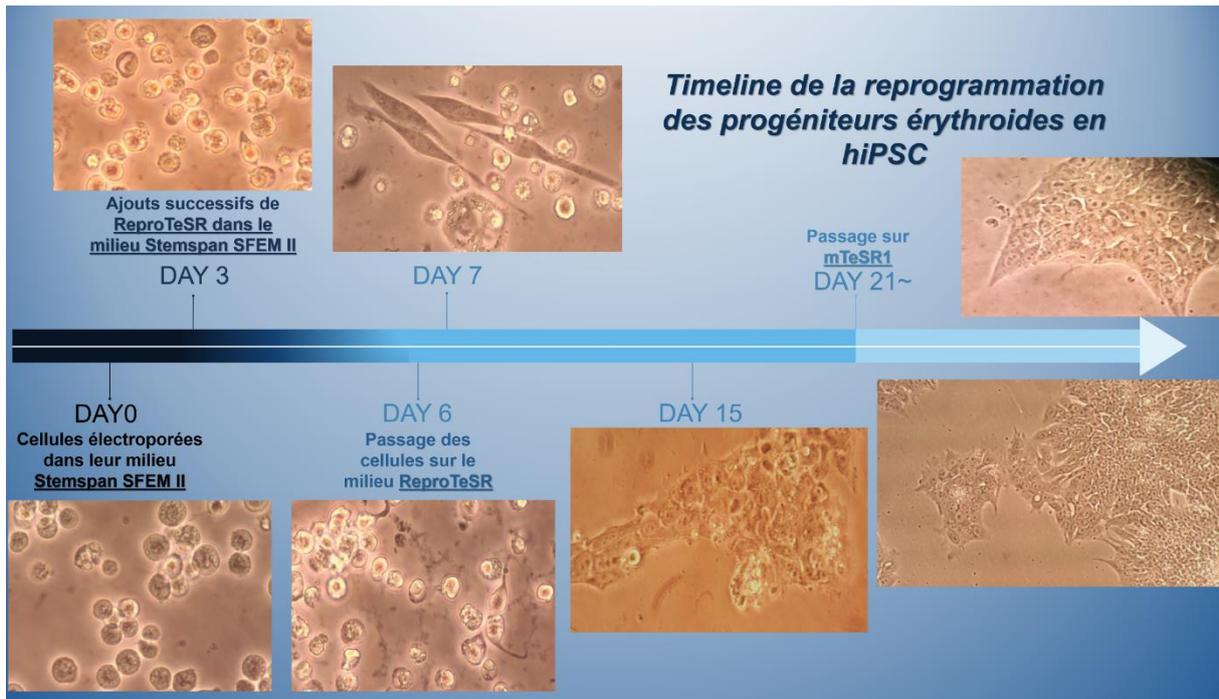
Il est observé une population très hétérogène de cellules ainsi qu'une mortalité élevée en début de culture. Au 4^{ième} jour, seules demeurent de larges cellules très rondes dont le noyau devient hyperchromatique au cours du temps : Les progéniteurs érythroïdes

5.3. Electroporation des PBMC et génération des cellules hiPSC.



Résultat 4 : Contrôle positif des progéniteurs érythroïdes observés au jour +2 après leur électroporation avec l'épisme non intégratif contenant la GFP. Observé au grossissement 100X sous microscope à fluorescence.

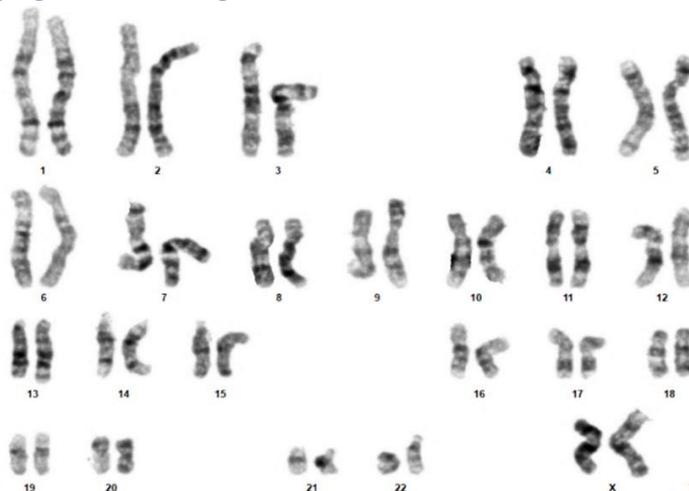
Présence de cellules exprimant la GFP 2 jours après l'électroporation (1 millions de cellules électroporées). Ce résultat indique que l'électroporation s'est correctement déroulée. Il est sous-entendu qu'il en va de même pour le pool cellules électroporées avec les vecteurs épisomiaux non intégratifs (2 millions de cellules électroporées) contenant les séquences nécessaires à la transcription d'Oct-4 / Sox2 / Nanog et Klf4. Ce qui est attendu par la suite est une mortalité élevée mais également un changement drastique de morphologie chez les cellules survivantes.



Résultat 5 : Changements de morphologie des progéniteurs érythroïdes au cours du temps, après reprogrammation par électroporation des facteurs de pluripotences. Ainsi que la gestion des différents milieux de culture. Observées au 200 et 400X.

La morphologie ronde, le cytoplasme fortement réfringent, ainsi que le noyau relativement hyperchromatique des progéniteurs en suspension dans leur milieu de culture laisse place, au jour 7, à des cellules ovalaires/ étoilées au rapport N/C élevé et adhérentes au Matrigel et présentant un noyau hypochromatique. Ces colonies s'organisent de manière « imbriquées » il est donc évident que des cellules souches induites ont été générées.

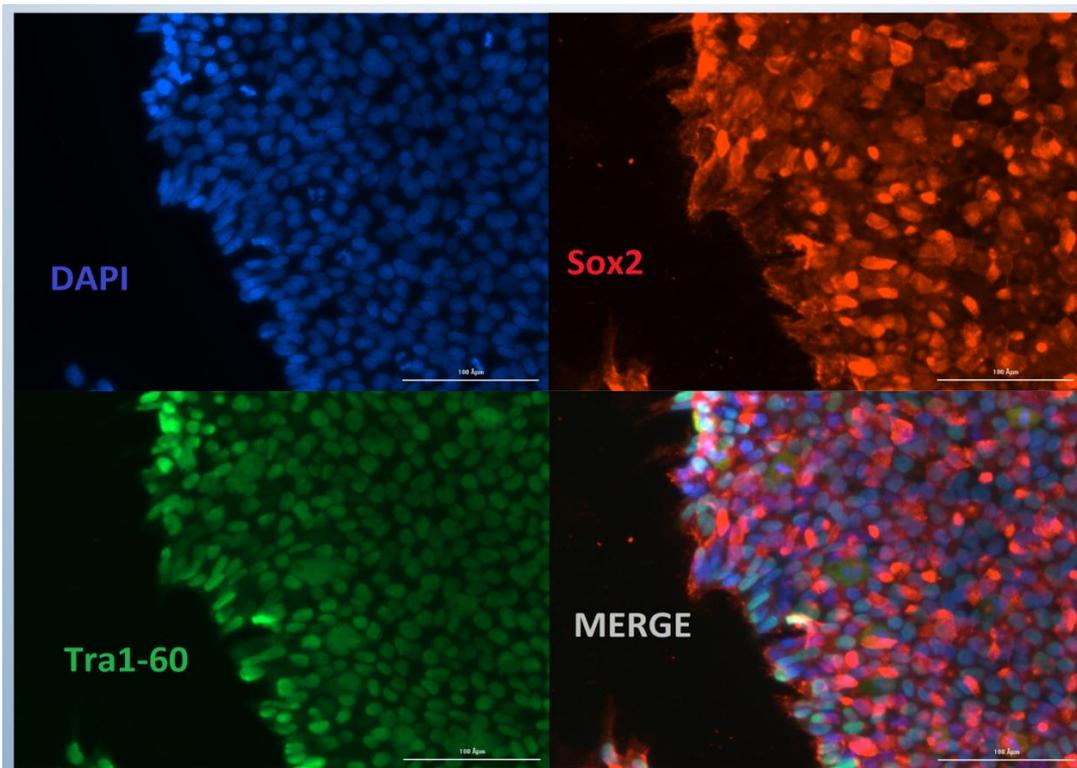
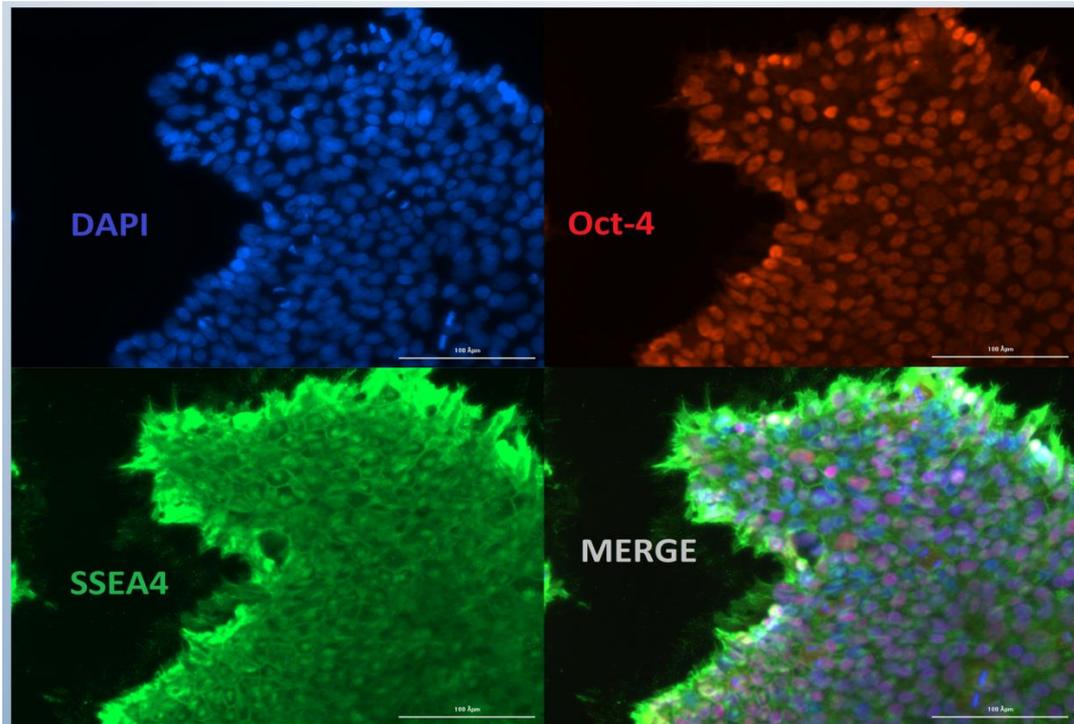
5.4. Caryotypage des hiPSC générées.



Résultat 6 : Caryotype des cellules électroporées au passage 10 du sujet défini comme étant « Wild Type », dépourvu des mutations étudiées.

Après 10 passages, plus de 40 jours après l'électroporation des progéniteurs érythroïdes, les cellules hiPSC sont : « 46 XX et ne présentent pas d'anomalie/ aberration caryotypique ». D'un point de vue purement caryotypique elles sont stables. Au passage 20, la différenciation sera possible.

5.5. Caractérisation par immunofluorescence des hiPSC générées à partir des PBMC.



Résultat 7 : images d'immunofluorescence des cellules au passage 10 un peu plus d'un mois et demi après leur électroporation avec les facteurs de transcriptions épisomiaux non intégratifs. Observé au 200X sur Cytation 5®.

Les colonies de cellules présentent les marqueurs protéiques (facteurs de transcriptions) caractéristiques des cellules souches pluripotentes. Oct-4, Sox2, Tra1-60, SSEA4 sont exprimés par les cellules. on constate également que SSEA4 et Sox2 sont retrouvés au niveau cytoplasmique alors que Tra1-60 et Oct4 ont une localisation nucléaire. La présence de ces marqueurs indique que ces cellules possèdent les caractéristiques des cellules souches pluripotentes induites. Ces cellules souches induites doivent encore proliférer et se « stabiliser » dans la culture avant de subir un processus de différenciation.

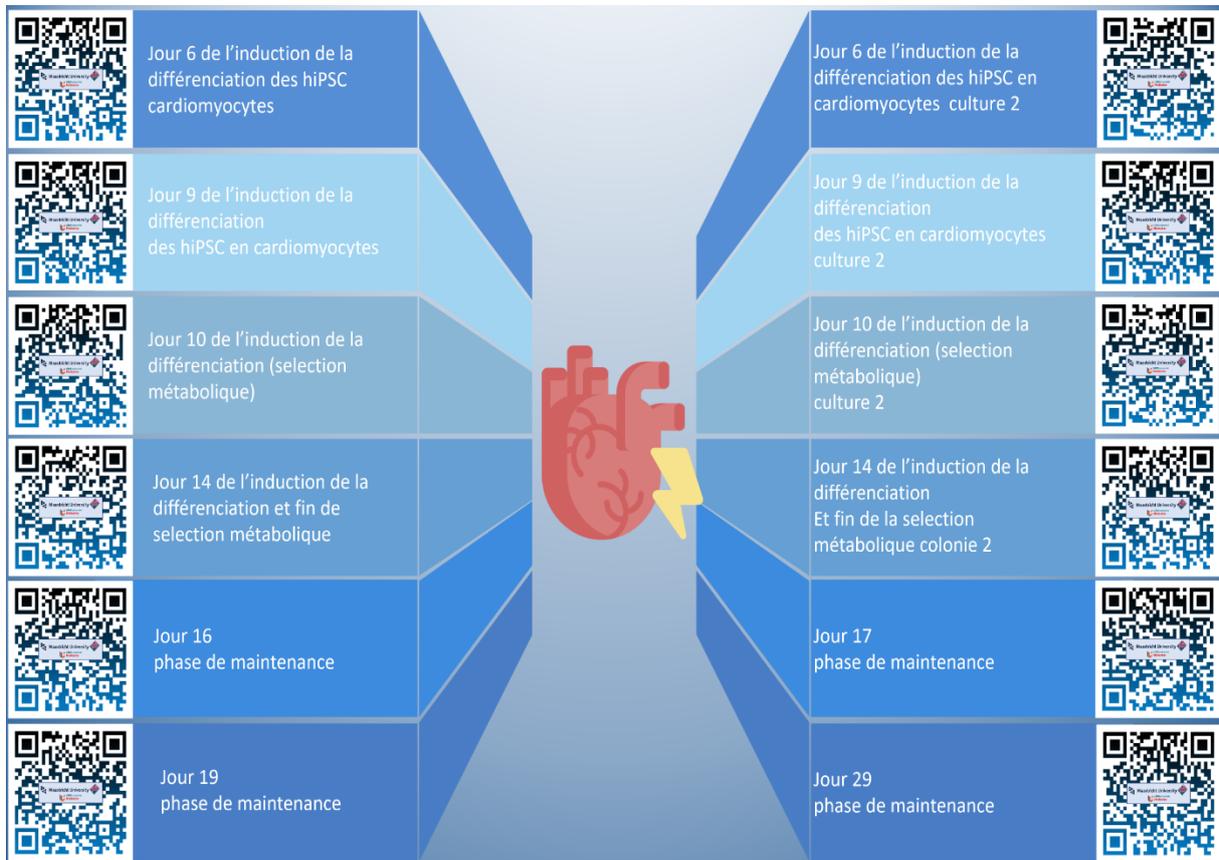
5.6. Mise en évidence de cardiomyocytes contractiles induits.



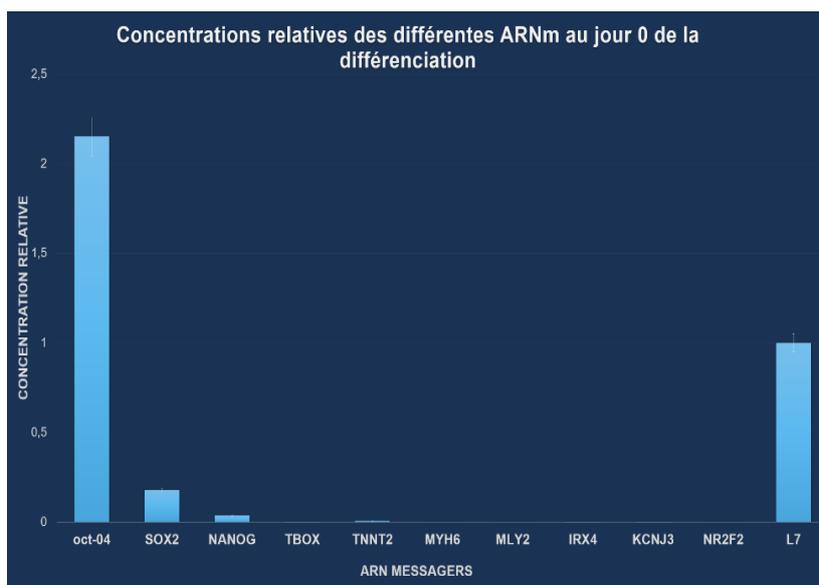
Résultat 8 : Évolution de la morphologie des colonies de cellules (100X), passant de la colonie hiPSC vers la colonie de cardiomyocytes. Observé au grossissement 100X.

Les cellules hiPSC induites, au passage 20, sont prêtes pour entrer dans un processus de différenciation. Les modifications suivent chronologiquement l'utilisation des différentes solutions de différenciation. Le jour 9, de ce premier processus de différenciation, marque l'apparition des premières cellules contractiles. Les cellules souches en colonies étoilées caractéristiques adoptent une configuration de cellules ramifiées, branchées en syncytium qui battent en rythme au départ de plusieurs point dans la boîte de culture. Au cours de leur maturation, elles deviennent également multinucléées et adoptent une morphologie plus rectangulaire ressemblant de plus en plus à des cellules *in-vivo*.

Le caractère contractile étant impossible à apprécier sur un support statique tel que celui-ci. Ci-dessous, une série de QR codes menant à des enregistrements vidéo des cardiomyocytes contractiles obtenus aux différentes phases. (**Résultat 9**).

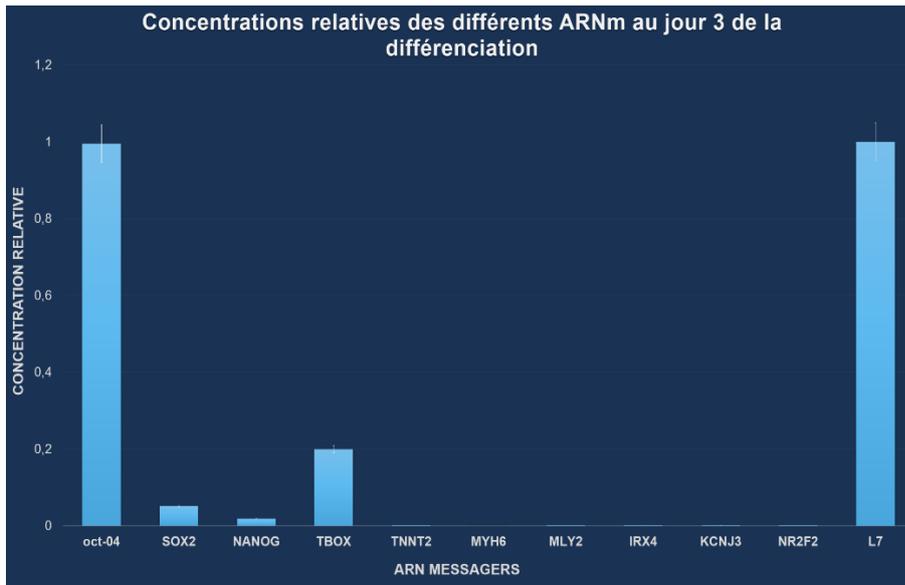


5.7. Caractérisation des cellules aux durant les étapes de la différenciation par RT-qPCR et immunofluorescence.

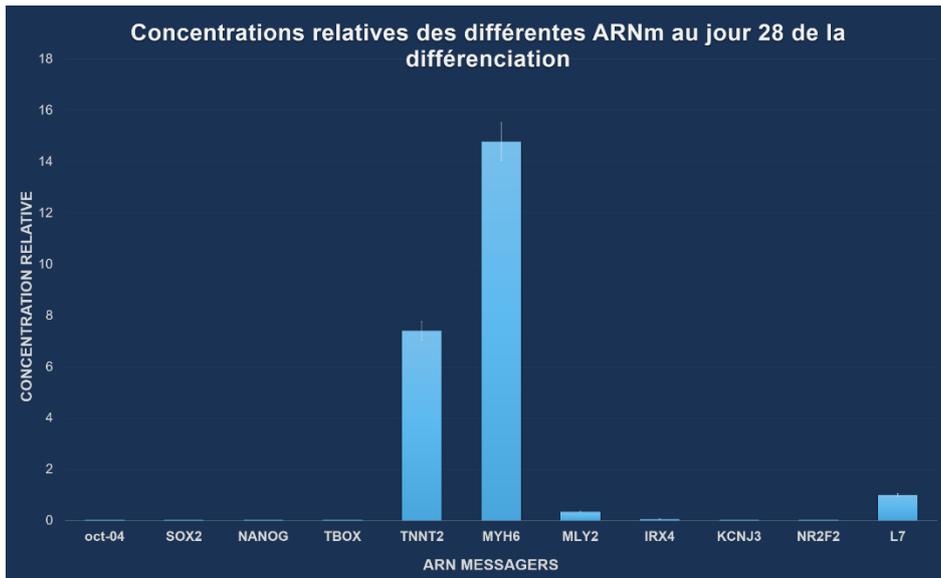


Résultat 10 :

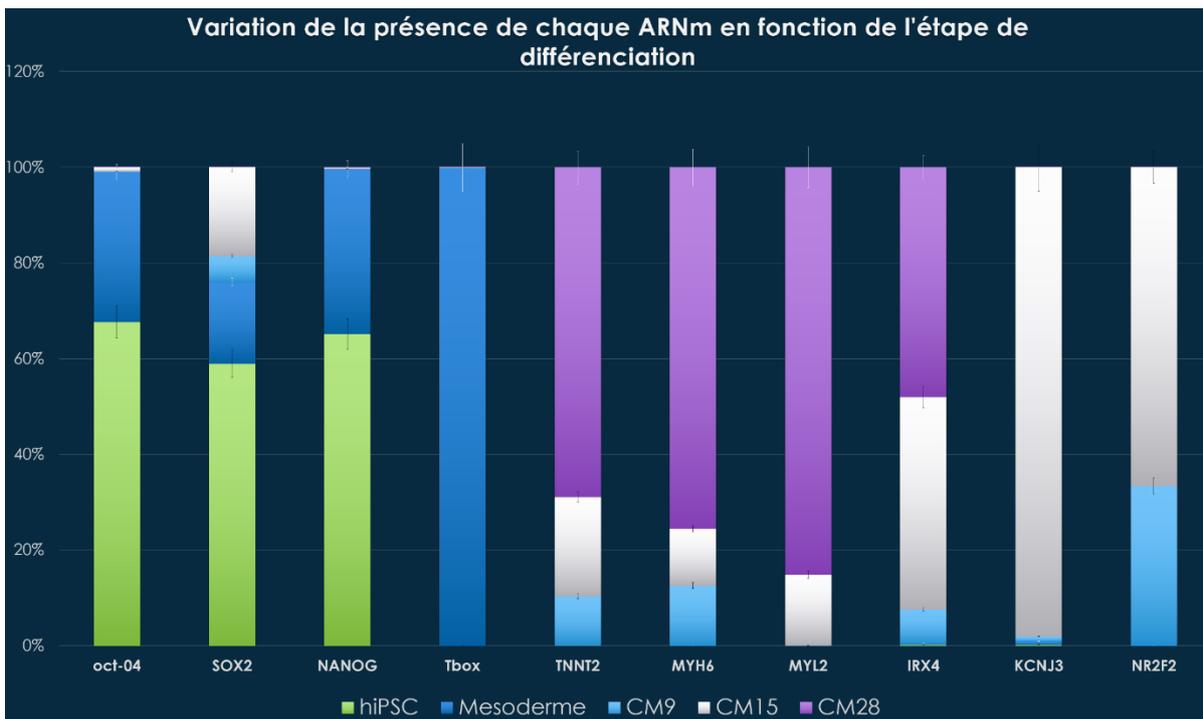
Les différentes concentrations relatives des ARNm au jour 0 sur les cellules hiPSC induites avant l'induction de la différenciation. Ne seront mis en évidence que les gènes impliqués dans la pluripotence (Oct4, Sox2, Nanog). Les hiPSC représentent la « baseline » du protéome étudié ici.



Résultat 10 : L'évolution de la concentration relative, normalisée par la présence d'un gène de référence (L7), de chaque ARNm d'intérêt. Au fur et à mesure de la différenciation on note une diminution de l'expression des gènes impliqués dans la pluripotence (Oct-4, Sox2, Nanog). Le premier milieu de culture permet l'induction du destin mésodermique à travers l'expression du gène TBXT (TboxT). La suite de la différenciation vers le cardiomyocyte contractile révèle l'induction des gènes spécifiques et nécessaires à la contraction du tissu cardiaque à savoir TNNT2 (troponine cardiaque), MYH6 (myosin heavy chain ventriculaire), IRX4 (marqueur de développement embryonnaire ventriculaire cardiaque). Ainsi que la présence de plusieurs gènes spécifiques des cellules atriales comme KCNJ3 et NR2F2 démontrant la présence dans la culture de différentes populations de cellules cardiaques.

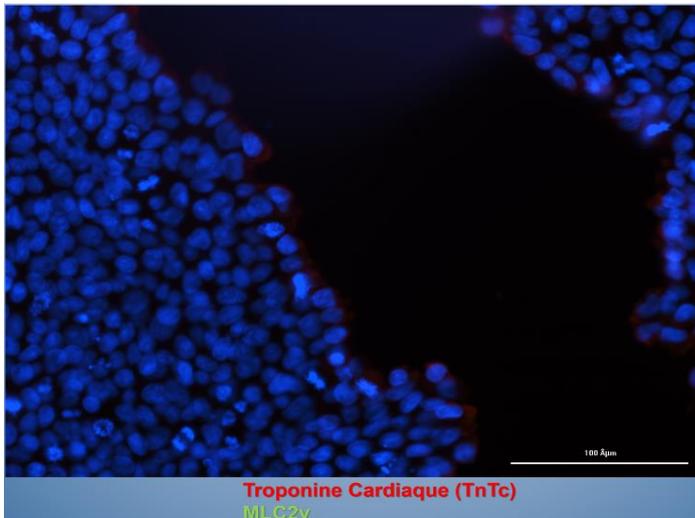


Résultat 10 : Au jour 28 de la différenciation, les cellules contractiles restantes présentent une protéomique typique de cellules complètement différenciées à travers l'absence complète d'Oct-4, Sox2, Nanog. Mais aussi de cellules cardiaques contractiles cardiaques (TNNT2 et MYH6) avec un phénotype majoritairement ventriculaire (MYL2 et IRX4).

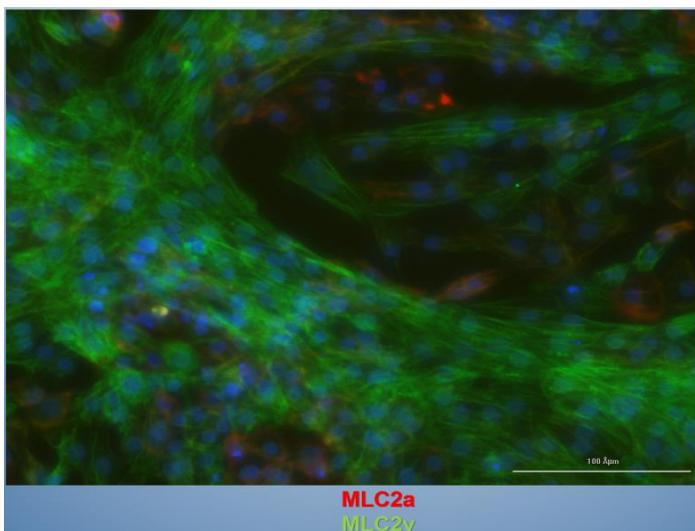


Résultat 11 : Variation de l'expression de chaque ARNm en fonction de l'étape de différenciation considérée.

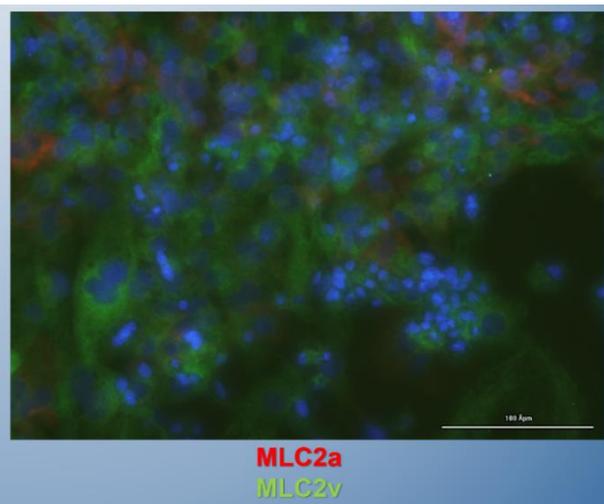
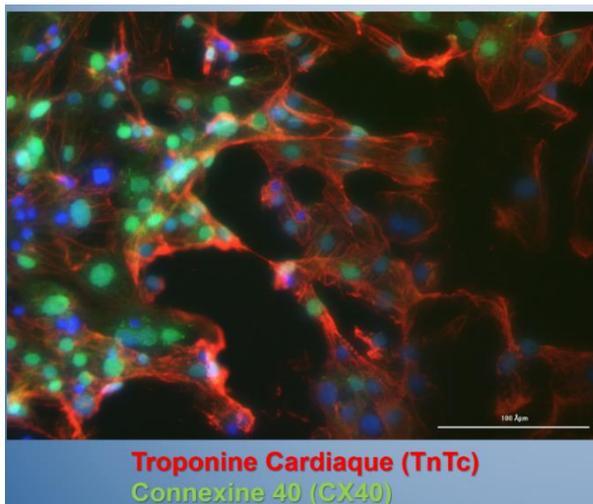
Chaque couleur représente une des 5 étapes de différenciation étudiées, chaque barre verticale représente un ARNm particulier. Plus la couleur de l'étape de différenciation est reprise de manière importante sur la barre, plus l'ARNm a été exprimé à cette étape. À travers ce graphique et en fonction de l'expression de chaque ARNm il est possible, sans voir les cellules, d'en donner les caractéristiques à chacune des étapes considérées. Ainsi que d'extrapoler les populations en présence dans les cultures.



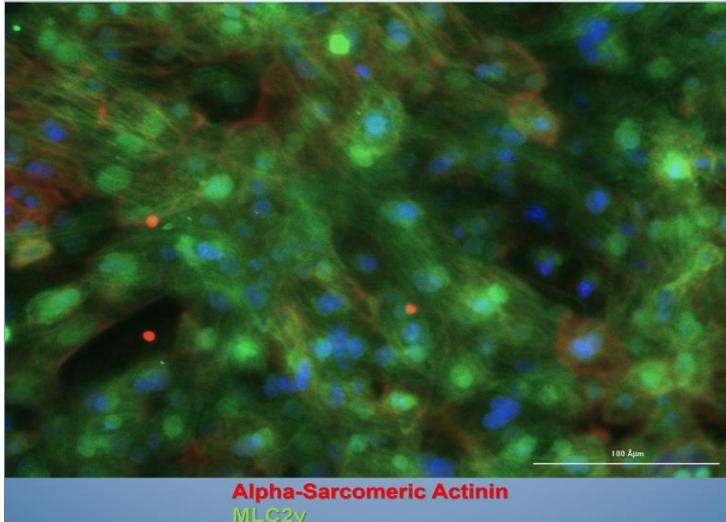
Résultat 12 : Cellules souche HIPSC (au 200X) au jour 0 de la différenciation avant ajout de tout milieu de différenciation. DAPI (bleu) comme marqueur nucléaire, MLC2v (myosine light chain 2 ventricular) comme marqueur spécifique des cellules ventriculaire cardiaques, TnTc/TNNT2 comme marqueur spécifique des cellules cardiaques. Ce marquage est un contrôle négatif prouvant que l'on part bien cellules souches et non de cardiomyocytes.



Résultat 12 : Cellules cardiaques au jour 15 de la différenciation (au 200X). Marquage Dapi (nucléaire) MLC2a (myosine light chaine 2 atrial) marqueur spécifique des cellules cardiaques atriales. MLC2v, marqueur des cellules cardiaques ventriculaires.



Résultat 12 : Cellules cardiaques au jour 28 de leur différenciation (au 200X), en phase de maintenance. Elles expriment fortement la troponine cardiaque, ainsi que la connexine 40 (CX40) indispensable dans la mise en place des tight-jonctions et du passage du potentiel d'action de cellules en cellules. Des cellules atriales (MLC2a) comme ventriculaires (MLC2v) sont identifiées.



Résultat 12 : Cellules cardiaques au jour 28 de la différenciation, en maintenance (au 200X). MLC2v, marqueur des cellules cardiaques ventriculaires. Et un marquage de l'actinine sarcomérique utilisé pour mettre en évidence les bandes Z des fibres musculaires des cellules contractiles.

Cette partie immunofluorescence tend à confirmer ce qui a été investigué en RT-qPCR, les cellules générées lors de la différenciation sont bien des cardiomyocytes (TnTc), dont le phénotype dominant au fil du temps, devient majoritairement ventriculaire (MLC2v). Ces cellules au jour 28 sont également considérées dans une certaine mesure comme « matures » de par la présence de la connexine 40 et l'alpha actinine sarcomérique.

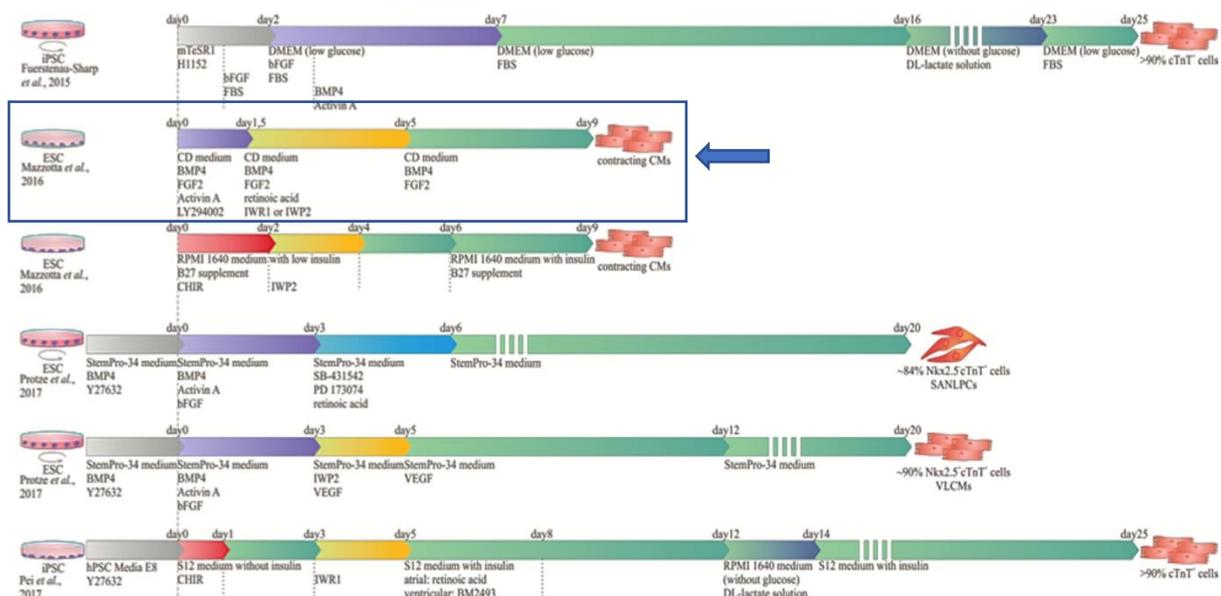
6. Discussion

6.1. Le protocole GIBCO « *PSC Cardiomyocytes Differentiation kit* »

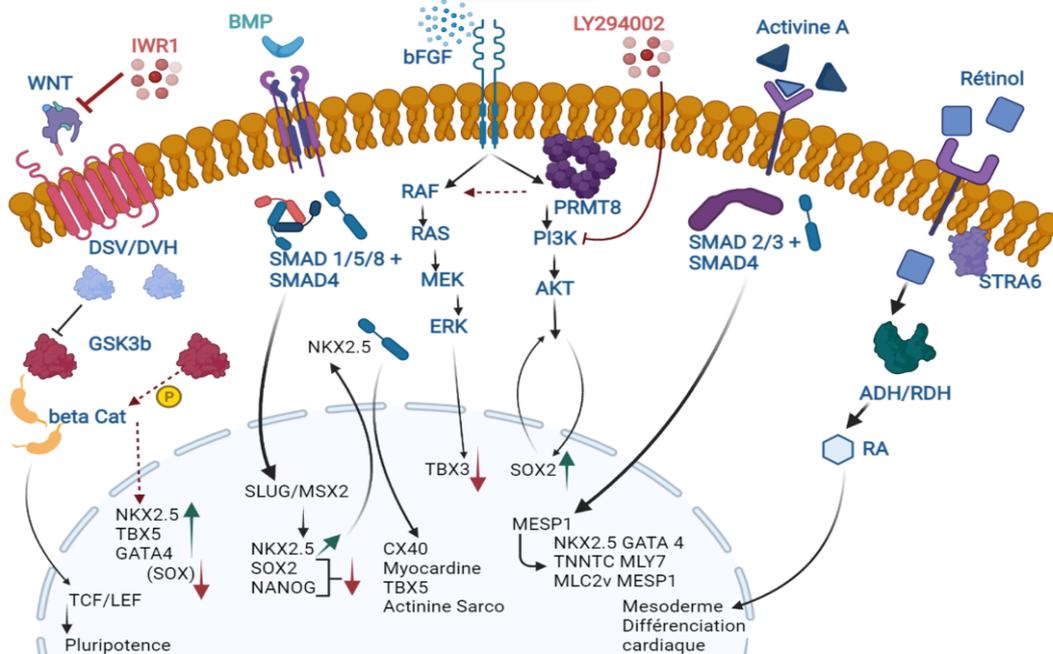
Des cardiomyocytes contractiles ont été générés de manière reproductible avec le kit commercial de Gibco™. Cependant, chacune des différenciations entamées ont présenté des caractéristiques avec des temporalités relativement différentes. Tout d'abord, l'architecture et l'aspect des cultures avant passage des cardiomyocytes s'est révélée être une variable très peu maitrisable. Il a été observé des cultures dites « en amas », « branchées » et en « feuillets monocellulaires contractiles ». Au fil des différenciations successives, il est devenu évident que l'aspect des cardiomyocytes contractiles était en relation directe avec l'aspect et la confluence des colonies hiPSC au jour 1 de la différenciation. Ainsi, même si toutes les différenciations partent de cultures hiPSC comprises entre 70 et 80% de confluence, le rapport des colonies entre elles (leurs espacements les unes par rapport aux autres) dicte réellement la future architecture que vont prendre les cardiomyocytes ainsi que la précocité des premières contractions observées. De cette observation, il été mis en évidence que des colonies hiPSC exprimant 70% de confluence mais montrant des colonies bien espacées les unes des autres formeraient des colonies de cardiomyocytes dites « branchées », aux contractions puissantes qui commencent au jour 7 plutôt qu'au jour 9 comme indiqué dans le protocole. Ces colonies sont aussi bien plus résistantes au passage (meilleure survie) après l'étape de sélection métabolique et se dissocient nettement mieux que les colonies contractiles en « amas ». Ces dernières ont une tendance très nette à ne plus se ré-attacher au Matrigel et à ne pas former de colonies exploitables par la suite (immunofluorescence, patch clamp ou congélation).

Le protocole de Gibco™ est un kit commercial. Il est impossible de déterminer précisément ce qui le compose (cytokines, facteurs de transcriptions, nutriments) et en quelles quantités. Il est donc difficile d'argumenter sur les différentes étapes au travers desquelles les hiPSC passent pour se différencier en cardiomyocytes.

Cependant, en utilisant la littérature, nous pouvons réaliser des liens entre ce qu'il a été observé durant ce mémoire et les articles de références.



Ci-dessus : Aperçu de quelques-uns des possibles protocoles de différenciation des hiPSC en cardiomyocytes, ainsi que la composition des milieux et la chronologie des différentes phases. L'encadré bleu désigne le protocole dont les milieux ou la chronologie se rapprochent le plus de ce qui a été observé lors de nos propres différenciations. (Hausburg et al., 2017)



Différentes voies « probables » de signalisation intervenant dans le protocole de différenciation de GIBCO. L'interaction de ces différentes voies engendre à la fois la perte de la pluripotence, l'induction mésodermique, ainsi que la différenciation des cellules souches pluripotentes induites en cellules cardiaques contractiles. (MS via Biorender).

La voie de l'acide rétinoïque (vitamine A active) est un dérivé du rétinol, qui une fois transloqué par STRA6 à l'intérieur de la cellule et catalysé par déshydrogénation, est introduit dans le noyau par la protéine CRABP2 pour interagir avec ses sites RAR Elements. Ces divers sites sont tous connus pour avoir un effet morphogénique sur les cellules souches mésodermiques ainsi que sur la promotion du destin cardiogénique. Cette voie de différenciation est dose-dépendante et s'opère à des concentrations inférieures à $10^{-1}\mu\text{M}$. Au-delà de celles-ci, c'est le destin ectodermique qui sera engendré (BOUCHARD, 2012).

L'inhibition de la voie WNT par IWR1 à un moment clé de la différenciation permet de libérer l'activité de la GSK3k qui peut alors phosphoryler les beta-caténines. Ces dernières ne pouvant plus exercer leur rôle au sein du noyau (transcription de LEF et TCF qui maintiennent la pluripotence), les cellules souches perdent rapidement leur état naïf (Willems et al., 2020). Cette action inhibitrice irait également de pair avec une fonction facilitatrice de la différenciation cardiaque par l'induction des promoteurs des gènes tels que NKX2.5, TBX5 et GATA4. Ces derniers étant tous impliqués dans la différenciation des cellules cardiaques.

BMP4 (Bone Morphogenic Protein), une fois sur son récepteur, engendre la voie des SMAD 1/5/8. Le trimère se lie ensuite à SMAD4 qui ira ensuite se fixer au niveau de l'ADN et engendrer la sécrétion de SLUG et MSX2 (RICHTER et al., 2014).

Ceux-ci ont un effet de prolifération cellulaire ainsi que d'induction du facteur de transcription NKX2.5 (cardiogenèse) (W. Hu et al., 2021) (Armiñán et al., 2009) mais également pour rôle capital de diminuer drastiquement la concentration de SOX2 et de NANOG. L'action ici est double : inhiber la pluripotence cellulaire, mais également intervenir négativement sur l'axe PRMT8 / PI3K et Sox2.

Cette voie est dépendante d'une boucle d'activation positive entre Sox2 et PRMT8 via l'intermédiaire PI3K, et permet de casser cette boucle en diminuant la quantité de Sox2 (ceci est également possible via l'inhibiteur LY294002) (JEONG et al., 2017). Le signal induit par la fixation des bFGF emprunte alors la voie MEK/ERK qui débouche sur l'inhibition de TBX3, un facteur de transcription fortement impliqué dans la pluripotence cellulaire.

L'Activine A, par sa fixation à son récepteur ActIIB active la voie des SMAD2/3. Le dimère se lie ensuite au SMAD4 qui, via un de ses domaines, se fixe à l'ADN et engendre la transcription de MESP1, un facteur de transcription (Kim et al., 2015). Celui-ci induit de par son activité toute une série d'acteurs ayant des rôles clés dans la contraction, la morphogénèse ainsi que la maturation des cellules cardiaques (Bondue & Blanpain, 2010).

6.2. La stratégie de recherche

Au niveau de la stratégie globale du mémoire, plusieurs points pourraient être améliorés. En reprenant depuis la culture des progéniteurs érythroïdes : il est essentiel de ne pas dépasser le stade polychromatique. La durée optimale de culture est de 7 à 8 jours ; Une culture prolongée des progéniteurs érythroïdes peut entraîner une augmentation de la différenciation spontanée des progéniteurs érythroïdes en érythroblastes plus matures. La différenciation entraîne l'hémoglobinisaiton et s'observe par une rougeur de la culture, particulièrement prononcée lorsque les cellules sont concentrées.

Au jour 8, il a été choisi d'opter pour une technique d'électroporation. Cette technique engendre une mortalité cellulaire forte, si bien que des cellules ayant potentiellement reçu les vecteurs épisomiaux contenant les facteurs de transcription meurent des suites de la « violence » du courant électrique subi. Un protocole moins agressif comme la transfection par liposome aurait pu donner de meilleurs résultats (survie cellulaire plus grande et donc taux de reprogrammation plus élevé).

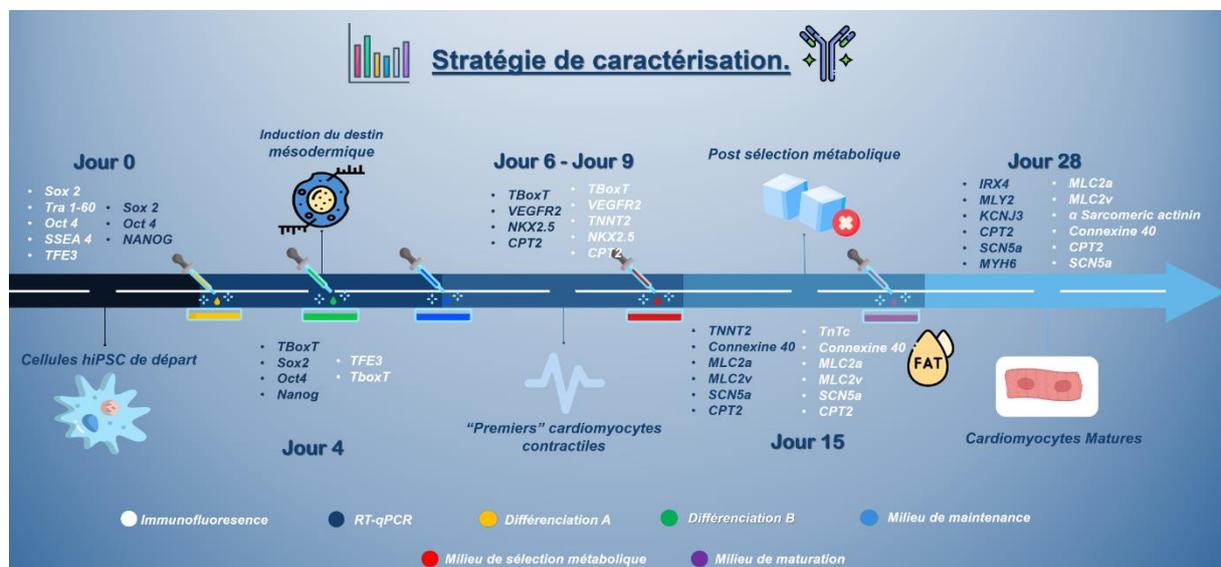
Une autre voie d'optimisation possible réside dans la sélection des marqueurs cellulaires. Lors de ce mémoire, les anticorps utilisés pour le volet « immunofluorescence » sont ceux qui étaient disponibles dans le laboratoire de cardiologie.

Une étude d'optimisation de protocole de reprogrammation et de différenciation ne justifiant pas vraiment les coûts associés à l'achat d'anticorps très spécifiques comme nous l'aurions voulu pour la partie IF (voir schéma ci-dessous).

A titre personnel, je pense qu'il aurait été intéressant de réussir à déterminer l'état de pluripotence des cellules souches induites générées par notre protocole. Était-ce des cellules souches naïves ou déjà primées est une question intéressante à se poser lorsque l'on veut entamer une. Si de telles populations de cellules avaient été mise en évidence, des analyses par qPCR auraient alors pu apporter une information quantitative sur l'expression de Oct4/Sox2/Klf4 entre différents protocoles. La caractérisation du procédé aurait de cette manière été complète.

Pour la caractérisation des cardiomyocytes, nos marqueurs se sont principalement focalisés sur l'induction mésodermique, sur la distinction des populations atriales et ventriculaires, ainsi que sur le caractère contractile des cellules. Il aurait été aussi très intéressant de mettre en évidence la chronologie du développement des hiPSC-CM par rapport aux conditions *in-vivo*.

Si on considère que l'obtention de cellules Brachyury + (TbxT+) est le véritable point de départ de la différenciation en cardiomyocyte et en suivant le schéma de l'embryogenèse cardiaque, il est dès lors possible d'établir une série de marqueurs mettant en évidence, au fil du temps, les modifications transcriptionnelles intrinsèques des cellules cardiaques en devenir. Dans l'optique d'une comparaison entre 2 protocoles, cette caractérisation semble également intéressante du point de vue de la succession des différentes étapes de développement cellulaire induit par les protocoles et leurs composants plutôt que la « simple » distinction de deux familles de cellules cardiaques obtenues, à priori, dans n'importe quel protocole.



Protocole de caractérisation se focalisant davantage sur la prise chronologique de fonctions des cardiomyocytes et leurs caractéristiques intrinsèques. La distinction des populations cellulaires est conservée (MLC2a / MLC2v / KCNJ3 / IRX4) mais la maturation cellulaire est mise en évidence (TbxT/ NKX2.5/ VEGFR2 / CPT2/ SCN5a et CX40).

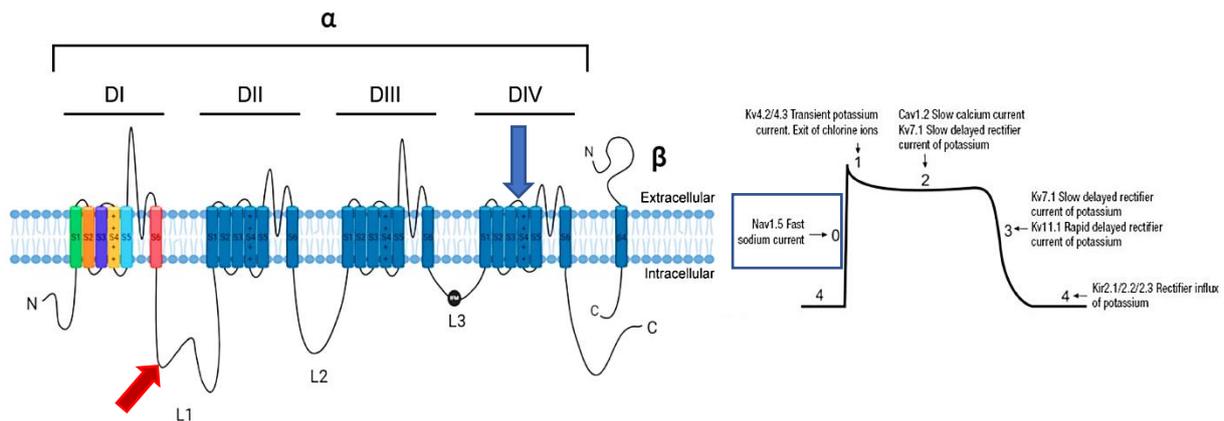
6.3. Les perspectives

Les perspectives s'orientent toutes vers l'utilisation des cardiomyocytes induits (hiPSC-CM) en électrophysiologie. Dans le cadre des recherches actuelles en cardiologie, le panel de patients du laboratoire présente les mutations héréditaires H558R et F1617del sur le gène SCN5a avec un tableau clinique d'arythmie ventriculaire.

Dans les prochains mois, les hiPSC-CM portant les polymorphismes génétiques des patients seront mis en culture, et des tests d'électrophysiologie pourront avoir lieu. L'idée derrière cette stratégie est de pouvoir caractériser de manière fonctionnelle l'impact réel des mutations génétiques héréditaires étudiées.

Les mutations du gène SCN5a sont nombreuses et il est très difficile de lier de une pathologie/symptomatologie avec une mutation particulière du gène (Wilde & Amin, 2018) (Wilde & Wu, 2021).

SCN5a est le gène impliqué dans la formation du canal sodique voltage dépendant au niveau de sa sous-unité 5 alpha, Nav1.5. Cette sous-unité est d'une importance capitale car elle est responsable de la création du flux de sodium entrant par le port sodique (INa+) et de la dépolarisation rapide des cellules permettant l'initiation du potentiel d'action, et donc de la synchronicité des contractions cardiaques.



Représentation de la sous-unité Nav1.5 et ses 4 fragments transmembranaires. Les mutations H558R et F1617del sont respectivement indiquées par les flèches rouge et bleue. À gauche, implication de cette même sous-unité dans l'initiation de la dépolarisation du muscle cardiaque (León-ariza & Rojas-ortega, 2014) et (Agnes Zybura, 2021).

De manière générale, on classe les mutations du gène SCN5a en mutation "perte de fonction" et "gain de fonction". Les mutations "perte de fonction" peuvent soit affecter le nombre de sous-unités Nav1.5, soit son architecture. Dans les deux cas, il semblerait que les patients concernés souffrent de syndromes divers comme le Burgada ou encore le Sick-sinus syndrome dû à la diminution du courant sodique résultant. Le cas de H558R est très particulier car il est le polymorphisme de SCN5a le plus répandu dans la population, mais en fonction des autres mutations possibles auxquels il est associé, il peut soit aggraver soit limiter les effets de ces autres mutations (R. M. Hu et al., 2021). C'est pourquoi son effet est souvent étudié conjointement avec d'autre mutations d'intérêts, dans le cas qui nous occupe ici il s'agit de F1617del.

Historiquement, il a été mis en évidence une association entre cette mutation particulière « gain de fonction » et un syndrome QT long de type 3 (LTQ3) (Chen et al., 2005) (W. Li et al., 2018) (Veltmann et al., 2016). Les personnes touchées par ce syndrome présentent une repolarisation retardée au niveau des cellules ventriculaires à cause d'une modification des échanges entrant et sortant durant la phase plateau. Ce qui peut être dû à un manque d'inactivation intrinsèque des canaux ou à une augmentation du pic de dépolarisation (voltage) qui ne permet plus leur inactivation à temps (Qureshi et al., 2015). Les arythmies qui en résultent peuvent provoquer une mort subite des patients et ce, alors même qu'ils sont au repos. Il s'est avéré que le génotype ne donne pas systématiquement le phénotype retrouvé chez les patients de la cohorte. Aussi, étudier ce polymorphisme génétique particulier en présence de H558R permettrait de déterminer s'il y a une interaction entre les deux mutations et si elle a lieu, a-t-elle un effet protecteur ou non ?

Une étude de screening médicamenteux sur les hiPSC-CM va également avoir lieu à moyen terme. Le but est de déterminer quelles molécules existantes seraient capable de diminuer la morbidité chez les patients LTQ3.

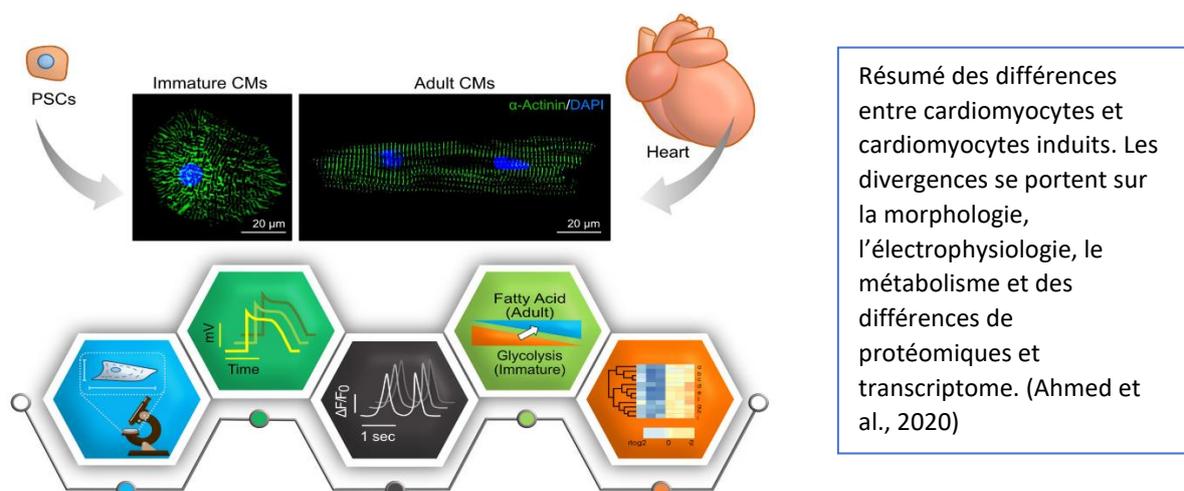
6.4. Le modèle

Les cellules souches pluripotentes induites, comme développé dans l'introduction, sont un modèle d'un grand potentiel. Mais malgré toutes ces qualités (plasticité cellulaire illimité, relative rapidité, source inépuisable de cellules, modèle non animal), ce modèle a également ses limites. Ces cellules cardiaques induites doivent être identiques aux cellules cardiaques que l'on retrouve chez les patients, afin d'obtenir des données fiables et robustes lors des tests de patch-clamp.

Les cardiomyocytes in-vivo, lors de leur développement, mettent près de 10 ans à maturer et à s'organiser dans le tissu cardiaque. La vascularisation, les hormones, les cytokines et une timeline extrêmement précise sont autant de variables difficilement voir non transposables en culture *in-vitro*. Ces variables engendrent par exemple des différences de morphologie et de constituants cytoplasmiques entre les cardiomyocytes et cardiomyocytes induits. Ainsi, par exemple, les tubules transverses (Tubule T) ou le réticulum sarcoplasmique sont très faiblement développés chez les cultures hiPSC-CM. De même que certaines jonctions cellulaires ne sont pas aussi nombreuses que chez les cellules cardiaques classiques (Denning et al., 2016).

De ces quelques différences découlent des propriétés physiques et électrophysiologiques légèrement différentes. Les contractions et la gestion du calcium reposent donc uniquement sur certains types de canaux (canaux de type L) pour l'entrée du Calcium et le couplage excitation-contraction est beaucoup plus lent qu'in-vivo chez les cardiomyocytes matures et organisés en syncytium. Hors, de cette entrée de calcium rapide et uniforme dépend la synchronicité des contractions cardiaque (Yang et al., 2014) (Pesi et al., 2017).

Le métabolisme est également très différent. Là où les cardiomyocytes matures tendent à « switcher » de la glycolyse vers l'oxydation des acides gras, le passage complet vers un milieu sans glucide et uniquement suppléé en acide gras semble impossible in-vitro chez les hiPSC-CM. Même si l'ajout de ces acides gras semble avoir un effet bénéfique sur le nombre de mitochondries, ou encore la morphologie des cellules. La maturation n'est pas complète chez les cellules cardiaques induites. (Ahmed et al., 2020). De nombreux protocoles de maturation sont disponibles et méritent une attention particulière dans les futures optimisations du laboratoire de Cardiologie.



Malgré tout, beaucoup d'optimisations de protocoles et de techniques de cultures voient le jour pour perfectionner le modèle : organoïdes, matrices dynamiques, maturation hiPSC-CM in-vivo, imprégnation hormonale des cultures sont autant de voies d'améliorations qui convergent vers un modèle encore plus robuste qu'il ne l'est actuellement. (Ahmed et al., 2020)

7. Conclusion

Au terme de ces 6 mois de stages, le bilan est plus que positif.

Les PBMC du sang périphérique des patients ont pu être isolés et la prolifération / maturation partielle des progéniteurs érythroïdes jusqu'au stade requis également.

Malgré une mortalité cellulaire élevée, le procédé d'électroporation des cellules avec les facteurs de transcriptions a su générer suffisamment de clones (33 clones sur 2×10^6 cellules).

La génération et l'expansion de lignées hiPSC ont constitué après caractérisation, d'une part un stock de cellules « Back up » cryopréservées, et d'autre part, elles ont pu fournir la matrice nécessaire à l'application d'un procédé commercial de différenciation en cardiomyocytes contractiles.

Les marqueurs de pluripotentes des cellules souches ont été mis en évidence de manière évidentes à la fois par immunofluorescence et RT-qPCR. Le caryotype normal de 3 clones a été confirmé par un laboratoire certifié extérieur (MUMC).

Ces mêmes cellules souches pluripotentes induites ont également été différenciées en cardiomyocytes contractiles, qui à cette heure, ont pu être cryopréservés afin de constituer un stock pour de futures analyses d'électrophysiologie. Ces hiPSC-CM expriment également les différents marqueurs et caractéristiques morphologiques qui permettent leur identification en tant que cardiomyocytes.

Le protocole commercial de GIBCO est un protocole qui est simplifié et très efficace. Cependant, des optimisations en terme de techniques de culture et de milieu de maintenance sont requises et s'avèrent indispensables au bon déroulement de la différenciation. Cependant, le kit prêt à l'emploi se révèle être un ensemble de « guidelines » tant la culture des cellules souches et leur différenciation est un procédé délicat. L'appréciation des différentes étapes et modifications morphologiques est une compétence clé pour mener à bien cette différenciation sur le long terme. Aussi, une meilleure caractérisation de la maturation des cardiomyocytes permettrait d'encore optimiser ce protocole. Son coup est assez conséquent si la différenciation devient une méthode de routine dans le laboratoire. A cet effet, nous aurions voulu comparer avec protocole de différenciation de l'Université de Stanford, qui utilise un « Small Molecules Protocol », c'est-à-dire l'ajout de molécules inhibitrices en concentrations définies à des instants clés du processus de différenciation cellulaire.

Cette comparaison n'a cependant pas pu être réalisée à temps durant la période couverte par le mémoire. La capacité à générer des cellules douées de contractions sur base d'inhibition de voies de communication cellulaire est un fait, mais le maintien de ces mêmes cellules a posé un problème. Aucun test de caractérisation n'a pu être effectué, mais est en cours actuellement. Ceci ne permet pas une comparaison directe avec le protocole de GIBCO.

8. Bibliographie / Ressources

- Agnes Zybura, A. H. and T. R. C. (2021). Na v 1 . 6 Sodium Channels Regulates Neuronal Excitability. *Cells*, 23. <https://doi.org/10.3390/cells10071595>
- Ahmed, R. E., Anzai, T., Chanthra, N., & Uosaki, H. (2020). A Brief Review of Current Maturation Methods for Human Induced Pluripotent Stem Cells-Derived Cardiomyocytes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(March), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00178>
- Al, C. Y. (2012). *Cardiac Disease Modeling Using Induced Pluripotent Stem Cells*. 22–27.
- Ang, Y. S., Tsai, S. Y., Lee, D. F., Monk, J., Su, J., Ratnakumar, K., Ding, J., Ge, Y., Darr, H., Chang, B., Wang, J., Rendl, M., Bernstein, E., Schaniel, C., & Lemischka, I. R. (2011). Wdr5 mediates self-renewal and reprogramming via the embryonic stem cell core transcriptional network. *Cell*, 145(2), 183–197. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.03.003>
- Armiñán, A., Gandía, C., Bartual, M., García-Verdugo, J. M., Lledó, E., Mirabet, V., Llop, M., Barea, J., Montero, J. A., & Sepúlveda, P. (2009). Cardiac differentiation is driven by nkx2.5 and gata4 nuclear translocation in tissue-specific mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*, 18(6), 907–917. <https://doi.org/10.1089/scd.2008.0292>
- Baelum, V., & Lopez, R. (2004). Periodontal epidemiology: Towards social science or molecular biology? *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 32(4), 239–249. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0528.2004.00159.x>
- Bindewald, A., Bird, A. C., Dandekar, S. S., Dolar-Szczasny, J., Dreybaupt, J., Fitzke, F. W., Einbock, W., Holz, F. G., Jorzik, J. J., Keilhauer, C., Lois, N., Mlynski, J., Pauleikhoff, D., Staurengi, G., & Wolf, S. (2005). Classification of fundus autofluorescence patterns in early age-related macular disease. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 46(9), 3309–3314. <https://doi.org/10.1167/iovs.04-0430>
- Boateng, S., & Sanborn, T. (2013). Acute myocardial infarction. *Disease-a-Month*, 59(3), 83–96. <https://doi.org/10.1016/j.disamonth.2012.12.004>
- Bondue, A., & Blanpain, C. (2010). Mesp1: A key regulator of cardiovascular lineage commitment. *Circulation Research*, 107(12), 1414–1427. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.227058>

- BOUCHARD, F. (2012). L'ocytocine, l'acide rétinoïque et les map-kinases dans la différenciation mésodermique de cellules souches embryonnaires P19. *UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL*, 196.
- Boyer, L. A., Tong, I. L., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., Guenther, M. G., Kumar, R. M., Murray, H. L., Jenner, R. G., Gifford, D. K., Melton, D. A., Jaenisch, R., & Young, R. A. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, *122*(6), 947–956. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.020>
- Bui, A. L., Horwich, T. B., & Fonarow, G. C. (2011). Epidemiology and risk profile of heart failure. *Nature Reviews Cardiology*, *8*(1), 30–41. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2010.165>
- Busquet, F., Kleensang, A., Rovida, C., Herrmann, K., Leist, M., & Hartung, T. (2020). New european union statistics on laboratory animal use - What really counts! *Altex*, *37*(2), 167–186. <https://doi.org/10.14573/altex.2003241>
- Campbell, K. H. S., McWhir, J., Ritchie, W. A., & Wilmut, I. (1996). Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. In *Nature* (Vol. 380, Issue 6569, pp. 64–66). <https://doi.org/10.1038/380064a0>
- Carvello, M., Lightner, A., Yamamoto, T., Kotze, P. G., & Spinelli, A. (2019). Mesenchymal Stem Cells for Perianal Crohn's Disease. *Cells*, *8*(7), 764. <https://doi.org/10.3390/cells8070764>
- Chang, C. Y., Ting, H. C., Liu, C. A., Su, H. L., Chiou, T. W., Lin, S. Z., Harn, H. J., & Ho, T. J. (2020). Induced pluripotent stem cell (iPSC)-based neurodegenerative disease models for phenotype recapitulation and drug screening. *Molecules*, *25*(8), 1–21. <https://doi.org/10.3390/molecules25082000>
- Chen, T., Inoue, M., & Sheets, M. F. (2005). Reduced voltage dependence of inactivation in the SCN5A sodium channel mutation delF1617. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, *288*(6 57-6). <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00521.2004>
- Costanzo, M. R., Mills, R. M., & Wynne, J. (2008). Characteristics of “Stage D” heart failure: Insights from the Acute Decompensated Heart Failure National Registry Longitudinal Module (ADHERE LM). *American Heart Journal*, *155*(2), 339–347. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2007.10.020>
- D'Aquino, R., De Rosa, A., Lanza, V., Tirino, V., Laino, L., Graziano, A., Desiderio, V., Laino, G., & Papaccio, G. (2009). Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes. *European Cells and Materials*, *18*, 75–83. <https://doi.org/10.22203/eCM.v018a07>

- Davis, R. L., Weintraub, H., & Lassar, A. B. (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell*, *51*(6), 987–1000. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90585-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90585-X)
- Denning, C., Borgdorff, V., Crutchley, J., Firth, K. S. A., George, V., Kalra, S., Kondrashov, A., Hoang, M. D., Mosqueira, D., Patel, A., Prodanov, L., Rajamohan, D., Skarnes, W. C., Smith, J. G. W., & Young, L. E. (2016). Cardiomyocytes from human pluripotent stem cells: From laboratory curiosity to industrial biomedical platform. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1863*(7), 1728–1748. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.10.014>
- Gagliardi, G., Ben M'Barek, K., & Goureau, O. (2019). Photoreceptor cell replacement in macular degeneration and retinitis pigmentosa: A pluripotent stem cell-based approach. *Progress in Retinal and Eye Research*, *71*, 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2019.03.001>
- Ghaleb, A. M., & Yang, V. W. (2017). Krüppel-like factor 4 (KLF4): What we currently know. *Gene*, *611*, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.02.025>
- Hausburg, F., Jung, J. J., Hoch, M., Wolfien, M., Yavari, A., Rimbach, C., & David, R. (2017). (Re-)programming of subtype specific cardiomyocytes. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *120*, 142–167. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.09.005>
- Hogg, K., Swedberg, K., & McMurray, J. (2004). Heart Failure with Preserved Left Ventricular Systolic Function: Epidemiology, Clinical Characteristics, and Prognosis. *Journal of the American College of Cardiology*, *43*(3), 317–327. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2003.07.046>
- Hu, R. M., Song, E. J., Tester, D. J., Deschenes, I., Ackerman, M. J., Makielski, J. C., & Tan, B. H. (2021). Expression defect of the rare variant/Brugada mutation R1512W depends upon the SCN5A splice variant background and can be rescued by mexiletine and the common polymorphism H558R. *Channels*, *15*(1), 253–261. <https://doi.org/10.1080/19336950.2021.1875645>
- Hu, W., Dong, A., Karasaki, K., Sogabe, S., Okamoto, D., Saigo, M., Ishida, M., Yoshizumi, M., & Kokubo, H. (2021). Smad4 regulates the nuclear translocation of Nkx2-5 in cardiac differentiation. *Scientific Reports*, *11*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82954-2>
- Hughes, C. S., Postovit, L. M., & Lajoie, G. A. (2010). Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics*, *10*(9), 1886–1890. <https://doi.org/10.1002/pmic.200900758>

- Huh, M. Il, Kim, M. S., Kim, H. K., & Lim, J. O. (2014). Effect of conditioned media collected from human amniotic fluid-derived stem cells (hAFSCs) on skin regeneration and photo-aging. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 11(2), 171–177. <https://doi.org/10.1007/s13770-014-0412-1>
- Jaatinen, T., & Laine, J. (2007). Isolation of mononuclear cells from human cord blood by Ficoll-Paque density gradient. *Current Protocols in Stem Cell Biology, Chapter 2*(June), 1–4. <https://doi.org/10.1002/9780470151808.sc02a01s1>
- JEONG, H.-C., PARK, a S.-J., CHOI, b J.-J., GO, b Y.-H., HONG, a S.-K., A, KWON, O.-S., SHIN, a J.-G., A, c R.-K. K., LEE, d M.-O., LEE, e S.-J., D, SHIN, H. D., A, c S.-H. M., & A, b H.-J. C. (2017). *PRMT8 Controls the Pluripotency and Mesodermal Fate of Human Embryonic Stem Cells By Enhancing the PI3K/AKT/SOX2 Axis*. 1530–1540. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28543863/>
- John B. Gurdon. (1962). The Developmental Capacity of Nuclei taken from Intestinal Epithelium Cells of Feeding Tadpoles. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 10(December).
- Justice, M. J., & Dhillon, P. (2016). Using the mouse to model human disease: Increasing validity and reproducibility. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 9(2), 101–103. <https://doi.org/10.1242/dmm.024547>
- Kaneko, S., Otsu, M., & Nakauchi, H. (2010). Reprogramming adult hematopoietic cells. *Current Opinion in Hematology*, 17(4), 271–275. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e32833a25ee>
- Kim, M. S., Horst, A., Blinka, S., Stamm, K., Mahnke, D., Schuman, J., Gundry, R., Tomita-Mitchell, A., & Lough, J. (2015). Activin-A and Bmp4 levels modulate cell type specification during CHIR-induced cardiomyogenesis. *PLoS ONE*, 10(2), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118670>
- Kulcenty, K., Wróblewska, J., Mazurek, S., Liszewska, E., & Jaworski, J. (2015). Molecular mechanisms of induced pluripotency. *Wspolczesna Onkologia*, 1A(L), A22–A29. <https://doi.org/10.5114/wo.2014.47134>
- Lee, J. H., Protze, S. I., Laksman, Z., Backx, P. H., & Keller, G. M. (2017). Human Pluripotent Stem Cell-Derived Atrial and Ventricular Cardiomyocytes Develop from Distinct Mesoderm Populations. *Cell Stem Cell*, 21(2), 179-194.e4. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.07.003>
- León-ariza, H. H., & Rojas-ortega, N. V. A. C. (2014). *Nav1.5 cardiac sodium channels, regulation and clinical implications*. 62(4), 587–592. <http://dx.doi.org/10.15446/revfacmed.v62n4.44015>

- Li, B., Yang, H., Wang, X., Zhan, Y., Sheng, W., Cai, H., Xin, H., Liang, Q., Zhou, P., Lu, C., Qian, R., Chen, S., Yang, P., Zhang, J., Shou, W., Huang, G., Liang, P., & Sun, N. (2017). Engineering human ventricular heart muscles based on a highly efficient system for purification of human pluripotent stem cell-derived ventricular cardiomyocytes. *Stem Cell Research and Therapy*, 8(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0651-x>
- Li, W., Yin, L., Shen, C., Hu, K., Ge, J., & Sun, A. (2018). SCN5A variants: Association with cardiac disorders. *Frontiers in Physiology*, 9(OCT), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01372>
- Lloyd-Jones, D., Adams, R. J., Brown, T. M., Carnethon, M., Dai, S., De Simone, G., Ferguson, T. B., Ford, E., Furie, K., Gillespie, C., Go, A., Greenlund, K., Haase, N., Hailpern, S., Ho, P. M., Howard, V., Kissela, B., Kittner, S., Lackland, D., ... Wylie-Rosett, J. (2010). Heart disease and stroke statistics - 2010 update: A report from the American heart association. *Circulation*, 121(7), 948–954. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.109.192666>
- Lorenzi, C. De, Lehmann, A., Tognon, M., & Cominetti, F. (2005). *Infarctus du myocarde Prise en charge*.
http://www.medecine.unige.ch/enseignement/apprentissage/module4/immersion/archives/2009_2010/travaux/10_r_infarctus.pdf
- Magalon, J., François, P., Velier, M., Grimaud, F., Veran, J., Calmels, B., & Sabatier, F. (2018). Thérapie cellulaire et cellules souches en 2018. *Revue Francophone Des Laboratoires*, 2018(507), 34–43. [https://doi.org/10.1016/s1773-035x\(18\)30355-1](https://doi.org/10.1016/s1773-035x(18)30355-1)
- Mandai, M., Watanabe, A., Kurimoto, Y., Hirami, Y., Morinaga, C., Daimon, T., Fujihara, M., Akimaru, H., Sakai, N., Shibata, Y., Terada, M., Nomiya, Y., Tanishima, S., Nakamura, M., Kamao, H., Sugita, S., Onishi, A., Ito, T., Fujita, K., ... Takahashi, M. (2017). Autologous Induced Stem-Cell–Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *New England Journal of Medicine*, 376(11), 1038–1046. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1608368>
- Moretti, A., Ph, D., Bellin, M., Ph, D., Welling, A., Ph, D., Jung, C. B., Sc, M., Lam, J. T., Ph, D., Bottflügel, L., Dorn, T., Ph, D., Goedel, A., Höhnke, C., Hofmann, F., Seyfarth, M., Sinnecker, D., Schömig, A., & Laugwitz, K. (2010). *Patient-Specific Induced Pluripotent Stem-Cell Models for Long-QT Syndrome*. 1397–1409.
- Mossahebi-Mohammadi, M., Quan, M., Zhang, J. S., & Li, X. (2020). FGF Signaling Pathway: A Key Regulator of Stem Cell Pluripotency. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8(February), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00079>

- Müller, F. J., Goldmann, J., Löser, P., & Loring, J. F. (2010). A call to standardize teratoma assays used to define human pluripotent cell lines. *Cell Stem Cell*, 6(5), 412–414.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.04.009>
- Nashun, B., Hill, P. W., & Hajkova, P. (2015). Reprogramming of cell fate: epigenetic memory and the erasure of memories past. *The EMBO Journal*, 34(10), 1296–1308.
<https://doi.org/10.15252/emj.201490649>
- Nishihara, H., Gastfriend, B. D., Soldati, S., Perriot, S., Mathias, A., Sano, Y., Shimizu, F., Gosselet, F., Kanda, T., Palecek, S. P., Du Pasquier, R., Shusta, E. V., & Engelhardt, B. (2020). Advancing human induced pluripotent stem cell-derived blood-brain barrier models for studying immune cell interactions. *FASEB Journal*, 34(12), 16693–16715. <https://doi.org/10.1096/fj.202001507RR>
- Ota, K. I. (2019). STEM Cells: Past, Present and Future. *Stem Cell Research & Therapy*, 128(5), 329–332. <https://doi.org/10.1541/ieejfms.128.329>
- Panés, J., García-Olmo, D., Van Assche, G., Colombel, J. F., Reinisch, W., Baumgart, D. C., Dignass, A., Nachury, M., Ferrante, M., Kazemi-Shirazi, L., Grimaud, J. C., de la Portilla, F., Goldin, E., Richard, M. P., Diez, M. C., Tagarro, I., Leselbaum, A., Danese, S., Stift, A., ... Guadalajara, H. (2018). Long-term Efficacy and Safety of Stem Cell Therapy (Cx601) for Complex Perianal Fistulas in Patients With Crohn's Disease. *Gastroenterology*, 154(5), 1334-1342.e4.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.12.020>
- Parrotta, E. I., Lucchino, V., Scaramuzzino, L., Scalise, S., & Cuda, G. (2020). Modeling cardiac disease mechanisms using induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: Progress, promises and challenges. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 1–30.
<https://doi.org/10.3390/ijms21124354>
- Patra, S. K. (2020). Roles of OCT4 in pathways of embryonic development and cancer progression. *Mechanisms of Ageing and Development*, 189(June), 111286.
<https://doi.org/10.1016/j.mad.2020.111286>
- Perel, P., Roberts, I., Sena, E., Wheble, P., Briscoe, C., Sandercock, P., Macleod, M., Mignini, L. E., Jayaram, P., & Khan, K. S. (2007). Comparison of treatment effects between animal experiments and clinical trials: Systematic review. *British Medical Journal*, 334(7586), 197–200.
<https://doi.org/10.1136/bmj.39048.407928.BE>

- Pesl, M., Pribyl, J., Caluori, G., Cmiel, V., Acimovic, I., Jelinkova, S., Dvorak, P., Starek, Z., Skladal, P., & Rotrekl, V. (2017). Phenotypic assays for analyses of pluripotent stem cell–derived cardiomyocytes. *Journal of Molecular Recognition*, *30*(6), 1–14.
<https://doi.org/10.1002/jmr.2602>
- Qureshi, S. F., Ali, A., John, P., Jadhav, A. P., Venkateshwari, A., Rao, H., Jayakrishnan, M. P., Narasimhan, C., Shenthathar, J., Thangaraj, K., & Nallari, P. (2015). Mutational analysis of SCN5A gene in long QT syndrome. *Meta Gene*, *6*, 26–35. <https://doi.org/10.1016/j.mgene.2015.07.010>
- RICHTER, A., VALDIMARSDOTTIR, a L., HRAFNKELSDOTTIR, a H. E., A, RUNARSSON, J. F., OMARSDOTTIR, a A. R., OOSTWAARD, a D. W., B, MUMMERY, C., & VALDIMARSDOTTIRa, b G. (2014). BMP4 Promotes EMT and Mesodermal Commitment in Human Embryonic Stem Cells via SLUG and MSX2. *Stem Cell Research*, 1503–1514. <https://doi.org/10.5966/sctm.2014-0129>
- Robinson, N. B., Krieger, K., Khan, F., Huffman, W., Chang, M., Naik, A., Yongle, R., Hameed, I., Krieger, K., Girardi, L. N., & Gaudino, M. (2019). The current state of animal models in research: A review. *International Journal of Surgery*, *72*(October), 9–13.
<https://doi.org/10.1016/j.ijssu.2019.10.015>
- Rodda, D. J., Chew, J. L., Lim, L. H., Loh, Y. H., Wang, B., Ng, H. H., & Robson, P. (2005). Transcriptional regulation of Nanog by OCT4 and SOX2. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(26), 24731–24737.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M502573200>
- Roth, G. A., Mensah, G. A., Johnson, C. O., Addolorato, G., Ammirati, E., Baddour, L. M., Barengo, N. C., Beaton, A., Benjamin, E. J., Benziger, C. P., Bonny, A., Brauer, M., Brodmann, M., Cahill, T. J., Carapetis, J. R., Catapano, A. L., Chugh, S., Cooper, L. T., Coresh, J., ... Fuster, V. (2020). Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990-2019: Update From the GBD 2019 Study. *Journal of the American College of Cardiology*, *76*(25), 2982–3021.
<https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.11.010>
- Saadeldin, I. M., Tukur, H. A., Aljumaah, R. S., & Sindi, R. A. (2021). Rocking the Boat: The Decisive Roles of Rho Kinases During Oocyte, Blastocyst, and Stem Cell Development. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*(January), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.616762>
- Savarese, G., & Lund, L. H. (2017). Global Public Health Burden of Heart Failure. *Cardiac Failure Review*, *03*(01), 7. <https://doi.org/10.15420/cfr.2016:25:2>

- Song, Y. H., Gehmert, S., Sadat, S., Pinkernell, K., Bai, X., Matthias, N., & Alt, E. (2007). VEGF is critical for spontaneous differentiation of stem cells into cardiomyocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 354(4), 999–1003. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.01.095>
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131(5), 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
- Thomson, J. A. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282(5391), 1145–1147. <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>
- Veltmann, C., Barajas-Martinez, H., Wolpert, C., Borggrefe, M., Schimpf, R., Pfeiffer, R., Cáceres, G., Burashnikov, E., Antzelevitch, C., & Hu, D. (2016). Further Insights in the Most Common SCN5A Mutation Causing Overlapping Phenotype of Long QT Syndrome, Brugada Syndrome, and Conduction Defect. *Journal of the American Heart Association*, 5(7), 1–14. <https://doi.org/10.1161/JAHA.116.003379>
- Vierbuchen, T., & Wernig, M. (2012). Molecular Roadblocks for Cellular Reprogramming. *Molecular Cell*, 47(6), 827–838. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.008>
- Volarevic, V., Markovic, B. S., Gazdic, M., Volarevic, A., Jovicic, N., Arsenijevic, N., Armstrong, L., Djonov, V., Lako, M., & Stojkovic, M. (2018). Ethical and safety issues of stem cell-based therapy. *International Journal of Medical Sciences*, 15(1), 36–45. <https://doi.org/10.7150/ijms.21666>
- Wang, J., Tang, Z. Y., Ka, W., Sun, D. G., Yao, W., Wen, Z., & Chien, S. (2007). Synergistic effect of cytokines EPO, IL-3 and SCF on the proliferation, differentiation and apoptosis of erythroid progenitor cells. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, 37(4), 291–299.
- Wei, Z., Yang, Y., Zhang, P., Andrianakos, R., Hasegawa, K., Lyu, J., Chen, X., Bai, G., Liu, C., Pera, M., & Lu, W. (2009). Klf4 interacts directly with Oct4 and Sox2 to promote reprogramming. *Stem Cells*, 27(12), 2969–2978. <https://doi.org/10.1002/stem.231>
- Weinberger, L., Ayyash, M., Novershtern, N., & Hanna, J. H. (2016). Dynamic stem cell states: Naive to primed pluripotency in rodents and humans. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(3), 155–169. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.28>
- Wickrema, A., & Crispino, J. D. (2007). Erythroid and megakaryocytic transformation. *Oncogene*, 26(47), 6803–6815. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210763>

- Wilde, A. A. M., & Amin, A. S. (2018). Clinical Spectrum of SCN5A Mutations: Long QT Syndrome, Brugada Syndrome, and Cardiomyopathy. *JACC: Clinical Electrophysiology*, 4(5), 569–579. <https://doi.org/10.1016/j.jacep.2018.03.006>
- Wilde, A. A. M., & Wu, C. I. (2021). Does function trump bioinformatics in Brugada syndrome-associated SCN5A mutation calling? Patients, computers, and patches. *European Heart Journal*, 42(29), 2864–2865. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab292>
- Willems, L., Daniëls, A., Fanton, Y., Linsen, L., Evens, L., Bito, V., Declercq, J., Rummens, J. L., Hensen, K., & Hendrikx, M. (2020). Differentiation of human cardiac atrial appendage stem cells into adult cardiomyocytes: A role for the Wnt pathway? *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11). <https://doi.org/10.3390/ijms21113931>
- Yang, X., Pabon, L., & Murry, C. E. (2014). Engineering adolescence: Maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Circulation Research*, 114(3), 511–523. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.300558>
- Yazawa, M., Hsueh, B., Jia, X., Pasca, A. M., Bernstein, J. A., Hallmayer, J., & Dolmetsch, R. E. (2011). Using induced pluripotent stem cells to investigate cardiac phenotypes in Timothy syndrome. *Nature*, 471(7337), 230–236. <https://doi.org/10.1038/nature09855>
- Yoshida, G. J. (2018). Emerging roles of Myc in stem cell biology and novel tumor therapies. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 37(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0835-y>

9. Annexes

Liste des primers:

Gene/Species	Description	Type	Sequence (5'-->3')
has	5553 Oct/4 Fwd	qPCR	TTCAGCCAAACGACCATCTG
has	5554 Oct/4 Rv	qPCR	CACGAGGGTTTCTGCTTTGC
has	6047 hsa SOX2 Fwd	qPCR	GCCGAGTGGAAACTTTTGTCTG
has	6048 hsa SOX2 Rv	qPCR	GGCAGCGTGTACTTATCCTTCT
has	5557 NANOG Fwd	qPCR	TTCCCTCCTCCATGGATCTG
has	5558 NANOG Rv	qPCR	TGTTTCTTGACTGGGACCTTGTC
hsa	5849 hsa TNNT2 Fwd	qPCR	AAGAGGATGCTGAAGCAGAG
hsa	5850 hsa TNNT2 Rv	qPCR	TGGTTTGGACTCCTCCATTG
hsa	5859 hsa MYH6 Fwd	qPCR	CACCAACAATCCCTACGACTAC
hsa	5860 hsa MYH6 Rv	qPCR	AGCACGTCAAAGGCACTATC
hsa	5886 MYL2 Fwd	qPCR	TGTCCCTACCTTGTCTGTTAGCCA
hsa	5887 MYL2 Rv	qPCR	ATTGGAACATGGCCTCTGGATGGA
hsa	5882 IRX4 Fwd	qPCR	TTGGACTCCTGGGAACATGGACAA
hsa	5883 IRX4 Rv	qPCR	ATGCTTCAGGGTATCTGGCCTCTT
hsa	5884 KCNJ3 Fwd	qPCR	TCATCAAGATGTCCCAGCCCAAGA
hsa	5885 KCNJ3 Rv	qPCR	CACCCGGAACATAAGCGTGAGTTT
hsa	5888 NR2F2 Fwd	qPCR	TGATGTAGCCCATGTGGAAAG
hsa	5889 NR2F2 Rv	qPCR	GCTGCCGGACAGTAACATATC
hsa	TBXT Fwd	qPCR	CCTTCAGCAAAGTCAAGCTCACC
hsa	TBXT Rv	qPCR	TGAACTGGGTCTCAGGGAAGCA
hsa	L7 Fwd	qPCR	ACCTGCAGAACCCAAATTGG
hsa	L7 Rv	qPCR	TTGACGAAGGCGAAGAAGCT