HAL
open science

Analyse des voies de régulation de la cardiogenèse et de la différenciation cardiomyocytaire

Dorota Jeziorowska

To cite this version:

Dorota Jeziorowska. Analyse des voies de régulation de la cardiogenèse et de la différenciation cardiomyocytaire. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2016. Français. NNT : 2016PA066631 . tel-01956206

HAL Id: tel-01956206

https://theses.hal.science/tel-01956206

Submitted on 15 Dec 2018

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

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

Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale Physiologie & Physiopathologie et thérapeutique ED394

UMR-S 1166 Equipe 2 Biologie et pharmacologie du remodelage cardiovasculaire

Analyse des voies de régulation de la cardiogenèse et de la différenciation cardiomyocytaire

Par **Dorota Jeziorowska**

Thèse de doctorat de Physiologie & Physiopathologie

Dirigée par Pr. Jean-Sébastien Hulot

Présentée et soutenue publiquement le mardi 13 décembre 2016

CONFIDENTIEL

Devant un jury composé de :

Pr. AGBULUT Onnik - Président

Pr. MENASCHE Philippe - Rapporteur

Pr. LACAMPAGNE Alain - Rapporteur

Pr. CHARRON Philippe - Examinateur

Dr. GABORIT Nathalie - Examinateur

Except where otherwise noted, this work is licensed under
http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/

CONFIDENTIEL

Carpe diem

CONFIDENTIEL

Remerciements

Aux membres de mon jury de thèse

Aux professeurs Philippe Menasché et Alain Lacampagne pour avoir accepté d'être mes rapporteurs Merci pour votre temps et votre disponibilité.

Au professeur Onnik Agbulut pour avoir accepté d'être le président du jury.

Au professeur Philippe Charon et docteur Nathalie Gaborit pour avoir accepté être examinateur de cette thèse.

A l'UMRS1166

Au professeur Stéphane Hatem pour m'avoir accueillie dans l'unité U1166

A l'équipe 2

Au professeur Jean-Sébastien Hulot pour m'avoir donné l'opportunité d'effectuer ma thèse sous sa direction. De m'avoir donné la chance partir à New York où j'ai appris pleins de choses et fait la connaissance de gens formidables. Pour sa patience et sa persévérance à la fin de ma thèse.

A Olivier et Sébastien pour leur relecture et leur patience.

A Sophie pour les mots qui remontent le moral.

A ma famille / dla mojej rodziny

A Aymeric, Nadine, Baptiste, Miguel

Dla Taty i Mamy, Madzi i Hani

Et...

CONFIDENTIEL

Sommaire

Remerciements 5
Sommaire 7
Abréviations 9
Table des illustrations 11
Introduction générale 13
Chapitre 1 : MALADIES CARDIAQUES 15
Insuffisance cardiaque 15
Cardiomyopathies associées a des mutations du sarcomère : les sarcomeropathies 25
Canalopathies 37
Chapitre 2 : CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES INDUITES (IPSC) 45
Pluripotence 45
Cellules souches pluripotentes induites (iPSc) 49
Utilisation des cellules souches pluripotentes induites en recherche médicale 66
Chapitre 3 : EDITION DU GENOME 77
La recombinaison homologue : 78
Nucléases et nickases 79
CRISPRi et CRISPRa 83
Objectifs de travail 85
Première partie : La maturation différentielle du sarcomère de cardiomyocytes dérivés d'iPSC par un protocole en monocouche vs un protocole basé sur l'agrégation 91
Deuxième partie : Modélisation de la susceptibilité au syndrome de QT long induit par des médicaments avec un panel de cellules iPS sujets spécifiques 125
Trosième partie : La génération de cellules souches pluripotentes induites issues de patients pour le traitement de maladies cardiaques. 169
Quatrième partie : Méthode d'enrichissement de la différenciation cardiaque des cellules souches pluripotentes par l'activation de la transcription de gènes cardiogéniques à l'aide de la dCas9. 185
Introduction. 187
Matériels et méthodes 189
Construction des plasmides : 189
Nucleofection des iPSC 190
PCR quantitative 191
FACS 191

CONFIDENTIEL

Immunofluorescence 191
Résultats 192
Sélection du transactivateur dCas9 192
Multiplexage des gARN par la technique du Golden Gate 194
Dessin de 4 nouveaux gARN de GATA4 195
Création du vecteur d'expression multiplexé GATA4, Mef2c et Tbx5 196
Mise au point d'un nouveau protocole de différenciation basée sur l'approche de transactivation spécifique d'un programme cardiogénique 197
Conclusions 203
Discussion générale et perspectives 205
Bibliographie 219

CONFIDENTIEL

Abréviations

AAV	Adeno-associated virus
ACE	angiotensin converting enzyme
ADN	Acide désoxyribonucléique
AHA	American Heart Association
APEL	animal product free medium
ARN	acide ribonucléique
BMP	Bone morphogentic proteins
BNP	brain natriuretic peptide
CASQ2	calséquestrine
CBP	CREB binding protein
CM	cardiomyocyte
CMD	cardiomyopathie dilatée
CMH	cardiomyopathie hypertrophique
CMNC	la non-compaction ventriculaire gauche
CMR	cardiomyopathie restrictive
CMT	cardiacs microtissue
CPI	cardiopathies ischémiques
CPVT	Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CSE	cellules souches embryonnaires
DNA	Deoxyribonucleic acid
DSC2	desmocolline-2
DSG2	desmoglein-2
DSP	desmoplakine,
DVDA	dysplasie ventriculaire droite arythmogène
EB	Embryoid Body
ECCs	embryonal carcinoma cells
ECG	électrocardiogramme
EGCs	cellules souches germinales
EHT	engineered heart tissue
EpiSCs	ESCs derivés d'epiblastes
ESC	embryonic stem cells
ESC	European Society of Cardiology
FEVG	fraction ejection ventricule gauche
FGF	fibroblast growth factor
FV	fibrillation ventriculaire
IC	insuffisance cardiaque
IEC	inhibiteur de l'enzyme de conversion
IPSC	induced pluripotent stem cells
IWP	inhibitor of Wnt production
IWR	inhibitor of Wnt reponse
JUP	plakoglobin
LI-APPEL	Low –insulin APEL medium
LVAD	left ventricular assist device
LVEF	left ventricular ejection fraction
MEF	mouse embryonic fibroblasts
mGSCs,	cellules souches germinales multipotentes dérivées de cellules néonatales de testicules de souris

CONFIDENTIEL

MSC	Mesenchymal stem cell
MYBPC3	cardiac myosin binding protein C
NGS	Next-Generation Sequencing
NYHA	*New York Heart Association*
PGCs	cellules dérivées de cellules germinales primordiales
PKP2-	plakophiline 2
QTc	QT corrigé
RMCE	Recombination-Mediated Cassette Exchange
RNA	ribonucleic acid
RYR2	récepteur à la ryanodine
SA	sarcomeric actin
SCNT	Transfert nucléaire de cellules somatique
SQTC	syndrome QT court
SQTL	syndrome QT long
ssTNI	slow skeletal Troponin I
TALEN	Transcription Activator-like Effector Nucleases
TV	tachycardie ventriculaire
TVC	Tachycardies Ventriculaires Catécholergiques
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VIH	virus de l'immunodéficience humaine
WHF	World Heart Federation
ZFN	Zinc finger nuclease

CONFIDENTIEL

Table des illustrations

Figure 1: Prévalence déclarée des cardiopathies ischémiques (CPI) et de l'insuffisance cardiaque (IC) selon le sexe et l'âge en France. (Sources : enquêtes Handicap-Santé Ménages 2008 et Hanicap –Santé Institutution 2009) 15
Figure 2 : Réduction de la fraction d'éjection (Servier Medical Art) 17
Figure 3: Tableau de la classification NYHA 19
Figure 4: Classification AHA 2006 (Arbustini et al. 2013) 25
Figure 5: Classification ESC 2008 (Arbustini et al. 2013) 26
Figure 6: Classification MOGES (Arbustini et al. 2014) 27
Figure 7: Types de cardiomyopathies (Servier Medical Art) 29
Figure 8: Le sarcomère en microscopie électronique 30
Figure 9: Les protéinés du sarcomère 32
Figure 10 Représentation schématique des gènes majeurs de canalopathies (Webster and Berul 2013) 38
Figure 11 ECG de SQTL (Mizusawa, Horie, and Wilde 2014) 39
Figure 12 Les gènes associés au SQTL (Mizusawa, Horie, and Wilde 2014) 40
Figure 13 ECG d'un patient avec l'intervalle QTc de 310ms (Lupoglazoff and Denjoy 2007) 41
Figure 14: Schéma cellules souches (Menon et al. 2016) 45
Figure 15: Une représentation schématique des différentes techniques d'obtention d'iPS. (Bayart and Cohen-Haguenauer 2013) 50
Figure 16: Schéma de la génération de cardiomyocytes (Van Vliet et al. 2012) 56
Figure 17: Schéma de la voie Wnt et les inhibiteurs de cette voie avec leur cibles active. (Adapté de Blagodatski et al, 2014) 59
Figure 18: Signaux pour la création du muscle cardiaque au cours de l'embryogenèse et différenciation des cellules souches (Noseda et al. 2011) 60
Figure 19: Tableau récapitulatif de modélisation du syndrome QT (Savla et al, 2014) 69
Figure 20: Representation de ZFNs 80
Figure 21 : Representation de TALENs 81
Figure 22 : Representation de CRISPR 82
Figure 23: L'évolution de nucléases au nickases 82

CONFIDENTIEL

Figure 24 : A. Schéma de la connaissance actuelle des facteurs impliqués dans la différenciation cardiaque de l'IPSC (Burridge et al. 2012) B. Voies qui contrôlent la transcription de GATA4, Mef2c et Tbx5(Qiagen Ingenuity pathway analysis)..... 189
Figure 25 : Comparaison de l'efficacité de la version modifiée dCas9-VPR par rapport à la forme simple dCas9-Vp64. 193
Figure 26 : Création et validation d'un système unique d'expression multiplexée des gARN..... 194
Figure 27 : Dessin et validation de 4 nouveaux gARN ciblant la région promotrice du gène GATA4 codant pour un facteur de transcription essentiel dans l'initiation de la formation du mésoderme pré-cardiaque..... 195
Figure 28 : Production d'une matrice permettant l'expression multiplexée de gARN contre trois gènes de la cardiogenèse : GATA4, Mef2c et Tbx5. 197
Figure 29 : Expression de GATA4 et Mef2c, 4 et 8 jours après transfection de sondes contre GATA4 ou de trois concentrations croissantes de GMT..... 199
Figure 30 : A. Sur-expression de Gata4, Mef2c et Tbx5, 4 jours après la nucléofection B. expression de la cTNT (TNNT2) 14 jours après la transfection de dCas9-VPR et multiplex GMT par rapport à un contrôle 200
Figure 31 : Optimisation de l'effet GMT par combinaison à une approche pharmacologique. 202
Figure 32 : Nouveau schéma expérimental de différenciation par approche GMT combinée à une stimulation pharmacologique. 202
Figure 33: Vue d'ensemble des voies Wnt impliquées dans la maturation des cardiomyocytes..... 210
Figure 34 : Stratégies de maturation de CM dérivés des iPSC. 212

CONFIDENTIEL

Introduction générale

CONFIDENTIEL

Chapitre 1 : MALADIES CARDIAQUES

Insuffisance cardiaque

Epidémiologie

L'insuffisance cardiaque est devenue en quelques années un problème majeur de la santé publique. Cette pathologie grave et fréquente touche environ 1 million de personnes en France (Gabet et al. 2015) et 15 millions en Europe. Environ 1-2% de la population adulte dans les pays développés est touchée par l'insuffisance cardiaque, avec une prévalence qui augmente jusqu'à 10% pour les personnes de 70 ans et plus (Mcmurray et al. 2012). L'insuffisance cardiaque est la troisième cause de la mortalité cardiovasculaire. La prévalence augmente avec l'âge surtout à partir de 50 ans (Krum and Abraham 2009). Le pronostic de survie est faible, avec plus de la moitié des atteints décédant dans les 4 ans après le diagnostic. Les femmes sont moins fréquemment atteintes d'insuffisance cardiaque que les hommes, mais l'évolution des comportements et des modes de vie tente à les inclure dans la population à risque. 100 000 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année (Delahaye F 2001).
Le risque de voir apparaître une insuffisance cardiaque après 40 ans est de 21 % chez l'homme et 20 % chez la femme d'après l'étude de Framingham aux Etats-Unis (Jones et al, 2002). Une autre étude, souligne qu'après 55 ans le risque d'apparition d'une insuffisance cardiaque est de 33 % chez l'homme et 28.5 % chez la femme (Bleumink et al. 2004). Une baisse de la mortalité et une amélioration de la qualité de vie de patients a été rendu possible grâce à de meilleurs traitements.

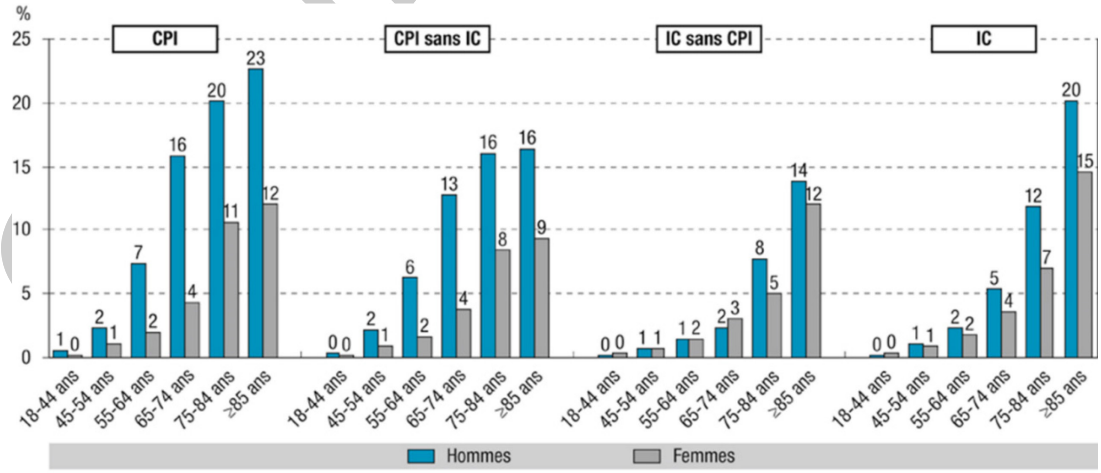


Figure 1: Prévalence déclarée des cardiopathies ischémiques (CPI) et de l'insuffisance cardiaque (IC) selon le sexe et l'âge en France. (Sources : enquêtes Handicap-Santé Ménages 2008 et Hanicap – Santé Institution 2009)

Causes

L'insuffisance cardiaque est la conséquence de nombreuses maladies cardiovasculaires. Les causes ischémiques, notamment consécutives à une obstruction des artères coronaires (infarctus du myocarde), sont les causes principales de l'insuffisance cardiaque. L'insuffisance cardiaque ischémique est retrouvée chez la moitié des patients ayant une insuffisance cardiaque. Les patients présentent généralement des facteurs de risque cardio-vasculaires qui peuvent aussi participer à l'insuffisance cardiaque particulièrement le diabète, l'hypertension artérielle et les anomalies valvulaires consécutives aux atteintes ischémiques de l'appareil sous-valvulaire ou à la dilatation cardiaque. L'insuffisance cardiaque ischémique survient donc généralement chez des patients présentant des facteurs de risque cardio-vasculaires, typiquement chez des patients de plus de 50 ans.

Les causes valvulaires, notamment post-rhumastismales, représentent environ 25% des causes d'insuffisance cardiaque en Europe, mais cette cause est en nette régression en Europe de l'Ouest et en France.

Il existe aussi des facteurs génétiques qui peuvent être à l'origine de pathologies du myocarde qui évolueront dans le temps en insuffisance cardiaque. Elles sont nommées cardiomyopathies et peuvent se présenter sous différentes formes (cf infra). Selon les statistiques Européennes, les cardiomyopathies représentent 12% des formes d'insuffisance cardiaque. Une atteinte ventriculaire droite plus spécifique peut apparaitre secondairement à une dysplasie ventriculaire droite arythmogène (DVDA). Les autres causes de cardiomyopathies (dilatées ou hypertrophiques) touchent plus spécifiquement le ventricule gauche. Enfin, les cardiomyopathies restrictives sont beaucoup plus rares mais peuvent altérer la fonction systolique et diastolique ventriculaire gauche. Les cardiomyopathies primitives surviennent chez des patients plus jeunes qui n'ont généralement pas de facteurs de risque cardiovasculaires particuliers.

De même, certaines atteintes du muscle cardiaque peuvent être consécutives à des causes toxiques ou environnementales. Certaines chimiothérapies anti-cancéreuses (par anthracyclines notamment) peuvent causer de manière dose-cumulative une insuffisance cardiaque.

Enfin, dans le cas de la dysfonction systolique gauche, une altération de la fonction musculaire peut survenir des suites d'une myocardite virale (VIH) ou parasitaire (maladie de Chagas), d'une cardiomyopathie dilatée ou encore de maladies neuromusculaires (dystrophie de Duchenne). On notera que les causes infectieuses sont rares en Europe (#2-3%) des cas, alors que la cardiomyopathie dilatée est principalement liée à la maladie de Chagas en Amérique du Sud ou Central.

Ceci montre l'hétérogénéité des causes d'insuffisance cardiaque dans le monde. Cependant, les causes ischémiques et les cardiomyopathies sont les causes principalement rencontrées dans les pays développés.

CONFIDENTIEL

Définition

L'insuffisance cardiaque est un syndrome clinique qui survient quand le cœur ne peut plus assurer sa fonction de pompe mais il s'agit plutôt d'un syndrome que d'une maladie spécifique. Ainsi, l'insuffisance cardiaque est caractérisée par des symptômes dits « typiques » et une fonction anormale du ventricule. Ces symptômes sont la conséquence de l'incapacité du cœur à pomper et à éjecter suffisamment de sang pour irriguer correctement d'organisme (McMurray and Pfeffer 2005). De plus, on peut distinguer deux types de fonctions anormales du ventricule : la dysfonction systolique et la dysfonction diastolique.

i. Dysfonction systolique :

C'est une anomalie de la contraction du myocarde ventriculaire qui n'arrive plus à se contracter pour envoyer le sang dans tout organisme. Cette anomalie touche tous les âges. Le débit cardiaque est proportionnel à la fréquence cardiaque et au volume d'éjection systolique (Krum and Abraham 2009). Le volume diastolique est le volume du ventricule plein.

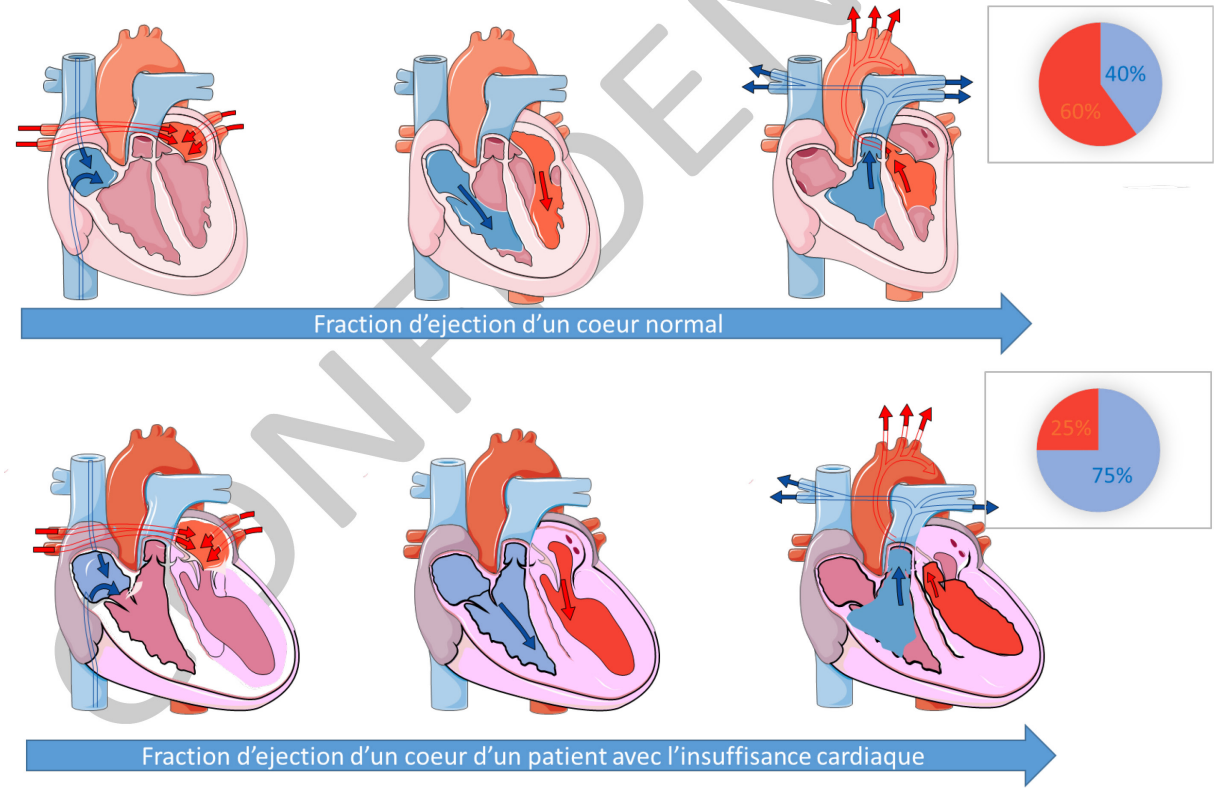


Figure 2 : Réduction de la fraction d'éjection (Servier Medical Art)

Le volume systolique est le volume minimal du ventricule une fois vidé après la contraction du muscle. La fraction d'éjection (exprimé en pourcentage) est le rapport du volume systolique sur le volume diastolique. Un individu sain a une fraction d'éjection supérieure à 60%. La fraction d'éjection diminue avec les anomalies de contractilité cardiaque. Dans les nouvelles recommandations européennes, la

CONFIDENTIEL

fonction systolique est réduite lorsque la fraction d'éjection est inférieure à 40%. Une fraction inférieure à 35% indique généralement une atteinte sévère. Par ailleurs, une fraction d'éjection entre 40 et 50% définit maintenant une catégorie de patients avec une dysfonction systolique modérée. Ces patients présentent une forme plus limitée de dysfonction systolique, ce qui indique une intervention thérapeutique plus limitée.

Le débit cardiaque dépend de la contractilité du cœur mais aussi de la pré-charge ou la post-charge :

- la pré-charge est caractérisée par le remplissage des ventricules et est liée au volume sanguin circulant. Si une insuffisance cardiaque n'est pas traitée, les pressions de remplissage des ventricules sont plus élevées et ceci se répercute sur les pressions circulantes d'amont au niveau de la circulation pulmonaire. Ceci explique les symptômes d'essouflement et de congestion pulmonaire.
- La post-charge est liée à la résistance à l'éjection du ventricule gauche. La post-charge peut-être mesurée par la pression artérielle. Une augmentation de la pression artérielle élevée de manière prolongée peut entrainer l'insuffisance cardiaque. Toute anomalie de l'une ces variables peuvent conduire à l'apparition de l'insuffisance cardiaque.

ii. Dysfonction diastolique

Cette dysfonction est due à une altération de la fonction de relaxation du muscle cardiaque entraînant des troubles du relâchement du muscle cardiaque et de la compliance. La compliance désigne la possibilité d'un organe à pouvoir adapter son volume à une pression. Elle correspond à ses capacités de souplesse, de distension. La relaxation c'est le relâchement du muscle cardiaque après sa contraction ce qui permet un remplissage rapide du ventricule. L'anomalie de la relaxation ou de la compliance entraine une diminution du remplissage du ventricule gauche par perte d'aspiration post-systolique. Les pressions d'amont au niveau pulmonaire s'élèvent compte-tenu de la difficulté à remplir le ventricule gauche non compliant. Le muscle cardiaque s'épaissit et se rigidifie, par conséquence le volume de sang envoyé dans le système circulatoire est réduit, les quantités d'oxygène et autres substances vitales transportées sont par conséquent également réduites.

Symptômes de l'insuffisance cardiaque

Le premier signe de l'insuffisance cardiaque est l'essoufflement. Cela commence par une gêne respiratoire qui est liée à la stase de sang et l'extravasation de liquide dans les alvéoles pulmonaires. Au fur à mesure de l'établissement de la maladie, un essoufflement à l'effort s'installe et se manifeste par la suite au repos.

Le deuxième signe de l'insuffisance cardiaque est la fatigue ressentie même après un petit effort. En plus de la dyspnée d'effet, elle peut être due au déficit d'irrigation sanguine dans les muscles, qui ne reçoivent pas un apport normal en énergie.

CONFIDENTIEL

Un troisième signe de l'insuffisance cardiaque est le gonflement des membres par la congestion périphérique ; les œdèmes apparaissent par extravasation dans les téguments périphériques et une prise de poids importante et rapide est observée.

D'autres signes peuvent apparaitre comme des palpitations, des baisses de tension, des douleurs abdominales ou de l'aire héptique, et sont souvent concomitants d'une réduction franche de la capacité d'éjection du muscle cardiaque. Ces signes sont dits de bas débit et traduisent les perturbations hémodynamiques sur les organes périphériques.

Enfin, des nombreuses atteintes cardiaques peuvent se traduire par des troubles rythmiques aigus se traduisant éventuellement par une mort subite (ou un arrêt cardiaque) inaugurale.

Des classifications de la maladie ont été mis en place, la plus couramment utilisée est la classification de la NYHA (New York Heart Association). Cette classification permet de quantifier et surveiller le retentissement fonctionnel de l'insuffisance cardiaque chez un patient et présente un intérêt pronostic notable.

Classe I : Pas de limitation, l'activité physique ordinaire n'entraîne pas de fatigue anormale, de dyspnée ou de palpitations.

Classe II : Limitation modeste de l'activité physique : à l'aise au repos, mais l'activité ordinaire entraîne une fatigue, des palpitations ou une dyspnée.

Classe III : Réduction marquée de l'activité physique : à l'aise au repos, mais une activité moindre qu'à l'accoutumée provoque des symptômes.

Classe IV : Impossibilité de poursuivre une activité physique sans gêne : les symptômes de l'insuffisance cardiaque sont présents, même au repos, et la gêne est accrue par toute activité physique.

Figure 3: Tableau de la classification NYHA

Cette classification est toutefois critiquée à cause de son caractère subjectif et non reproductif. D'autres classifications existent également. Elles sont basées sur critères radiologiques et hémodynamiques en plus des signes physiques. Ce sont les classifications de Killip et de Forrester pour les formes aiguës d'insuffisance cardiaque en cas de déstabilisation.

Toute irrégularité de ce circuit électrique est appelée arythmie ou trouble du rythme cardiaque. Les arythmies sont très courantes ; elles touchent des millions de personnes dans le monde entier et peuvent se manifester sous la forme d'un rythme cardiaque trop lent ou trop rapide. Ces rythmes cardiaques anormaux peuvent passer inaperçus ou se traduire par des palpitations, des vertiges ou des syncopes. Une arythmie peut causer :

- un rythme cardiaque anormalement rapide (tachycardie),
- un rythme cardiaque anormalement lent (bradycardie),
- un rythme cardiaque irrégulier ou asynchrone (asynchronisme).

La plupart des arythmies sont sans danger, cependant certaines peuvent être graves et provoquer une mort subite par arrêt cardiorespiratoire. Parmi les arythmies potentiellement mortelles figurent :

- La tachycardie ventriculaire (TV), accélération dangereuse du rythme cardiaque dans les deux cavités inférieures,
- La fibrillation ventriculaire (FV), tremblement rapide et désordonné des ventricules, qui peut être déclenché par des crises de TV.

Les rythmes rapides et désordonnés de la tachycardie ventriculaire et de la fibrillation ventriculaire réduisent l'efficacité du cœur comme pompe. Pendant une fibrillation ventriculaire, le cœur bat très rapidement et anarchiquement, empêchant le remplissage et l'éjection du sang. Il devient alors incapable de faire circuler le sang dans l'organisme et le cerveau. Sans traitement immédiat, la FV entraîne un arrêt cardiorespiratoire et la mort en quelques minutes.

En France, la mort subite représente 5 à 10 % du nombre de morts et près de la moitié des décès de cause cardiaque. Chaque année, près de 40 000 adultes décèdent de mort subite. C'est souvent la première (et malheureusement la dernière) manifestation de problèmes cardiaques insoupçonnés. Elle correspond à la survenue inattendue d'un décès, moins d'une heure après le début de symptômes évocateurs d'une ischémie du muscle cardiaque. Les symptômes physiques peuvent être une douleur dans la poitrine et essoufflement. L'un des challenges est de pouvoir identifier les personnes les plus exposées. Plusieurs facteurs de risque sont aujourd'hui identifiables parmi lesquels le surpoids/obésité, l'hypertension, le cholestérol et le tabagisme. Face à chacun de ces paramètres, il est possible d'intervenir en favorisant une bonne alimentation, de l'exercice physique, un sevrage tabagique et un traitement médicamenteux.

Diagnostic

Le diagnostic est basé sur les symptômes physiques listés ci-dessus et des signes cliniques confirmés par des tests appropriés. Ces symptômes peuvent être considérés au départ comme anodins par les patients qui consultent souvent tardivement, l'insuffisance cardiaque étant déjà bien installée.

CONFIDENTIEL

Les signes cliniques font partie des « Critères de Framingham». Ces critères sont classés en deux groupes : Les critères mineurs et les critères majeurs. Une insuffisance cardiaque est considérée si deux critères majeurs ou un critère majeur et deux mineurs sont présents. Les critères majeurs sont : dyspnée paroxystique nocturne ou orthopnée, distension veineuse, cardiomégalie, râles crépitants, œdème pulmonaire, troisième bruit cardiaque (galop), augmentation de la pression veineuse centrale, reflux hépato-jugulaire. Les critères mineurs sont : œdème bilatéral des chevilles, toux nocturne, dyspnée d'effort, épanchement pleural, hépatomégalie, tachycardie (supérieure à 120 battements par minute), capacité vitale réduite de 30%. Un autre critère est la perte de poids >4.5kg en 5 jours après la mise en place de traitement déplétif.

Les tests réalisés en routine sont l'électrocardiogramme (ECG) et la radiologie pulmonaire. Ces tests peuvent mettre en évidence une dysfonction systolique. Ces deux tests sont complétés par une échographie cardiaque et un dosage sanguin du BNP (brain natriuretic peptide). L'échographie cardiaque apporte des informations sur la maladie cardiaque causale, elle permet d'évaluer le stade de l'insuffisance cardiaque en analysant la morphologie du ventricule gauche et la fonction systolique (McMurray, 2005, Krum, 2009). L'IRM (imagerie par résonnance magnétique) peut apporter une précision quant à l'évaluation de la structure et de la fonction ventriculaire mais elle n'est pas disponible en routine. Le dosage du BNP ou de son précurseur (NT-proBNP) permet d'obtenir un premier diagnostic rapide. Le BNP est un peptide sécrété par le cœur dont le volume est élargi par l'effort, ainsi son taux est augmenté dans le cas d'insuffisance cardiaque aiguë.

Traitement

i. Traitement pharmacologique

Le traitement pharmacologique de l'insuffisance cardiaque avec dysfonction systolique est basée sur un trépied cherchant à inhiber l'hyperactivation neuro-hormonale adrénergique et du système rénine-angiotensine-aldostérone, et un traitement anti-congestif par diurétiques. Le blocage du SRAA est obtenu avec des inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) (ACE en anglais pour angiotensin-converting-enzyme). Ce traitement est recommandé chez tous les individus ayant une dysfonction ventriculaire systolique (Investigators 2000). Pour les patients qui ne tolèrent pas l'IEC, il est recommandé de le remplacer par un bloqueur des récepteurs à l'angiotensine. Plus récemment un traitement combinant un bloqueur des récepteurs à l'angiotensine (Valsartan) avec un inhibiteur de la néprilysine qui agit sur le système natriurétique. Un traitement avec un bétabloquant est indispensable pour bloquer l'hyperactivition adrénergique et ses conséquences notamment rythmiques. L'utilisation des inhibiteurs de l'enzyme de conversion ou des bloqueurs des récepteurs à l'angiotensine, des

CONFIDENTIEL

bétabloquants et des diurétiques ont eu une influence importante en permettant une forte baisse du taux de mortalité et de ré-hospitalisations due à l'insuffisance cardiaque.

ii. Traitement non-pharmacologique

En complément de traitements pharmacologiques un changement des habitudes et modes de vie est essentiel. Chez les patients avec une insuffisance cardiaque chronique et stabilisé, l'activité physique est très recommandée. Les exercices adaptés sont l'aérobic et la gym douce ; Ils améliorent la fonction ventriculaire. La réduction de consommation de sel est recommandée, même si une étude de 2008 à démontré qu'une consommation « normale » de sel améliore l'issue clinique. La déplétion en sel a des effets nuisibles sur les reins et neurohormones (Paterna et al. 2008). La supplémentation de diète avec le coenzyme Q10 et de micronutriment améliore la capacité fonctionnelle, la fonction endothéliale et la contractilité du ventricule gauche (Belardinelli et al. 2006). D'autres recommandations sont la restriction de la consommation d'alcool et l'arrêt du tabagisme.

D'autres moyens non pharmacologiques sont proposés aux patients présentant une insuffisance cardiaque systolique :

a. La resynchronisation cardiaque par stimulation bi-ventriculaire

Cette thérapie est basée sur la présence d'une désynchronisation ventriculaire, qui est définie par la durée du QRS d'au moins 120ms sur la surface de l'ECG. La désynchronisation peut augmenter entre le ventricule gauche et droit, en déséquilibrant le ventricule gauche et la capacité de du cœur à assurer sa fonction de pompe. Ce phénomène peut être amélioré par la stimulation bi-ventriculaire. Ce dispositif peut avoir un effet inverse sur le remodelage surtout chez les patients non-ischémiques. Il diminue la morbidité et la mortalité chez patient non-ischémique comme chez les patients ischémiques. Ce traitement est utilisé chez tous les patients chez lesquels les LVEF est de moins de 35%, s'il n'y a pas d'autres contre-indications.

b. Défibrillateur automatique implantable

Initialement les défibrillateurs ont été implantés chez les survivants de la mort subite pour traiter des épisodes de tachycardie et fibrillation ventriculaire. L'utilisation des défibrillateurs peut être aussi utile dans la prévention primaire de la mort subite en cas de risque élevé, notamment indiqué par une dysfonction systolique sévère (FEVG < 35%). Chez les patients susceptibles de faire une rechute d'infarctus de myocarde ainsi que chez les patients avec une dysfonction avancée du ventricule gauche. L'implantation prophylactique de défibrillateur améliore la survie et est recommandée comme thérapie pour prévenir les accidents rythmiques (A. Moss et al. 2002; Bardy et al. 2005) . Dans ces études, la mortalité a été réduite de 20 à 30% et le risque de la mort subite évité.

CONFIDENTIEL

iii. Traitement chirurgical : assistance ventriculaire gauche (LVAD)

Les traitements chirurgicaux sont généralement réservés pour les traitements des stades les plus avancés de l'insuffisance cardiaque. Une assistance circulatoire est prescrite chez les patients en phase terminale de l'insuffisance cardiaque. Ce dispositif fait fonction d'une pompe. Cette assistance est classiquement utilisée dans trois situations cliniques :

- En transition vers la greffe, pour des patients attendant une greffe mais ayant besoin d'un support avant de trouver un donneur compatible.
- En soutien, pour des patients ayant des formes réversibles d'une insuffisance cardiaque (ex : myocardite ou formes post cardiomyopathiques).
- A destination, pour un patient dont la condition n'est pas compatible avec une transplantation.

Le dernier recours pour les patients atteints d'insuffisance cardiaque grave et irréversible est la transplantation cardiaque. La transplantation cardiaque reste essentiellement limitée par la faible disponibilité en greffons. Le nombre de transplantés (3 500 par an dans le monde) stagne alors que les besoins augmentent. La quasi-totalité du cœur du receveur est ôtée après mise en place d'une circulation de suppléance (circulation extracorporelle) : seul le toit de l'oreillette gauche est conservé, avec ses 4 veines pulmonaires. Le cœur du donneur est ensuite mis en place et suturé aux autres gros vaisseaux (aorte, artère pulmonaire, veines caves supérieure et inférieure), ainsi qu'au toit de l'oreillette gauche. La probabilité de survie atteint presque 90 % à un an avec une durée de vie excédant fréquemment une dizaine d'années.

Les complications principales sont :

- Complications infectieuses secondaires à la chirurgie mais également à l'immunodépression induite par le traitement ;
- Rejet du greffon par le système immunitaire du receveur, traité par une augmentation du traitement immunosuppresseur. Ce rejet est diagnostiqué essentiellement par une biopsie endomyocardique (prélèvement d'un petit échantillon du ventricule droit à l'aide d'une sonde positionnée sous contrôle radiographique). Le rejet est plus fréquent dans les premiers mois après la transplantation ;
- Survenue d'un cancer, secondaire à cette immunosuppression, est également possible et constitue la deuxième cause de décès chez les greffés dont la transplantation remonte à plus de 5 ans.

La première transplantation cardiaque a été réalisée par Christiaan Barnard, chirurgien cardiaque au Cap, en Afrique du Sud, le 3 décembre 1967. Il est suivi par Norman Shumway aux États-Unis quelques mois plus tard. En France, les pionniers en sont les professeurs Christian Cabrol, Gérard Guiraudon et Maurice Mercadier à l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière, le 27 avril 1968. Le patient, Clovis Roblain, 66 ans, n'a survécu que 53 heures à la transplantation effectuée selon la méthode Barnard pour les sutures et une méthode inédite du Pr Cabrol pour la préservation du cœur prélevé chez le donneur par perfusion des artères coronaires. Les premiers greffés, à de rares exceptions près, ne survivaient pas plus de

CONFIDENTIEL

quelques semaines à l'intervention, essentiellement en raison du problème des rejets. Les années 1970 voient deux progrès importants : la préservation des cœurs des donneurs grâce au froid, permettant d'effectuer le prélèvement à distance du lieu de la transplantation, et la biopsie endomyocardique permettant le diagnostic précoce du rejet. Les années 1980 voient apparaître les premières transplantations cœur-poumon ainsi que les premiers cœurs artificiels, posés le plus souvent en attente d'un cœur compatible. La cyclosporine, puissant immunosuppresseur, apparaît durant la même époque, permettant d'améliorer significativement la durée de vie des transplantés. En 1986, les professeurs Alain Carpentier et Gilles Dreyfus procèdent à la première transplantation d'un patient sous cœur artificiel en Europe.

iv. Biothérapies de l'insuffisance cardiaque

Depuis plusieurs thérapies innovantes permettant de lutter contre l'insuffisance cardiaque ont été proposée. Ce sont des thérapies cellulaires ou géniques appelées couramment des biothérapies.

Le premier type de biothérapie est la thérapie cellulaire, qui consiste à greffer des cellules souches qui vont participer à la régénération du cœur. Les résultats sont mitigés notamment à cause de la difficulté de ces cellules à survivre dans un myocarde pathologique. Pour pallier à ce problème, la première greffe de progéniteurs cardiaques dérivés d'ESC humaines et mis en place sur un patch cellularisé a été effectuée par le professeur Menasché en 2014. Pendant un pontage coronaire chez une patiente atteinte d'insuffisance cardiaque, un patch a été greffé dans le cœur. Ce patch de fibrine contenait des cellules SSEA1+ dérivées d'ESC de la lignée I6.(Menasché and Vanneaux 2016) L'utilisation d'ESC pose cependant un problème éthique. Ces cellules ne sont pas spécifiques du receveur celles-ci peuvent être considérées comme un corps étranger et potentiellement être rejetées. L'arrivée des iPSC a incité des chercheurs à développer de nouveaux patchs cellulaires contenant des cardiomyocytes dérivés d'IPSC. Récemment un patch de collagène contenant des cardiomyocytes dérivés d'iPSC a été mis au point (Joanne et al. 2016).

L'autre type de biothérapie est la thérapie génique qui fait appel à des AAV (vecteur dérivé d'adénovirus) pour exprimer ou surexprimer des cibles moléculaires d'intérêt de manière non-transitoire (Hammoudi, Ishikawa, and Hajjar 2015). De nombreuses études précliniques sont en cours, néanmoins peu passent au stade clinique. Cependant, pour SERCA2A, l'effet *in vitro* et *in vivo* a été étudié dans un modèle de rat avec une insuffisance cardiaque ; la surexpression de la cible permet une amélioration de la fonction cardiaque (Rincon, VandenDriessche, and Chuah 2015). Cela a conduit à un premier essai clinique de surexpression la pompe SERCA2A via un vecteur AAV1 qui s'est montré sûr et efficace en phase 1 et phase2 de l'étude. Malheureusement, l'effet en termes de réduction de morbi-mortalité s'est révélé limité dans l'essai de phase 2b CUPID-2.

CONFIDENTIEL

Cardiomyopathies associées a des mutations du sarcomère : les sarcomeropathies

Classification des cardiomyopathies

Les cardiomyopathies sont des troubles primaires du muscle cardiaque associées à des anomalies de l'épaisseur des parois du cœur, de la taille de la chambre, des contractions, de la relaxation et de la conduction ainsi que du rythme. Les cardiomyopathies sont de ce fait très hétérogènes, et plusieurs classifications ont été proposées. Ces classifications évoluent avec le temps, témoignant des avancées dans la compréhension de ces pathologies mais aussi dans les descriptions des causes génétiques de celles-ci.

i. Classification de l'AHA (2006)

En 2006, l'AHA (American Heart Association) a édité une déclaration scientifique (Maron et al. 2006) qui redéfinit les cardiomyopathies comme un groupe hétérogène des maladies du myocarde associé à des dysfonctions mécaniques ou électriques, et qui peuvent être liées à une hypertrophie ou dilatation ventriculaire due à une variété des causes, le plus souvent génétiques.

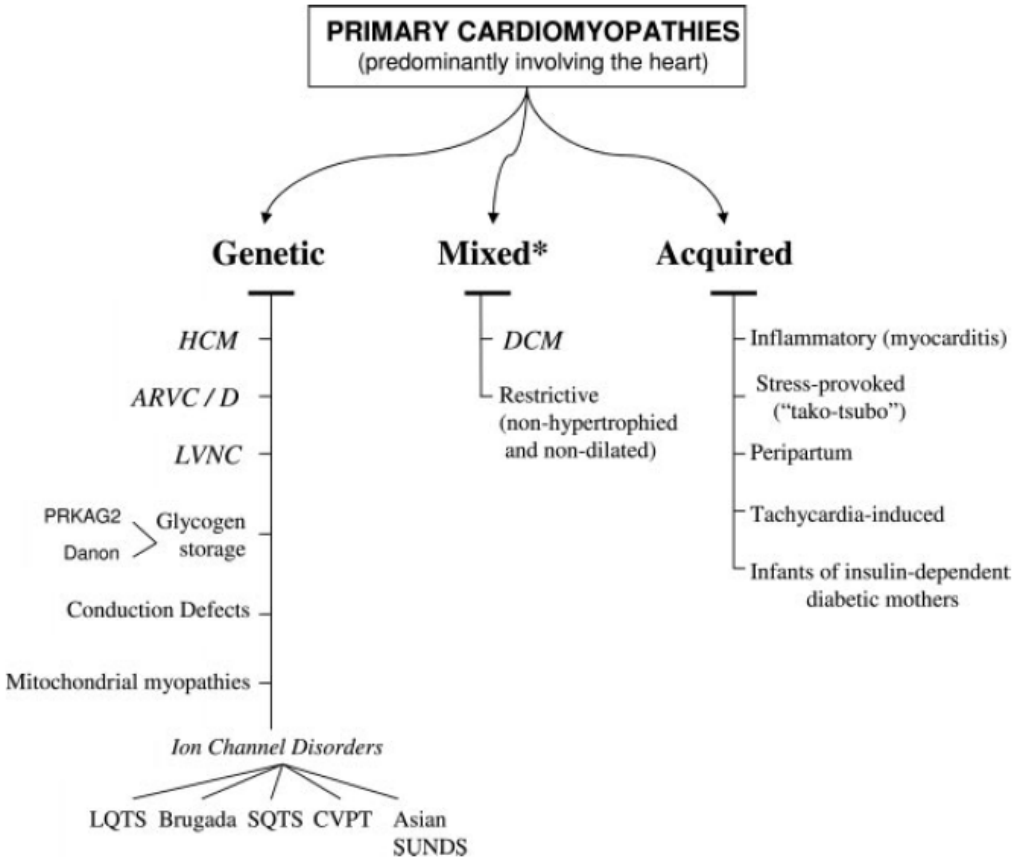


Figure 4: Classification AHA 2006 (Arbustini et al. 2013)

L'AHA a classifié les cardiomyopathies en cardiomyopathies primaire et secondaire. Dans les cardiomyopathies primaires on distingue trois groupes : génétique, mixte et acquis. Dans la sous-catégorie de cardiomyopathies primaire génétiques on trouve les cardiomyopathies hypertrophiques (CMH), les dysplasies ventriculaire droite arythmogène (DVDA), la non-compaction ventriculaire gauche (CMNC), les maladies du système de conduction et les cannalopathies. Dans la sous-catégorie mixte dont la cause est génétique ou non génétique, on retrouve les cardiomyopathies dilatée (CMD) et la cardiomyopathie restrictive (CMR). Dans les cardiomyopathies acquises on retrouve la myocardite et le stress cardiomyopathique. Les cardiomyopathies secondaires ont une cause infectieuse, endocrinienne, métabolique, toxique ou infiltrative.

ii. Classification d'ESC (2008)

L'ESC (European Society of Cardiology) a souligné que la gestion de cardiomyopathie est basée sur le phénotype morpho-fonctionnel, la classification devrait être, elle aussi, basée sur celui-ci. L'ESC a aussi reconnu que certaines cardiomyopathies appelées « primaires » sont en effet des anomalies extracardiaques, qui ne justifient pas l'appellation « cardiomyopathie primaire ». Il en va de même pour les cardiomyopathies secondaires qui peuvent impliquer principalement le cœur, et ne peuvent donc plus être appelées « cardiomyopathies secondaires ».

L'ESC définit la cardiomyopathie comme une anomalie du myocarde dans laquelle le muscle cardiaque est anormal dans sa structure et fonction. Les cardiomyopathies ont été rassemblées en 5 groupes considérant leurs phénotypes morpho fonctionnels. Ces 5 groupes sont : CMD, CMH, CMR, DVDA, et divers. Ce dernier groupe rassemble les maladies que ne peuvent pas être classées dans les 4 premiers groupes. Chacun de ces types a été subdivisé en formes génétiques ou familiale et formes non génétique ou non familiales. Les cannalopathies n'ont pas été acceptées dans cette classification car les gènes codants pour les canaux ioniques n'aboutissaient pas à un phénotype morpho-fonctionnel. Dans cette classification les cardiomyopathies sont considérées comme familiales lorsqu'au moins deux membres de la famille sont atteints.

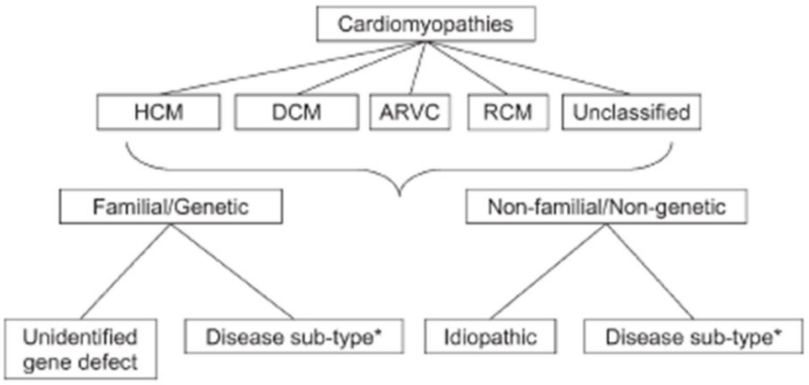


Figure 5: Classification ESC 2008 (Arbustini et al. 2013)

CONFIDENTIEL

iii. Classification MOGE(S) de WHF (2013)

En 2013 le WHF (World Heart Federation) a proposé une autre classification basée sur le phénotype et le génotype. La génétique en cardiomyopathie a énormément évolué durant les dix dernières années grâce à l'apparition de techniques de séquençage à haut débit (NGS). Plus de 60 gènes ont été associés aux cardiomyopathies. La nécessité de combiner ces deux critères est majeure car le diagnostic est encore basé sur le phénotype mais le génotype est utile dans la prescription du traitement. Dans cette classification la cardiomyopathie est définie comme une anomalie caractérisée par une morphologie et une fonction anormale du myocarde en absence de toute autre maladie qui peut provoquer le phénotype observé. La nomenclature MOGES permet de combiner 5 critères :

- **M**orphofunctional characteristic : caractéristiques cliniques observées
- **O**rgan : participation de l'organe
- **G**enetic : transmission héréditaire (génétique)
- **E**tiology : la cause génétique
- **S**tatus : statut fonctionnel couplé à la classification de NYHA (I à IV)

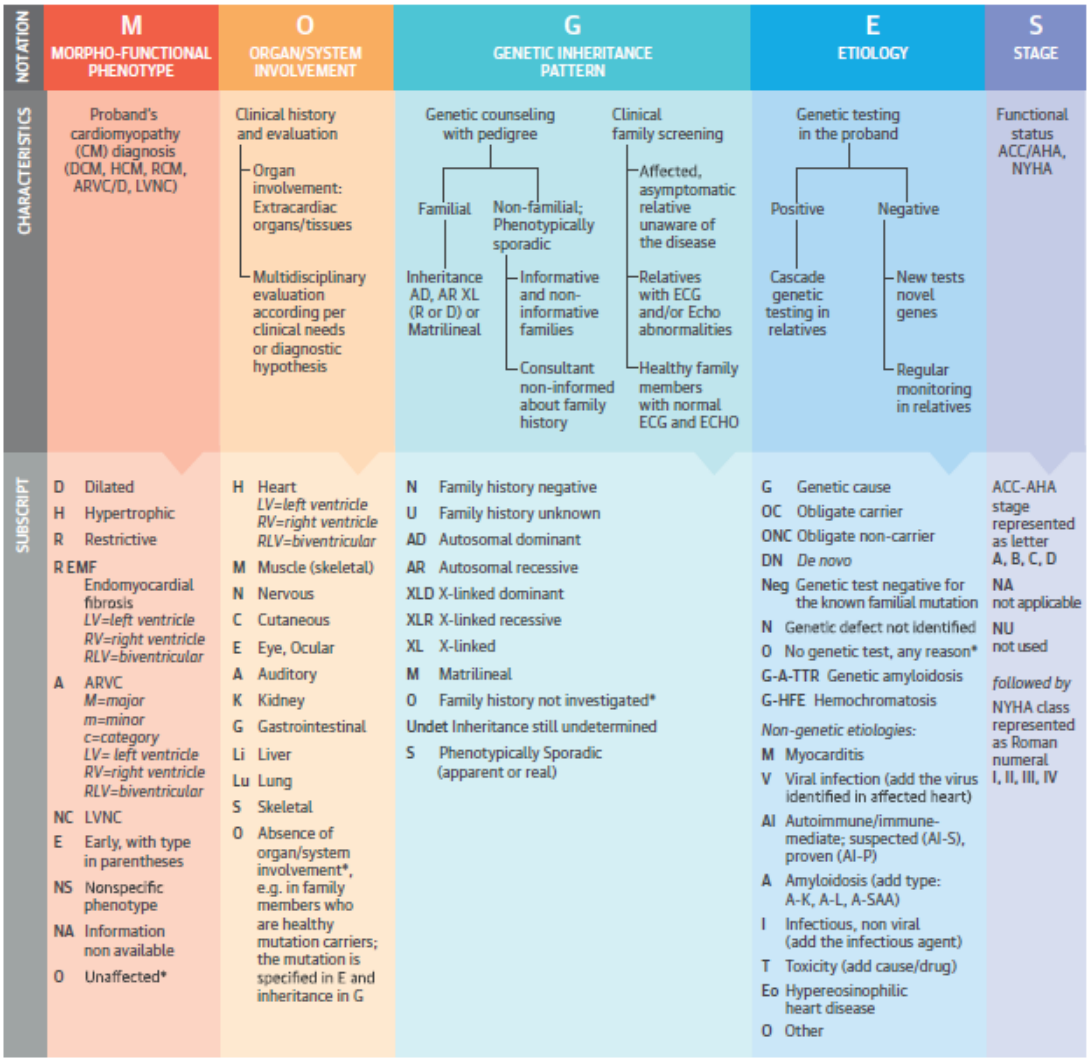


Figure 6: Classification MOGES (Arbustini et al. 2014)

Cette nomenclature est surtout utilisée par les cliniciens. Le WHF a classé les cardiomyopathies en 4 types.

Types de Cardiomyopathies

Les cardiomyopathies sont des maladies du myocarde qui évoluent dans le temps en insuffisance cardiaque. Il existe 4 types majeurs de cardiomyopathies : la cardiomyopathie dilatée (CMD), la cardiomyopathie hypertrophie (CMH), la cardiomyopathie restrictive (CMR) et la dysplasie ventriculaire droite arrythmogène (DVDA).

La CMD est caractérisée par une dilatation ventriculaire, elle peut ne concerner qu'un des deux ventricules ou les deux. Cette dilatation est associée à une altération de la fonction systolique et/ou diastolique. Son incidence est de 5 à 8% par an. Elle touche plus souvent les hommes que les femmes, entre 20 et 60 ans, mais elle peut être aussi diagnostiquée chez les enfants. Sa prévalence est de 1/2500 naissances, avec des formes familiales pour un cas sur deux. En dehors des cas familiaux, elle peut être d'origine ischémique, valvulaire ou congénitale. La CMD peut aussi être causée, en particulier, par la consommation abusive d'alcool, des infections, un diabète ou certaines chimiothérapies. Si la cause de la maladie n'est pas identifiée, cette cardiomyopathie est appelée « cardiomyopathie dilatée idiopathique ». Environ 20% des patients atteintes de la CMD peuvent présenter une forme familiale associée à une mutation de gènes codant diverses protéines présentes dans les cellules musculaires myocardique. Les mutations responsables concernant principalement les gènes présents dans le cytosquelette ou dans la fibre musculaire : le sarcomère (cf infra).

La CMH est une des cardiomyopathies les plus fréquentes. Sa prévalence est de 1/500 naissances. Chez les patients, la paroi du cœur est hypertrophiée sans que le ventricule gauche ne soit dilaté. Cette hypertrophie est primitive et n'est donc pas secondaire à d'autres anomalies comme une hypertension. La CMH est la cause la plus courante de mort subite chez les jeunes et les athlètes. La CMH se présente sous deux formes : une forme sporadique et une forme familiale. La forme sporadique atteint plus souvent les hommes que les femmes vers l'âge de 30-40ans. La forme familiale atteint plus fréquemment les femmes et survient plus précocement. La forme familiale une maladie cardiaque génétique autosomique dominante relativement courante. Ces mutations concernent les protéines contractiles sarcomériques qui entraineraient des modifications de la vitesse de contraction cardiaque due à une altération de la cinétique de l'interaction des différents filaments sarcomériques. Ces modifications morphologiques induisent une hypertrophie des myofilaments compensatrices avec des modifications de la vitesse de contraction cardiaque ou la désorganisation des certaines zones.

La CMR est une forme de cardiomyopathie avec une perte de la souplesse des parois des cavités cardiaques, principalement les ventricules. Elle est la conséquence d'une diminution de la compliance cardiaque, ce qui entraine une résistance du flux sanguin. Elle est caractérisée par une rigidité du

CONFIDENTIEL

myocarde et un dysfonctionnement diastolique, qui restreint le remplissage du cœur, d'où le nom de cardiomyopathie restrictive. La taille du ventricule gauche reste normale et l'épaisseur des parois du cœur n'est pas augmentée. C'est la forme la plus rare de cardiomyopathie. Elle peut être idiopathique, secondaire ou familiale. Les formes peuvent être associées à des mutations des protéines sarcomériques.

La DVDA est un type rare de cardiomyopathie. Elle se caractérise par le remplacement des cellules musculaire du ventricule droit par des cellules adipeuses. L'infiltration graisseuse commence par le ventricule droit et atteint secondairement le ventricule gauche. Cette accumulation graisseuse conduit à des troubles du rythme ventriculaire pouvant provoquer la mort subite chez les personnes jeunes et les athlètes. La prévalence de la DVDA est de 1 sur 1000. Cette maladie peut être idiopathique et familiale. On retrouve l'origine familiale dans près de la moitié des cas. Les mutations associées à cette pathologie sont présentes dans les gènes des protéines desmosomales (plakophiline 2 (PKP2), desmoplakine (DSP), (desmoglein-2) DSG2, JUP (plakoglobin) et (desmocolline-2) DSC2) mais également dans d'autres gènes comme le récepteur à la ryanodine (RYR2)

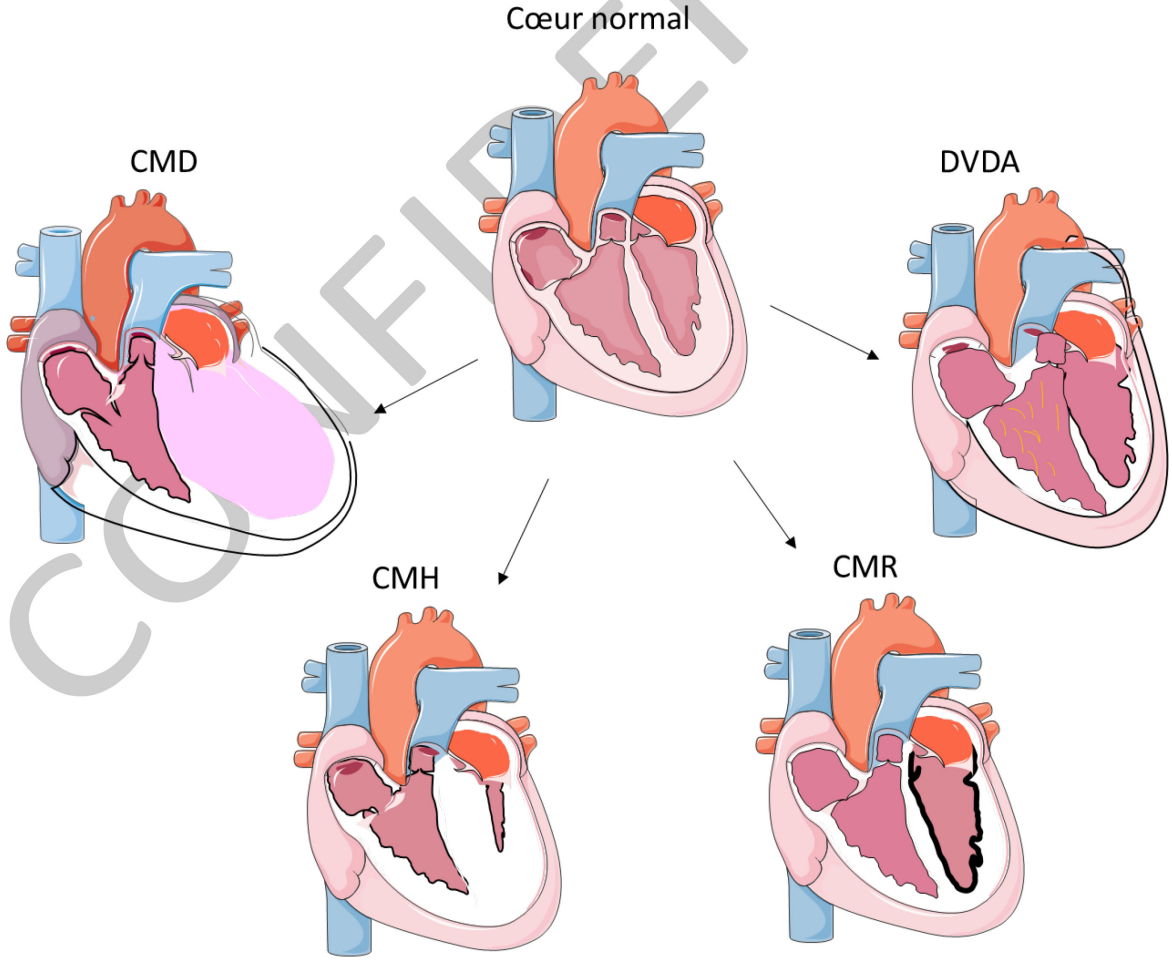


Figure 7: Types de cardiomyopathies (Servier Medical Art)

CONFIDENTIEL

Une nouvelle terminologie a été créée, basée sur le gène impliqué et son emplacement dans la maladie. Ainsi, on peut maintenant distinguer les termes de sarcomeropathies, regroupant les anomalies du myocarde liés à une atteinte primitive du sarcomère. De même, nous verrons les maladies cardiaques de type cannalopathies liées à une atteinte primitive des canaux ioniques. Je vais aborder ces deux anomalies dans mon introduction.

Sarcomère

i. La structure du sarcomère

Le sarcomère est l'unité contractile du cardiomyocyte composé des myofibrilles. Les myofibrilles sont des cylindres parallèles allongés dans le sens de la cellule, faits de la succession régulière, bout à bout, des petits cylindres identiques appelés sarcomères. Chaque sarcomère est fait d'un faisceau de myofilaments parallèles à son grand axe. Dans un sarcomère on retrouve 3 types de filaments : des filaments épais, des filaments fins et des filaments élastiques. Un sarcomère est défini comme étant le segment entre deux lignes-Z voisines.

Dans les coupes longitudinales des muscles en microscopie électroniques les lignes Z apparaissent comme une série des lignes foncées. Z vient de l'allemand « zwischen » signifiant « entre ». A côté de la ligne Z il y a la ligne I pour isotropique, suivie de la ligne A pour anisotropique. Les lignes A et I ont été nommées pour leurs propriétés sous lumière polarisante. La partie suivante est la partie H, « heller » en allemand plus pâle car elle apparait plus pâle sur une image de microscopie électronique. La ligne fait partie de la ligne H car elle est la ligne la plus mince est se situe au milieu (M « mittel » en allemand). Les bandes A, I et Z sont visible en microscope à lumière blanche.

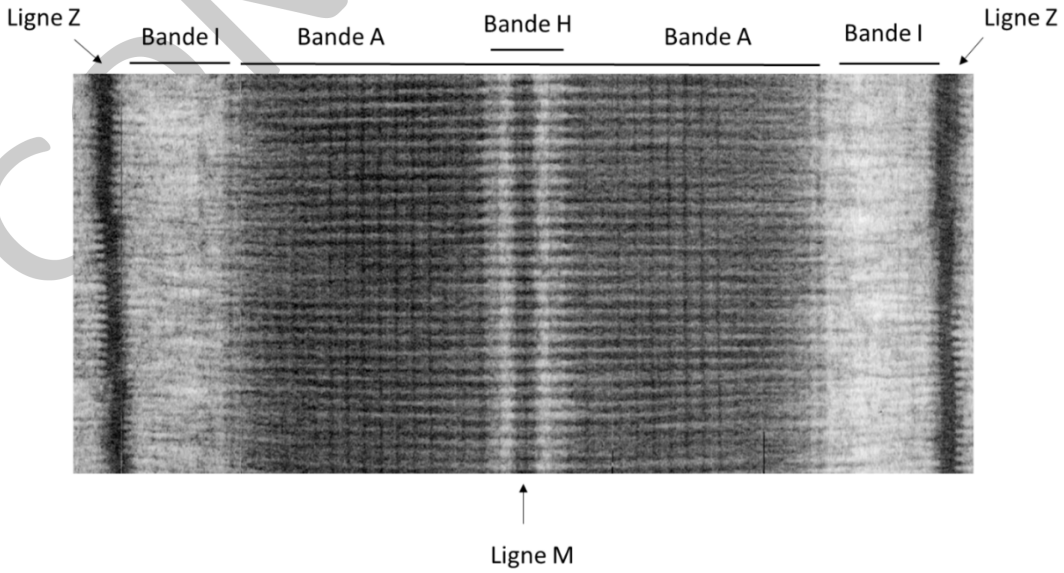


Figure 8: Le sarcomère en microscopie électronique

CONFIDENTIEL

ii. Les protéines du sarcomère

Les filaments élastiques sont composés d'une grande protéine la titine. Elle traverse le sarcomère de la ligne Z à la bande M. Elle possède de nombreux sites de liaison avec des protéines du cytosquelette. C'est une protéine élastique qui joue un rôle majeur au niveau du sarcomère pour son assemblage et le maintien de sa structure.

Les filaments épais sont constitués de la myosine, qui se retrouve à travers la bande A et se superposent dans le bande M. La myosine est liée à la la titine via les protéines myomésine et protéines M. Chaque molécule de myosine est formée de deux chaines lourdes et de deux chaines légères. Les deux chaines lourdes sont collées l'une à l'autre. Leurs queues forment un axe torsadé et leur pôle globulaire émerge du filament épais sous forme d'une tête double. La partie distale des têtes de myosine possède deux sites de fixation, l'un pour l'ATP et l'autre pour l'actine. La tête de myosine possède une activité ATPase activée au contact de l'actine.

Les filaments fins sont faits de monomères d'actines, ils composent les bandes I et s'étendent jusqu'aux bandes A. Les filaments d'actine sont constitués des deux chaines d'actine F enroulées en double hélice sur lesquelles sont attachées une protéine globulaire (actine G) et deux autres protéines : la tropomyosine et la troponine. La tropomyosine s'étend dans la gouttière de l'hélice d'actine. Elle bloque les sites de liaison de l'actine et myosine. La troponine se fixe sur la tropomyosine environ toutes les 8 molécules d'actine. Elle est responsable de la régulation cytoplasmique de la contraction musculaire. Elle est constituée de 3 sous-unités : la troponin T (cTnT), la troponin I (cTnI) et la troponine C (cTnC). La cTnT est la sous unité qui sert d'ancre à la troponine sur la tropomyosin. La cTnI inhibe l'activité ATP de la tête de myosine. La cTnC lie le calcium. Lorsque la cTnC est saturée en calcium, l'effet inhibiteur de la cTnI est supprimé.

La ligne Z est constituée de l'alpha actinine, elle relie les filaments d'actine à la titine.

CONFIDENTIEL

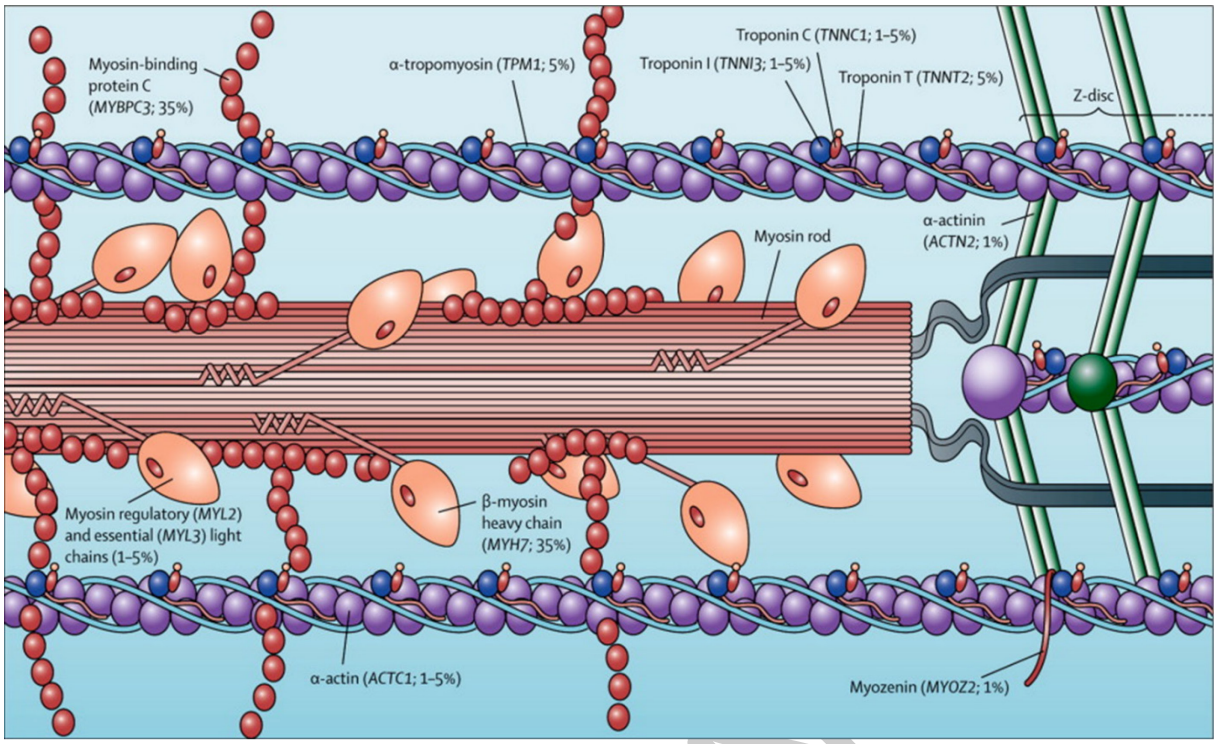


Figure 9: Les protéinés du sarcomère

iii. Les mutations des protéines du sarcomère

Depuis la découverte de l'implication de la mutation du gène β-MHC dans la CMH en 1990 (Geisterferlowrance et al. 1990) plus de 400 mutations ont été trouvé dans les gènes codants pour les protéines de sarcomère et causant la CMH, mais aussi la CMD et la CMR. Aucune mutation dans des gènes codants pour les protéines du sarcomère ne semble être responsable de DVDA. Malgré un grand nombre d'études qui ont été réalisées pour élucider la structure et la fonction des protéines sarcomériques normales, il est encore difficile de prévoir les conséquences fonctionnelles exactes des mutations trouvées dans cardiomyopathies ; il est seulement possible d'en apprécier leur nature et position. Les découvertes de mutations causant les cardiomyopathies dans les protéines sarcomériques ont conduit à des études « *in vitro* » approfondies sur leurs conséquences fonctionnelles En outre, « in vivo » les modèles animaux transgéniques ou knock-in ont largement été utilisés pour explorer la fonction physiologique des mutations dans les gènes codant pour les protéines sarcomèriques et leurs implications dans la pathogenèse des cardiomyopathies. Ces études ont amélioré les connaissances des fonctions physiologiques des protéines sarcomériques dans des cardiomyopathies.

CONFIDENTIEL

c. Mutations dans des gènes des filaments épais

- Myosine

Il existe deux isoformes de myosine dans le muscle cardiaque : α-MHC et β-MHC. α-MHC est abondante dans les cellules atriales et ventriculaires pendant l'embryogenèse. Elle reste prédominante dans ces deux types de cellules à l'âge adulte chez les petits mammifères comme la souris et le rat. Par contre chez l'homme adulte β-MHC est surtout exprimée dans les ventricules et α-MHC dans les cellules atriales. B-MHC est aussi connue pour être exprimée dans le muscle squelettique.

- B-MHC/MYH7

Les mutations du gène codant pour la β-MHC est la cause la plus fréquente de CMH. Plus de 167 mutations ont été identifiées dans le gène codant pour la β-MHC. Les mutations R403Q et R453C sont associées avec le phénotype le plus sévère. (Epstein et al. 1992; Watkins et al. 1992). Plusieurs études fonctionnelles ont été menées pour identifier les effets de ces mutations. Une étude du cycle calcique dans des fibres musculaires a démontré que les myofilament du mutant sont plus sensibles au calcium et que cette particularité mène à une dysfonction diastolique(Gao et al. 1999). Chez les souris homozygotes pour la mutation R403Q la myosine cardiaque a été étudiée et il a été montré que cette mutation renforce la force générée, l'activité ATPasique et la vélocité des filaments d'actine. Par contre la mutation R453C ne renforce que la capacité de la force générée (Tyska et al. 2000). Les mutations impliquées dans les CMH augmentent la puissance du flux de sortie des cœurs au-delà de la tolérance au stress mécanique d'un sarcomère cardiaque normal, ce qui pourrait être un stimulus primaire pour la réponse hypertrophique. La création d'une lignée de lapin transgénique pour la mutation R403Q a permis de reproduire un phénotype identique aux patients CMH (mort subite, hypertrophie cardiaque, désarroi des myocytes et fibrose interstitielle). Ce lapin transgénique peut être utilisé comme modèle de la maladie pour des fins thérapeutique et études de la pathogenèse.

Dans les CMD, 11 mutations non-sens ont été rapportées comme causales. Les deux mutations retrouvées chez les familles avec un phénotype précoce sont S532L et F746L (Kamisago et al. 2000). Des souris transgéniques ont été créées pour ces deux mutations en état hétérozygote comme homozygote. Les souris homozygotes ont montré une dysfonction systolique. Cette étude montre que la mutation S532P réduit la force générée et la vélocité d'actine tandis que la mutation F746L réduit l'activité d'ATPase activé par l'actine. Les cardiomyocytes isolés des souris hétérozygotes montrent des facultés de contraction réduites (Debold et al. 2007; Schmitt et al. 2006). Ces résultats ont permis d'émettre l'hypothèse que les activités enzymatiques et mécaniques de la myosine cardiaque peuvent déclencher la cascade d'événements qui mènent à la CMD.

CONFIDENTIEL

- MYL3

Les mutations du MYL3 sont une cause rare de CMH, il y a 4 mutations non-sens répertoriées. La mutation M149V a été trouvée dans une grande famille (Poetter et al. 1996). La basse mortalité de cette famille suggère que la présence de cette mutation prédit un bon pronostic. Les études sur les animaux transgéniques (souris, lapin) suggèrent que cette mutation est non-causale pour la CMH (Sanbe et al. 2000; Jeanne James et al. 2002).

- MYL2

Huit mutations non-sens et deux mutations du site d'épissage ont été identifiées dans le gène MYL2 chez les patients avec un pronostic sévère (Richard et al. 2003).

- MYBPC3

Les mutations du gène MYBPC3 sont la cause génétique la plus fréquente de CMH. 134 mutations différentes ont été identifiées, dans les exons comme introns de ce gène. Les mutations non-sens ne représentent qu'une moitié des mutations répertoriées, l'autre moitié rassemble des insertions, délétions et des mutations du site d'épissage, ce qui donne une protéine tronquée. Les mutations de MYBPC3 comparées à des mutations de MYH7 et cTNT sont associées avec moins d'hypertrophie, moins de pénétrance et un meilleur pronostic (Niimura et al. 2002).

Des souris transgéniques exprimant un mutant dépourvu de sa moitié C-terminale, qui mime la forme tronquée de la protéine chez les patients CMH, ne présentaient pas d'hypertrophie cardiaque significative et aucune augmentation significative de la morbidité ou mortalité (Q. Yang et al. 1998). La protéine tronquée n'a pas été correctement incorporée dans la bande A de sarcomère, suggérant qu'une haplo-insuffisance pourrait jouer un rôle dans le processus pathogène. Les souris homozygotes KO étaient également viables et présentaient des sarcomères bien développés, mais souffraient d'une hypertrophie cardiaque significative avec la fonction diastolique réduite. Ces données démontrent que MYBPC3 n'est pas essentiel pour la formation et le maintien de l'ultrastructure du sarcomère, mais son absence conduit à l'hypertrophie cardiaque et à l'insuffisance cardiaque.(Harris et al. 2002).

d. Mutation dans des gènes des filaments fins :

- Le complexe de Troponine : Cardiac Troponin T

Vingt-sept mutations de cTnT ont été observées pouvant causer une CMH. Les patients avec des mutations de cTnT ont une hypertrophie modérée ou non significative avec un pronostic alteré à cause du risque de mort subite. Les mutations non-sens I79N et R92Q, ainsi que la délétion ΔE160 ont été identifiées comme pouvant causer un phénotype clinique sévère avec une espérance de vie de moins de 35 ans. Beaucoup d'études ont été focalisées sur l'aspect fonctionnel des mutations de cTnT et leurs conséquences dans la pathogenèse de la cardiomyopathie. L'utilisation des transfection ou infection

CONFIDENTIEL

de cDNA codant pour des mutant de cTnT ont montré que les mutations I72N, R92q et ΔE160 influent sur la contractilité du muscle sans toujours perturber la structure du sarcomère (Marian et al. 1999; Rust, Albayya, and Metzger 1999). Cette perturbation de la structure du sarcomère a été observée dans 10% des myotubes observés (Sweeney et al. 1998). Les mutations I79N, R92Q, R92W et R92L augmentent la sensibilité au calcium sans porter atteinte à la capacité de génération de force maximale et l'activité ATPase (Szczesna et al. 2000; Harada and Potter 2004). La création d'une souris transgénique pour la mutation I79N a permis de confirmer cette hypothèse. Les fibres prévenant des muscles de ces souris présentent une augmentation de la sensibilité du calcium (T. Miller et al. 2001). Les cœurs isolés des souris transgéniques portant la mutation R92Q montre une hypercontractilité et une dysfonction diastolique. Les cardiomyocytes isolés de ces cœurs ont une activation sarcomérique augmentée, une relaxation affaiblie et une longueur du sarcomère plus petite (Tardiff et al. 1999). Ces études suggèrent que l'augmentation de la sensibilité au calcium joue un rôle majeur dans la pathogenèse des CMH associé aux mutations de la troponin T.

Dans les CMD, la première mutation rapportée a été la délétion ΔK210 (Kamisago et al. 2000). Par la suite la mutation non-sens R141W a été détectée dans une grande famille (Lu et al. 2003). En 2003, Mirza et al ont rapporté trois nouvelles mutations non-sens : R131W, R205L et D270N. Toutes ces mutations ont un effet de diminution de sensibilité au calcium. Les souris transgéniques pour ces mutations ont développé des cœurs élargis et une insuffisance cardiaque. Elles étaient aussi sujettes à la mort subite (Du et al. 2007).

- Le complexe de Troponine : Cardiac Troponin I

26 mutations ont été rapportées comme causale de la CMH. La plupart de ces mutations ont un effet sur la sensibilité au calcium, agissant ainsi sur la contraction du muscle cardiaque. Les souris présentant la mutation R145G montrent des signes de CMH avec une désorganisation de myocytes et une fibrose interstitielle sans hypertrophie significative. Les cœurs isolés de ces animaux présentent une fonction systolique renforcée et une dysfonction diastolique. Les fibres cardiaques isolées sont plus sensibles au calcium (J James et al. 2000).

Une seule mutation de la troponin I cardiaque a été identifiée, et la forme mutée est impliquée dans la CMD, elle cause une rare forme héréditaire de CMD. C'est la mutation N-terminale A2V. C'est une mutation autosomale récessive. Cette mutation joue sur l'interaction entre la cTnI et la cTnT (Murphy et al. 2004).

Dans la CMR, 6 mutations de cTnI ont été identifiées chez des patients avec une forme idiopathique de CMR (Murphy et al. 2004). Une des mutations identifiées est la D190G. Cette mutation est présente aussi chez les patients CMH, ce qui peut suggérer un mécanisme moléculaire commun. L'étude

CONFIDENTIEL

fonctionnelle montre une augmentation de la sensibilité au calcium qui est supérieure à des effets observés dans les CMH (Yumoto et al. 2005).

- Le complexe de Troponine : Cardiac Troponine C

La mutation L29Q dans le gène codant pour la cTnC a été rapportée chez un patient CMH avec une forme terminale de la maladie (Hoffman et al. 2001). La partie N-terminale du gène qui contient le résidu L29 interagit avec la Ser22/23 N-terminal de la cTnI. Cette interaction est supprimée lors de la phosphorylation de la Ser22/23 par une protéine kinase A (PKA) conduisant à une diminution de sensibilité au calcium. Cette mutation supprime l'interaction entre ces deux protéines, ce qui conduit à un changement de la sensibilité au calcium du myofilament pendant la phosphorylation (Finley et al. 1999; Schmidtmann et al. 2005).

Dans les CMD, une seule mutation de cTnC a été identifiée (Mogensen et al. 2004). Cette mutation diminue la sensibilité de calcium dans l'ATPase d'actomyosin et dans des essais *in vitro* de motilité (Mirza et al. 2005). Cette mutation n'a aucun effet sur la sensibilité au calcium et la génération de force quand les fibres cardiaques ont été isolées du mutant (Preston, Ashley, and Redwood 2007). Il a été démontré que cette mutation bloque la désensibilisation du calcium par la force de générée induite par la phosphorylation de Thr203 par PKC ou la ser22/23 par PKA (Preston, Ashley, and Redwood 2007; Biesiadecki et al. 2007)

- Tropomyosine

Le muscle strié exprime deux isoformes de tropomyosine : l'α-tropomyosine et la β-tropomyosine. Le muscle cardiaque exprime surtout l'α-tropomyosine.

Au total 11 mutations de l'α-tropomyosine ont été identifiées comme cause de CMH bien que l'incidence soit faible (environ 5% des CMH). La sensibilisation au calcium a été observée sur la contraction du muscle comme pour cTnT et cTnI (Heller et al. 2003). La mutation D175N a été retrouvée dans 3 familles avec un pronostic favorable mais également dans une famille avec des épisodes de mort subite (Coviello et al. 1997).

Deux mutations non-sens ont été identifiées chez les patients CMD avec un phénotype sévère. Ces mutations sont E40K et E54K dans le gène de l'α-tropomyosine. Dans ces mutations, un acide aminé acide est remplacé par un acide aminé basique. Ces deux mutations diminuent la sensibilité du calcium (Mirza et al. 2005; Chang et al. 2005).

- Actine

Dans les cellules de mammifères on observe six isoformes d'actine. Dans le myocarde on ne retrouve que des actines sarcomériques : l'α-cardiac actine et l'α-skeletal actine (Carrier et al. 1992).

La mutation de l'α-cardiac actine est une cause rare de CMH (1,5%), néanmoins 7 mutations ont été identifiées. Ces mutations diminuent la stabilité thermodynamique du monomère d'actine et affaiblit

CONFIDENTIEL

la formation du filament. L'accumulation des agrégats peut être un des effets pathogènes au niveau cellulaire (Vang et al. 2005). La mutation E99K diminue la vélocité et la force moyenne dans des tests in vitro de motilité en diminuant l'affinité de l'actine pour la myosine (Bookwalter and Trybus 2006). Ces études suggèrent que la diminution des interactions actine-myosine peut être un premier défaut au niveau moléculaire conduisant aux CMH.

Dans les CMD, deux mutations de l'α-cardiac actine ont été rapportées. Ce sont des mutations non-sens : R312H et E361G (Olson et al. 1998). Ces deux mutations sont responsables d'altération de la formation de filaments (Vang et al. 2005).

Canalopathies

Définition

Les canalopathies sont des syndromes héréditaires causés par des mutations dans les gènes codants pour des canaux ioniques, des sous-unités constitutives de canaux ioniques, ou des protéines associées à ces canaux ioniques membranaires. Les canaux ioniques sont des protéines ancrées dans la membrane cellulaire. Ceux-ci contrôlent de façon sélective le passage des ions à travers les membranes. En maitrisant les flux ioniques, les canaux ioniques contrôlent l'activité électrique cellulaire et sont impliqués dans chaque battement du cœur et chaque contraction musculaire. Le fonctionnement de ces canaux entraine des mouvements de charges électriques à travers la membrane cellulaire et modifie sa polarité. Le courant dit « entrant » est une dépolarisation par une entrée d'un ion positif. Le courant dit « sortant » c'est la repolarisation ou l'hyperpolarisation par une sortie d'ion positif ou une entrée d'un ion négatif.

Plusieurs maladies cardiaques sont associées à des mutations affectant les canaux Na+, K+ et Ca2+. Les canalopathies sont identifiées grâce à des anomalies présentes sur l'ECG. Elles se manifestent principalement par des troubles de la rythmicité cardiaque et beaucoup plus rarement de la contraction musculaire.

CONFIDENTIEL

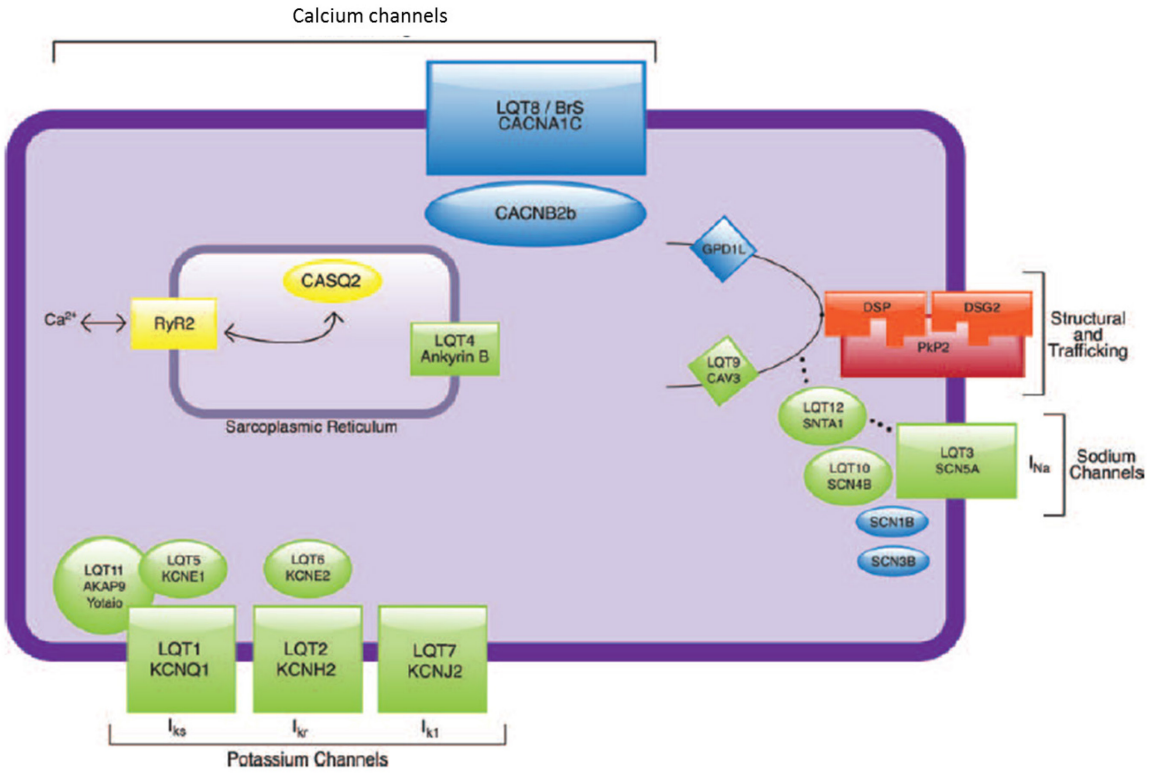


Figure 10 Représentation schématique des gènes majeurs de canalopathies (Webster and Berul 2013)

CONFIDE

Syndrome de QT long

Le syndrome de QT long (SQTL) se caractérise par un intervalle QT anormalement long sur l'ECG. Le cœur est anatomiquement normal et le dysfonctionnement est purement électrique. C'est une anomalie du rythme cardiaque associé à des modifications de la morphologie de l'onde T. Le SQTL est considéré lorsque l'intervalle QT corrigé (QTc) est supérieur à 440ms. Pour calculer le QTc on utilise généralement une formule d'ajustement comme la formule de Bazett : QTc=intervalle QT/$\sqrt{intervalleRR}$. L'intervalle RR est exprimé en secondes.

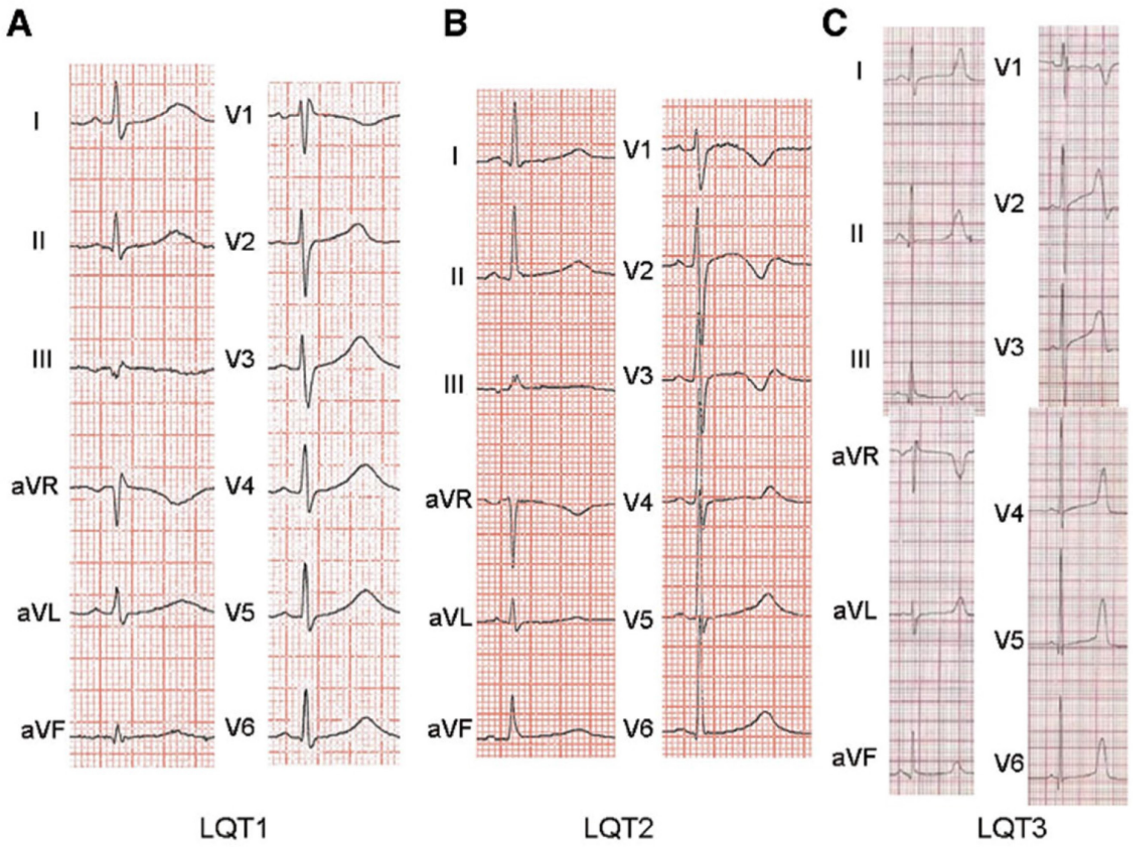


Figure 11 ECG de SQTL (Mizusawa, Horie, and Wilde 2014)

Ce syndrome crée des troubles graves du rythme ventriculaire et est associé à des risques de pertes de connaissance et des arrêts cardiaques. Le SQTL peut également provoquer des activités électriques aberrantes comme des post dépolarisations précoces ou retardées. Ceci peut engendrer des torsades de pointes, des syncopes ou une mort subite. La fréquence de ce syndrome est estimée entre 1/3000 et 1/5000 dans la population générale. (Wojciech Zareba and Cygankiewicz 2008). Il est un peu plus fréquent chez la femme. Les troubles du rythme surviennent principalement chez les enfants et les jeunes adultes, il est rare que la première manifestation se fasse après 40 ans.

C'est une maladie congénitale avec deux formes de transmission : dominante (95% des cas) et récessive, qui est plus rare. Ce syndrome peut être isolé ou associé avec d'autres malformations comme le syndrome de Romano-Ward , ou le syndrome de Jervel-Lange-Nielsen qui est associé à une surdité congénitale .

Le SQTL est une anomalie de fonctionnement des canaux ioniques cardiaques due à des mutations dans les gènes codant pour ces canaux. 15 gènes ont été identifiés comme cause de SQTL (Mizusawa, Horie, and Wilde 2014) donnant 15 formes de SQTL. Cependant 3 gènes représentent 75% de cas avec un phénotype sévère : KCNQ1 (KvlQT1 ou LQT1), KCNH2 (HERG ou LQT2) qui codent pour des canaux potassiques et SCN5A (LQT3) qui code pour un canal sodique cardiaque. Les mutations de KCNQ1

représentent 30 à 35% des SQTL, les mutations de KCNH2 représentent 25-40% des SQTL et les mutations de SCN5A 5 à 10% (Webster and Berul 2013).

LQTS type	Gene	Protein	Current	Frequency (%)
Romano-Ward				
LQT1	*KCNQ1*	Kv7.1	↓ I_{Ks}	40–55
LQT2	*KCNH2*	Kv11.1	↓ I_{Kr}	30–45
LQT3	*SCN5A*	Nav1.5	↑ I_{Na}	5–10
LQT4	*ANKB*	Ankyrin	↓ Coordination of Ncx, Na/K ATPase	Rare
LQT5	*KCNE1*	MinK	↓ I_{Ks}	Rare
LQT6	*KCNE2*	MiRP1	↓ I_{Kr}	Rare
LQT7	*KCNJ2*	Kir2.1	↓ I_{K1}	Rare
LQT8	*CACNA1C*	Cav1.2	↑ I_{Ca}	Rare
LQT9	*CAV3*	Caveolin 3	↑ I_{Na}	Rare
LQT10	*SCN4B*	Sodium channel β4-subunit	↑ I_{Na}	Very rare
LQT11	*AKAP9*	Yotiao	↓ I_{Ks}	Very rare
LQT12	*SNTA1*	Syntrophin-α1	↑ I_{Na}	Very rare
LQT13	*KCNJ5*	Kir3.4	↓ $I_{K\text{-}Ach}$	Very rare
LQT14	*CALM1*	Calmodulin 1	Dysfunctional Ca^{2+} signaling	Rare
LQT15	*CALM2*	Calmodulin 2		Rare
Jervell and Lange-Nielsen				
JLN1	*KCNQ1*	Kv7.1	↓ I_{Ks}	Rare
JLN2	*KCNE1*	MinK	↓ I_{Ks}	Rare

Figure 12 Les gènes associés au SQTL (Mizusawa, Horie, and Wilde 2014)

Chez les patients diagnostiqués SQTL, il est important de prévenir les risques d'arythmie principalement pas l'utilisation d'agents β-bloquants (A. J. Moss et al. 2000). Dans les cas de récidive de syncope, l'implantation d'un défibrillateur automatique est proposée (W Zareba et al. 2003). La compétition sportive et le stress auditif est à éviter. Ces personnes sont plus sensibles à une brusque accélération du rythme cardiaque.

Il faut noter que le syndrome du QT long peut être induit, notamment suite à une stimulation pharmacologique. Certains médicaments peuvent en effet modifier la repolarisation cardiaque, généralement en modifiant l'activité de canaux potassiques. Ces médicaments peuvent être à visée cardiaque, notamment anti-arythmique, mais il s'agit souvent de médicaments non cardiovasculaires comme des antibiotiques, des antiallergiques de type antihistaminiques ou encore des antiémétiques . Les patients présentant un syndrome du QT long congénital ne doivent pas recevoir de traitement pouvant allonger le QT. Cependant, dans la population générale, une proportion non négligeable de patients (estimée à 5-10%) sans anomalie électrocardiographique ou historique d'événement rythmique cardiaque, développent un syndrome du QT long acquis, en réponse à une stimulation pharmacologique par un médicament allongeant le segment QT. Il a été proposé que cette stimulation

CONFID

pharmacologique permette de dépister une forme frustre de QT long congénital. Cependant, la prévalence beaucoup plus élevée du QT long acquis et des études de dépistage génétiques montre que de nombreux patients présentant un QT long acquis n'ont pas de mutations associées au QT long congénital. Il est possible qu'il existe un terrain génétique favorable chez ces patients, mais la nature exacte de ce terrain génétique prédisposant n'est pas bien établie.

Syndrome de QT court

Le syndrome de QT court (SQTC) se caractérise par un raccourcissement de l'intervalle QT. Le QTc est inférieur à 320 ms sur l'ECG. Il peut être accompagné ou non par des symptômes cliniques secondaires à des arythmies atriales ou ventriculaires. Il est associé à un risque élevé de syncope et de mort subite. Ce syndrome a été décrit pour la première fois en 2000 (Gussak et al. 2000). C'est un syndrome assez rare. A ce jour il n'y a que 50 cas diagnostiqués dont quelques familles et quelques cas sporadiques. Cinq gènes sont associés avec le SQTC et en conséquence on reconnait 5 formes de SQTC. Dans les gènes responsables pour le SQTC on retrouve 3 gènes codant pour le canal potassique : KCNH2, KCNQ1 et KCNJ2 et des gènes codants pour les sous-unités d'un canal calcique : CACNB2b et CACNA1C (Wojciech Zareba and Cygankiewicz 2008). Les traitements pharmacologiques pour allonger l'intervalle QT sont limités. Dans les cas à haut risques l'implantation d'un défibrillateur automatique est pratiquée.

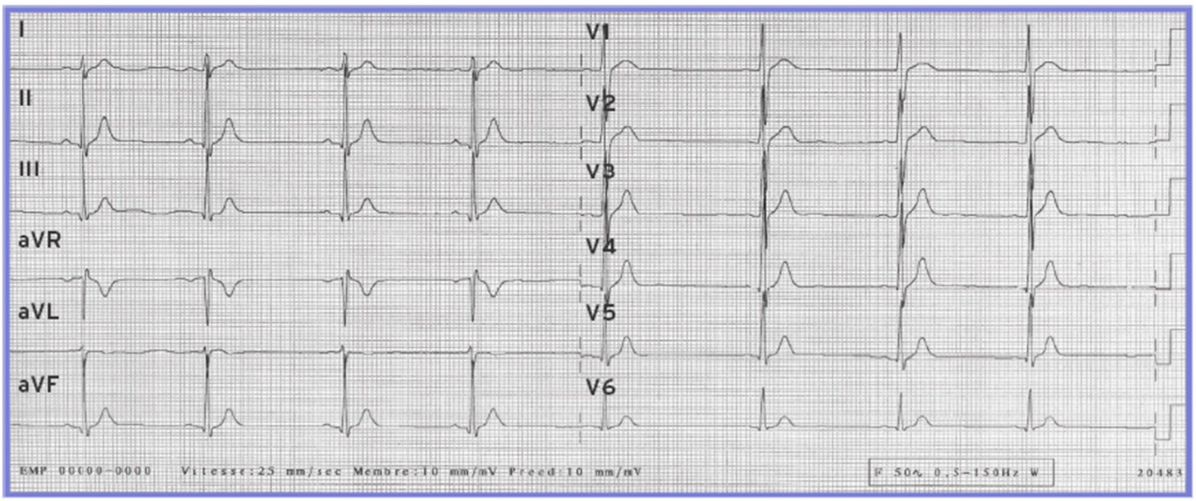


Figure 13 ECG d'un patient avec l'intervalle QTc de 310ms (Lupoglazoff and Denjoy 2007)

Tachycardies Ventriculaires Catécholergiques

Les Tachycardies Ventriculaires Catécholergiques (TVC) sont caractérisées par des arythmies ventriculaires polymorphes de déclenchement adrénergique. Le premier cas a été décrit en 1975, mais la première description d'une série de 21 patients a été réalisée en 1995 (Leenhardt et al, 1995). Cette anomalie survient essentiellement chez les enfants et des adolescents. L'ECG au repos et en dehors des épisodes de tachycardie ventriculaire est tout à fait normal. La mortalité des TVC est assez élevée, elle peut atteindre 30 à 50% à l'âge de 30 ans si aucun traitement n'est administré. Les épisodes de tachycardie ventriculaire surviennent dans des circonstances bien particulières, telles que les efforts violents survenant dans un contexte émotionnel, et sont responsables de syncopes et de mort subite. La découverte d'un locus associé à la maladie sur le chromosome 1 (1q42) a mis en évidence les bases génétiques de cette anomalie (Sawn et al, 1999). Les mutations dans 3 gènes sont retrouvées chez 50% des patients porteurs de TVC. Les gènes impliqués dans la TVC sont RyR2 et CASQ2.

RyR2 code pour le récepteur à la ryanodine. Il est impliqué dans le relargage du calcium à partir du réticulum sarcoplasmique, il contrôle l'homéostasie calcique intracellulaire et la contraction du muscle cardiaque. Des mutations de RyR2 sont responsables d'environ 40% des cas de TVC. C'est une mutation à transmission autosomique dominante.

Les mutations de la calséquestrine (CASQ2) sont plus rares. C'est une mutation récessive. Seulement 12 variants ont été identifiés. La fonction de CASQ2 n'est pas très claire mais elle joue un rôle dans le tamponnage du calcium et la réduction de la surcharge du calcium cytoplasmique.

Le traitement de première intention de TVC est le traitement par bétabloquant en prévention de syncope et de mort subite.

Syndrome de Brugada

Décrit pour la première fois par les frères Brugada en 1992, (Brugada 1992) ce syndrome se caractérise par un aspect normal d'ECG et un risque de mort subite par un trouble du rythme cardiaque appelé fibrillation ventriculaire. Les anomalies d'ECG sont caractérisées par un sous-décalage du segment ST dans les dérivations (V1, V2) avec un aspect en dôme, suivi d'ondes T négatives.

Avec une incidence de 0,05-0,06% chez l'adulte, ce syndrome est relativement rare (Sheikh et al, 2014). Ce syndrome peut être asymptomatique. Il est plus fréquent chez les hommes que chez les femmes (Matsuo en al, 2001). Le syndrome de Brugada est responsable de 4 à 12% des morts subites survenues en France. Les premières mutations causales ont été retrouvées dans le gène codant pour le canal sodique SCN5A (Chen et al. 1998). A ce jour il y a presque 300 mutations décrites dans ce canal (Kapplinger et al. 2011). Les mutations de ce gène ont été retrouvées dans 18-30% de familles

CONFIDENTIEL

(Antzelevitch 2007; Priori et al. 1999). Les mutations d'autres gènes peuvent également être responsables de Syndrome de Brugada correspondant à 8 types de ce syndrome (BS1-BS8). Les mutations causales ont été également trouvées dans des gènes codant pour des canaux calciques (CACNA1C, CACNB2b, CACNA2D1). Ces mutations provoquent la perte du courant basal calcique du type L ($I_{Ca, L}$). Ces mutations contribuent pour 11.5% au nombre de personnes atteintes de Syndrome Brugada.

Les mutations dans les gènes des sous-unités de β des canaux sodique (SCNB, SCN3B), le gène de l'enzyme Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase 1-Like (GPD1L) et du gène MOG1 qui affecte le trafic des canaux sodiques, conduisent à la perte du courant I_{Na}.

Les mutations dans les gènes qui affectent le courant sortant transitoire (KCNE3, KCND3, KCNE5) ont été retrouvés dans une seule famille (Ohno et al. 2011). Ces mutations conduisent à un gain de fonction du courant I_{to}.

A l'heure actuelle le seul traitement pour ce syndrome est l'implantation de défibrillateur automatique .

CONFIDENTIEL

Chapitre 2 : CELLULES SOUCHES PLURIPOTENTES INDUITES (IPSC)

Pluripotence

Cellules souches

Une cellule souche est une cellule indifférenciée qui a la capacité de s'autorenouveller et de quitter son état souche pour se différencier dans une cellule donnée. Ces cellules sont présentes dans tous les organismes vivants multicellulaires. Les cellules souches sont classées en fonction de leur potentiel de différentiation :

- Cellules souches totipotentes : cellules capable de former tous les types cellulaires d'un embryon ou d'un organisme adulte,
- Cellules souches pluripotentes : cellules capable de donner tous les types cellulaires sauf les annexes embryonnaires,
- Cellules souches multipotentes : cellules capable de donner différents types de cellules mais spécifiques d'un lignage cellulaire donné,
- Cellules souches unipotentes : cellules capable de ne donner qu'un type cellulaire.

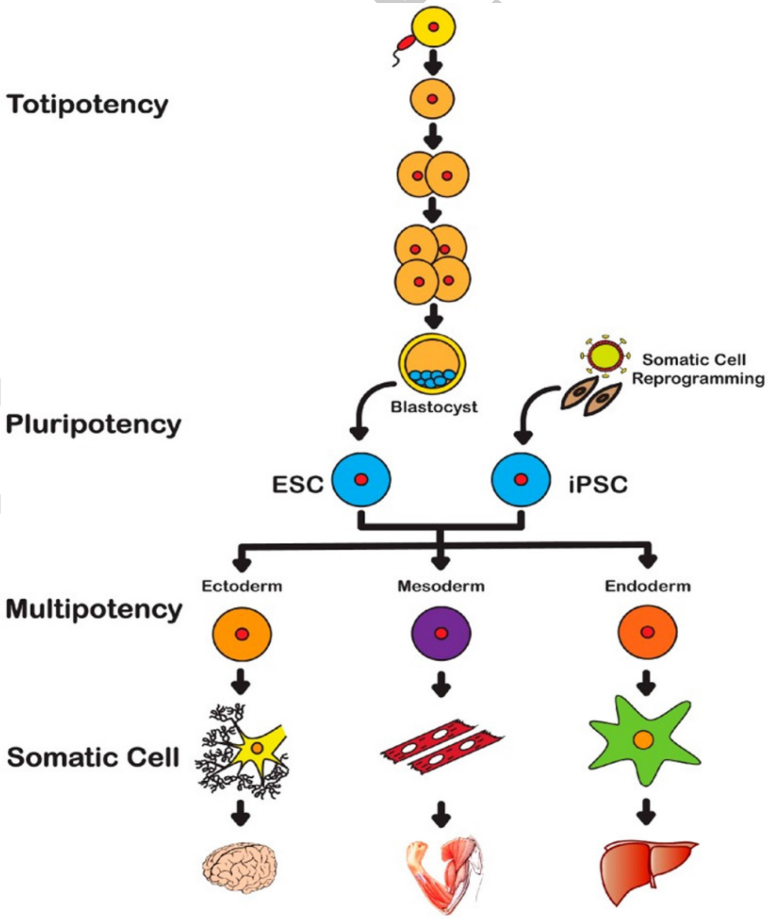


Figure 14: Schéma cellules souches (Menon et al. 2016)

CC ENTIEL

Les cellules souches pluripotentes peuvent donc être redifférenciées in vitro en n'importe quel type de cellules retrouvées dans un organisme vivant.

La reprogrammation cellulaire

La compréhension de la reprogrammation cellulaire s'est déroulée en trois temps :

i. Transfert nucléaire de cellules somatique (SCNT)

Les scientifiques ont longtemps pensé que le développement des organismes pluricellulaires est un processus unidirectionnel et irréversible. Cette théorie a été remise en cause pour la première fois par la démonstration de transfert nucléaire d'une cellule somatique par Briggs et King dans les années 1950 (Briggs and King 1952). En isolant le noyau d'embryons à un stade avancé et l'implantant ensuite dans les oocytes de grenouille dont le noyau a été préalablement retiré, Briggs et King inventaient le clonage. Ces travaux ont été confirmés par Gurdon (Gurdon 1962) qui a obtenu des têtards à partir d'oocytes non fécondés dont les noyaux ont été remplacés par ceux de cellules intestinales de grenouille. Il a démontré que les cellules différentiées retiennent l'information génétique nécessaire au développement d'un nouvel organisme. Trois décennies plus tard le premier animal cloné est né. La brebis Dolly a été générée par clonage de cellules épithéliales mammaires (Wilmut et al. 1997). Cette étude et des suivantes ont aussi montré que le génome des cellules, même complètement différenciées, reste génétiquement capable de pluripotence et peut ainsi permettre le développement d'un organisme entier (Hochedlinger and Jaenisch 2002; Inoue et al. 2005). Cependant, la plupart des animaux clonés montrent des anomalies phénotypiques et d'expression génétique qui peut suggérer une reprogrammation épigénétique défectueuse. Cela a également été observé chez la souris par Wakayama en 1999. En effet des souris clonées à partir de bouts de queues, n'ont donné que peu de fœtus viables, tous étant mâles aux yeux marron. La plupart des fœtus n'étaient pas viables et présentaient une taille très supérieure à un fœtus « normal » (T. Wakayama et al. 1999; Humpherys 2001).

ii. Lignées cellulaire pluripotentes

La technique de transfert nucléaire est techniquement difficile et n'est pas adaptée à des études génétiques et biochimiques. Afin de faciliter les études, des cellules pluripotentes natives ont été recherchées dans des organismes entiers. Les premières cellules pluripotentes découvertes ont été des cellules immortalisées extraites de tumeurs teratocarcinomes et sont appelées ECCs (embryonal carcinoma cells), ces cellules pouvaient être gardées en culture tout en conservant leur caractère pluripotent (Kahan and Ephrussi 1970)(. La fusion des ECCs avec des cellules somatiques comme des

CONFIDENTIEL

cellules de thymus a permis d'obtenir des cellules hybrides. Ces cellules pouvaient acquérir les propriétés biochimiques et développementales d'ECCs et dans le même temps perdre les fonctions des cellules somatiques (R. A. Miller and Ruddle 1976). La dominance du stade pluripotent par rapport au stade somatique a permis de suggérer l'existence de facteurs dans les ECCs qui permettent de garder le stade pluripotent. Malheureusement ces cellules n'étaient capables de se différencier que dans peu de tissus somatiques adultes et très rarement dans des cellules de la lignée germinale. Les ECCs peuvent être aussi dérivées de tératocarcinomes expérimentalement induits par la transplantation d'embryons de souris. Cette découverte a été un élément crucial pour les scientifiques pour essayer d'isoler des cellules pluripotentes directement à partir de l'embryon. En 1981 Evans et Kaufman ont isolé les premières cellules souches embryonnaires (CSE ou ESCs) de la masse interne cellulaire de blastocystes de souris.(Evans and Kaufman 1981). En 1998, Thompson a isolé les premiers CSE humains. (Thomson et al. 1998). Les CSE contrairement aux ECCs ont un caryotype normal et peuvent se différencier dans tous les tissus somatiques adultes et également dans la lignée germinale. Les CSE sont capables de pouvoir donner naissance à un animal entier dérivé de CSE après l'injection dans des blastocystes tétraploïdes. Ces blastocystes peuvent alors être différenciés dans tous les tissus adultes mais ne peuvent pas donner de vrais embryons (Nagy et al. 1990; Eggan et al. 2001). Les CSSE peuvent être aussi dérivés des blastocystes obtenus par le transfert nucléaire (NT-ESC) (Munsie et al. 2000). Contrairement aux animaux dérivés directement par le SCNT, les NT-ESC sont identiques tant du point de vue transcriptomique que fonctionnel aux CSE (S. Wakayama et al. 2006). Il existe d'autres lignées pluripotentes dérivées des tissus embryonnaires et d'explants d'adultes et mis en en culture :

- les EpiSCs (les ESCs derivés d'epiblastes). Les EpiSCs ont été isolés d'embryons post-implantés (Brons et al. 2007),
- les EGCs (cellules souches germinales), cellules dérivées de cellules germinales primordiales (PGCs) obtenues pendant la gestation de l'embryon (Resnick et al. 1992),
- les mGSCs, cellules souches germinales multipotentes dérivées de cellules néonatales de testicules de souris (Ko et al. 2009).

Tous ces types cellulaires ont comme origine les stades précoces de l'embryon ou des cellules germinales qui semblent être les seules cellules qui possèdent la conformation épigénétique nécessaire pour une conversion spontanée en état pluripotent. Un point commun de ces types cellulaires est l'expression d'un facteur de transcription appelé Oct4, qui a servi comme un marqueur prédictif de la pluripotence de la cellule. De manière importante, tous ces types cellulaires induisent la pluripotence dans des cellules somatiques après une fusion avec ces cellules. Ceci confirme qu'elles hébergent des activités de reprogrammation dominantes pour la pluripotence (Tada et al. 2001).

CONFIDENTIEL

iii. Facteurs de transcriptions

La troisième grande découverte pour comprendre la reprogrammation cellulaire a été la découverte de facteurs de transcription qui participent à l'établissement et au maintien des identités cellulaires au cours du développement par la conduite de l'expression de gènes spécifiques à un type de cellule tout en supprimant les gènes de lignage. La première démonstration de cette idée a été faite en 1987 par Davis qui a transformé des fibroblastes en myofibroblastes par une transduction via rétrovirus portant le gène MyoD exprimé dans les cellules du muscle squelettique (Davis, Weintraub, and Lassar 1987). En 2004, Xie et ses collègues ont découvert que les lymphocytes B et T peuvent être convertis en macrophages par la surexpression d'un facteur de transcription C/EBPα (Xie et al. 2004). En 2006, pour identifier les facteurs de transcription qui pouvaient reprogrammer les cellules adultes en cellules pluripotentes, Yamanaka et Takahashi ont sélectionné 24 gènes candidats associés à la pluripotence qui pourraient activer un allèle de résistance à l'antibiotique, intégré dans le locus Fbxo15 spécifique des CSE. La combinaison des 24 facteurs introduit par des vecteurs rétroviraux dans les fibroblastes de souris a en effet activé Fbxo15 et induit la formation de colonies résistant à la G418 avec les caractéristiques morphologiques de CSE. L'élimination successive des facteurs a ensuite permis l'indentification des 4 facteurs indispensables pour induire la pluripotence dans des cellules somatiques. Ces facteurs sont Klf4, Sox2, c-Myc et Oct4. L'identification de ces facteurs a permis au Professeur Yamanaka d'obtenir la première génération de cellules souches pluripotentes induites (dites iPSC).(Takahashi and Yamanaka 2006) Ces cellules exprimaient des marqueurs endogènes de cellules pluripotentes comme SSEA-1 et Nanog. Après l'injection sous-cutanée chez la souris immunodéficiente, ces cellules forment des tératomes, comme observés avec les CSE. Les cellules iPSc contribuent aussi à former différents tissus embryonnaires en développement lors de l'injection de blastocystes.

Enfin, vers 2010, il a été montré que des facteurs peuvent induire la trans-différentiation directe de cellules différenciées. Ainsi une cellule différenciée peut passer d'un état à un autre, sans nécessairement repasser par un état de pluripotence. Des facteurs sont ainsi capables de transformer des fibroblastes en d'autres types cellulaires spécialisés comme des neurones par l'activation de facteurs neuronaux comme Ascl1, Brn2 et Myt1 (Vierbuchen et al. 2010) ou des cardiomyocytes par des facteurs cardiaques comme Gata4, Hand, Mef2c et Tbx5 (Ieda et al. 2010).

CONFIDENTIEL

Cellules souches pluripotentes induites (iPSc)

Facteurs de transcription qui induisent la pluripotence

Yamanaka a identifié 4 facteurs de transcription qui induisent la pluripotence dans des cellules somatiques adultes. Ces 4 facteurs sont Oct4, Sox2, Klf4 et c-Myc. Il a été démontré qu'Oct4, Sox2 et Nanog sont des facteurs de transcription essentiels pour maintenir la pluripotence (Boyer et al. 2005). Yamanaka a montré que Nanog n'est probablement pas indispensable.

La protéine c-Myc a plusieurs cibles en aval qui favorisent la prolifération et la transformation dont des gènes qui jouent un rôle dans la génération d'iPS (Adhikary and Eilers 2005). C-Myc s'associe avec les complexes d'histone acetyltransférase (HAT) qui contiennent :

- TRRAP, la sous-unité essentielle de TIP60 et GCN5 (Machan et al, 1998),
- CBP (CREB binding protein) qui se fixe au CRE et une protéine ubiquitaire liant AMPc et p300.

Dans le génome de mammifères il y a jusqu'à 25000 sites de fixation de c-Myc. La protéine c-Myc va agir en induisant une acétylation d'histone qui modifie l'état de condensation de la chromtine et permet aux facteurs de transcription Oct4 et Sox2 de se fixer sur leurs cibles spécifiques. Ainsi des programmes géniques normalement observées dans les cellules pluripotentes embryonnaires commencent à s'exprimer.

Il a été démontré que Klf4 réprime directement p53 (Rowland, Bernards, and Peeper 2005). Il a par ailleurs été montré que la protéine p53 agit comme suppresseur de Nanog pendant la différentiation de CSE (Lin et al, 2004). Yamanaka a montré que le niveau d'expression de p53 est plus bas dans les iPSc comparativement aux MEF (mouse embryonic fibroblasts). Klf4 joue donc un rôle dans l'activation de Nanog et d'autres gènes spécifiques des CSE par la répression de p53. Dans les iPSc, par la répression de p53, Klf4 agit également comme un inhibiteur d'apoptose induite par c-Myc. L'équilibre entre c-Myc et Klf4 est très important dans la génération des iPSc à cause du rôle opposé de ces deux protéines.

Méthodes de génération des iPSc

Depuis la découverte des iPSc plusieurs méthodes ont été mises au point pour générer des iPSc à partir de cellules somatiques adultes. Dans ce chapitre je vais essayer de répertorier toutes les méthodes utilisées avec leurs avantages et limites.

CONFIDENTIEL

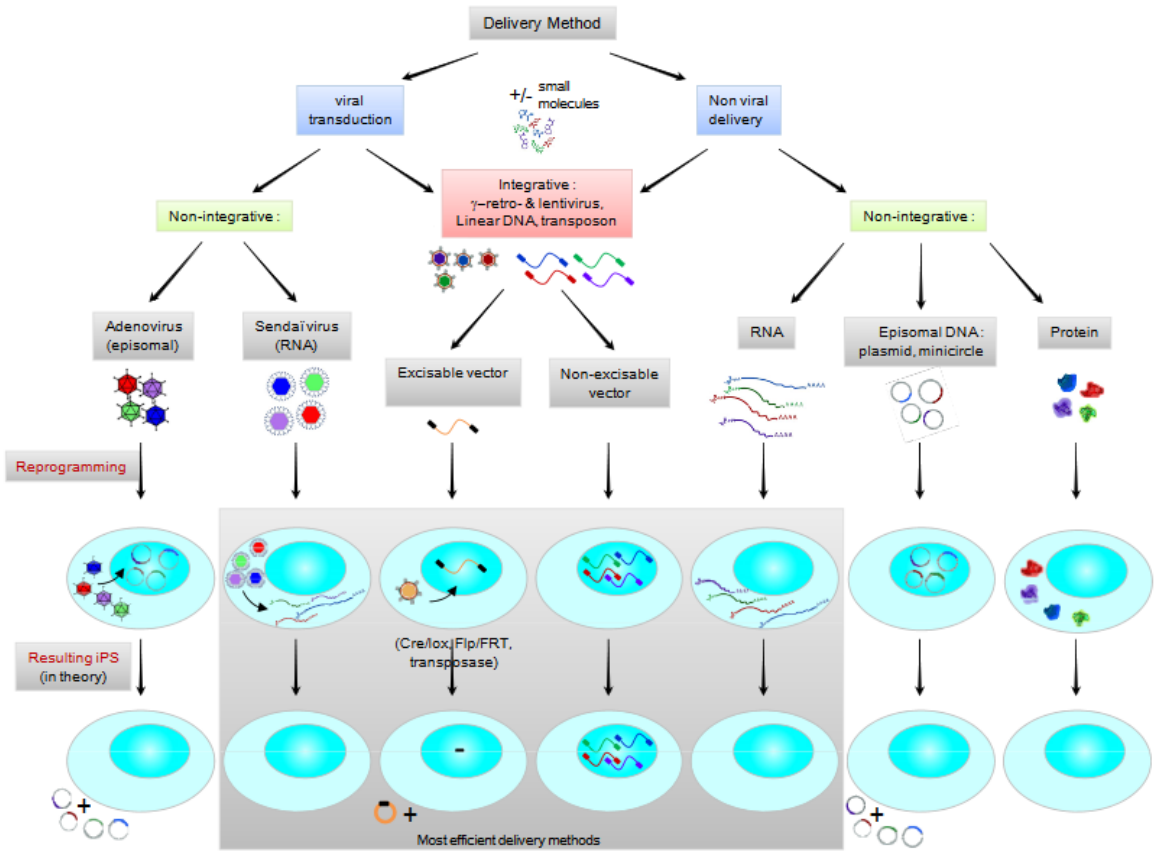


Figure 15: Une représentation schématique des différentes techniques d'obtention d'iPS. (Bayart and Cohen-Haguenauer 2013)

Génération par vecteurs intégratifs

i. Les vecteurs viraux

La première génération d'iPSc a été obtenue par l'introduction des 4 facteurs de pluripotence (OCT4, SOX2, KL et c-MYC) par des rétrovirus dans des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) (Takahashi and Yamanaka 2006). En 2007, la même équipe a utilisé la même méthode sur des cellules humaines. Pour délivrer les facteurs de pluripotence, Yamanaka a utilisé des vecteurs basés sur des vecteurs gamma-rétroviraux Mo-MLV (Moloney murine Leukemia Virus) comme pMXs et pMSCV. Ces vecteurs sont défectueux pour la réplication étant donné que les régions codant pour les protéines de réplication du virus et de l'emballage capsidique sont supprimés du génome viral. Ces vecteurs acceptent un insert d'une taille allant jusqu'à 6 à 8kb. Dans des cellules en division, l'efficacité de transduction peut monter jusqu'à 90%. Le facteur limitant est précisément la capacité de division des cellules. Dans des cellules bien différenciées et qui se divisent peu, la transduction avec ces vecteurs n'est pas efficace. Pour s'affranchir des vecteurs gamma-rétroviraux, il a donc été suggéré l'utilisation

de vecteurs lentivirus. Ces vecteurs sont capables de transduire des cellules en division mais aussi des cellules qui se ne divisent plus. Il a été démontré que l'introduction des facteurs de pluripotence par retro- ou lentivirus était une méthode efficace et beaucoup des iPSCs dans les études actuellement rapportées ont été générées selon cette méthode. Le choix des facteurs de pluripotence utilisés n'est pas nécessairement le plus important, l'étape décisive est la réactivation des voies endogène de la pluripotence de la cellule. La méthode par retro- ou lentivirus implique l'intégration de gènes codant pour les facteurs de pluripotence dans le génome de l'hôte. Cependant cette intégration peut s'effectuer dans des zones génomiques critiques de l'hôte. Il a été également été observé que les gènes associés aux virus ne sont pas toujours complètements éteints et peuvent être réactivés après une culture prolongée ou une différentiation (Kane et al. 2010).

ii. Les vecteurs intégratifs non-viraux

Une alternative aux vecteurs viraux est la transfection d'ADN via des liposomes ou par électroporation. Néanmoins, comparé aux virus, l'efficacité de la transduction est très basse. Il est aussi très improbable que tous les facteurs parviennent à rentrer en même temps dans une cellule. La découverte des vecteurs polycistroniques a engendré une réduction de cette limite. Un vecteur polycistronique permet l'expression des tous les facteurs en même temps sous le contrôle d'un seul promoteur. Chaque cDNA est séparé par une séquence peptidique autoclivable, le peptide 2A. Ce peptide permet aux ribosomes de continuer la traduction du deuxième cadre de lecture quand la protéine du premier est clivée. Ces mécanismes s'appellent le « ribosomal skipping ». Une équipe a réussi à obtenir des iPS de souris de cette manière (Kaji et al. 2009). Depuis, aucune preuve tangible n'est apparue pour soutenir l'idée que l'on peut obtenir des iPS en une seule transfection.

Génération par vecteurs intégratifs excisables

i. Les vecteurs de provenance virale

L'utilisation des vecteurs excisables permet la génération d'iPSc sans maintien des transgènes dans le génome de la cellule hôte. Des vecteurs excisables ont été dessinés à partir de lentivirus. Ces vecteurs possèdent un site LoxP dans la partie 3'-LTR ainsi qu'un promoteur inductible qui contrôle l'expression du transgène. Pendant la rétrotranscription du virus, le site loxP est dupliqué dans la partie 5'-LTR, en conséquence, la cassette transgénique est flanquée de sites loxP. L'excision des facteurs de reprogrammation suit l'expression ciblée et transitoire de la Cre-recombinase dans les cellules transduites. Cela induit un événement de recombinaison entre les sites loxP (Soldner et al. 2009). La limite de cette étude a été que les facteurs de reprogrammation peuvent s'intégrer à différents endroits, ce qui conduit à de multiples excisions pendant l'expression de Cre-recombinase. Des

CONFIDENTIEL

recombinaisons multiples et simultanées peuvent conduire à des réarrangements génomiques et finalement à l'instabilité de l'ensemble du génome.

Un autre système de recombinaison est le système Flp/FRT dérivé de *Saccharomyces cerevisiae*. Ce système est cependant un peu moins efficace que le système Cre-recombinase mais il a l'avantage d'être moins toxique pour les cellules. A l'heure actuelle, seule des cellules de souris ont été reprogrammées par ce système. La cassette avec les facteurs de reprogrammation est flanquée de sites FRT et dérivé dans un lentivecteur polycistronique. Les iPSC obtenues ont été transfectées avec des particules vides du virus MLV ce qui a permis la fusion du FRT avec la polyprotéine Gag-pol, menant finalement à une excision complète de la cassette de reprogrammation.

L'utilisation de ces vecteurs aurait permis une obtention des cellules iPS sans transgène mais malheureusement ces systèmes laissent des cicatrices sous la forme des sites LoxP ou FTR. Les iPSc obtenues avec ces vecteurs ne sont donc pas considérées comme « génétiquement propre ».

ii. Les transposons

Les transposons sont des éléments génétiques mobiles qui peuvent bouger d'une position a une autre dans le génome en utilisant les mécanismes d'insertion et d'excision. Un des vecteurs qui utilise cette technologie est le vecteur piggybac (PB). Pour fonctionner, ce vecteur nécessite une séquence de 13bp d'ITR (inverted terminals repeats) et une transposase active ; c'est l'enzyme qui catalyse les insertions et les excisions. Le système PB est composé d'un plasmide donneur qui est appelé transposon. Ce transposon contient la séquence transgénique qui est flanquée de sites ITRs en 5' et 3'. Ce transposon est co-transfecté avec un plasmide qui exprime la transposase pour procéder à l'intégration du transposon. Deux équipes ont dérivé des iPSc à partir de fibroblastes en utilisant ce système (Kaji et al. 2009). Les iPSc dérivées par cette méthode n'avait ni cicatrice, ni modification du génome après excision de la cassette de reprogrammation. Récemment une nouvelle transposase a été découverte. Elle s'agit de la SB100x, qui est dérivée d'une autre transposase : SB (slepping beauty), obtenue à partir du saumon. La SB100x est 100x plus puissante dans les cellules Hela comparée à l'originale SB (Mates et al. 2009). L'efficacité d'insertion de transgènes en utilisant la SB100x est équivalente à la traduction virale pour la génération d'IPSc de souris ou d'iPSc humaines. Cependant, l'intégration et l'excision ne sont pas complètement sans conséquences, il reste des cicatrices.

Ces deux systèmes permettent l'élimination de la cassette de reprogrammation et son site d'échange par une recombinaison ciblée entre la cassette de reprogrammation et le gène d'intérêt. Ce processus s'appelle l'échange de la cassette par une recombinaison médiée (RMCE : Recombination-Mediated Cassette Exchange). Les iPSc obtenues par ces systèmes sont génétiquement propres car elles ne présentent pas de cicatrice après excision de la cassette. Pourtant deux limites existent à l'utilisation de ces vecteurs pour obtenir des iPSc. La première est la méthode de transfection par laquelle on

CONFIDENTIEL

dérive le vecteur dans des cellules primaires. Les méthodes comme la lipofection, l'électroporation ou la nucléofection peuvent être toxiques ou engendrer une mortalité cellulaire importante. La deuxième limite est due à la capacité de la transposase de changer de sites de fixation très rapidement, ce qui favorise les délétions et intégrations non spécifiques dans le génome. Ces sites non spécifiques (off-target) peuvent provoquer des empreintes et des réarrangements du génome dans les iPSc générées par cette méthode.

Génération par vecteurs non-intégratifs

i. Les virus non-intégratifs

Un des premiers essais de génération d'iPSc avec un système non-intégratif a été réalisé en utilisant des adénovirus (Stadtfeld et al. 2008). Cette équipe a réussi à générer des iPSc à partir d'hépatocytes. Ces vecteurs sont incapables de se répliquer et leur expression n'est que transitoire dans la plupart des cellules. L'efficacité est très limitée.

Pour s'affranchir de l'intégration dans le génome, Fusaki et al ont utilisé le virus Sendai (SeV) (Fusaki et al. 2009). Ce virus contient un simple brin d'ARN et ne s'intègre pas dans le génome. Ces virus sont très efficaces pour introduire des gènes étrangers aux cellules ou dans un tissu. De plus, ils sont non-pathogènes pour l'homme. Ces virus sont utilisés pour la thérapie génique et médicine régénérative. Des kits de reprogrammation par ce virus sont commercialisés et cette approche s'est imposée progressivement comme une technique de choix. Des virus modifiés pour être sensibles à la température ont été obtenus pour pouvoir réduire le nombre de copies présentes dans le cytoplasme des cellules infectées.

ii. Les épisomes

Les épisomes sont utilisés comme une alternative à des vecteurs viraux intégratifs. Grâce à cela, une nouvelle méthode de génération d'iPSc a été proposée. Cette méthode utilise des vecteurs épisomaux qui sont faciles à obtenir et ne nécessitent pas de particules virales. Yu et al, ont obtenu un vecteur épisomal dérivé du virus Epstein-Barr (oriP/EBNA1 : oriP/Epstein-Barr nuclear antigen-1-based episomal vector) (Yu et al. 2008). Ce vecteur se réplique de manière autonome, comme un élément extra-chromosomal sans s'intégrer dans le génome des cellules, qu'elles soient en division ou non. Ces vecteurs peuvent être maintenus comme épisome stable en présence d'antibiotique et être rapidement éliminé après la suppression de la sélection. En 2010, Okita et al, ont décrit une méthode de génération d'iPSc à partir de fibroblastes de peau humaine, en utilisant une combinaison de trois vecteur oriP/EBNA1 comprenant six facteurs de reprogrammation (Okita et al. 2011). En 2010, Chou est son équipe ont obtenu des iPSc à partir de cellules mononucléaires du sang périphérique d'adulte

CONFIDENTIEL

à l'aide d'un vecteur oriP/EBNA1 comprenant cinq facteurs de reprogrammation. Cette méthode est 10 à 100 fois plus efficace comparativement à d'autres vecteurs épisomaux (Chou et al. 2011). Cette technique est aussi beaucoup moins onéreuse et est devenu la technique de premier choix pour la génération des iPSC, notamment dans notre laboratoire.

Plusieurs techniques ont été développées pour introduire les transgènes dans des cellules somatiques. En 2008, Jia et al. ont utilisé des mini-cercle d'ADN codant pour les 4 facteurs de totipotence afin de dériver des iPS. Ils ont construit un plasmide P2PhiC31-LGNSO avec les 4 facteurs de reprogrammation et la GFP, séparé par le peptide 2A autoclivable. Grâce à une recombinaison intramoléculaire le squelette du plasmide est dégradé lors de la production dans un système bactérien ; Les mini cercles d'ADN sont ensuite récupérés et introduits dans des cellules somatiques par nucléofection. L'efficacité de cette reprogrammation est de 0.05% (Jia et al. 2010).

Sans matériel génétique exogène

i. ARN codants

Plusieurs tentatives pour obtenir des iPSCs en délivrant les ARNm directement dans les cellules primaires ont été réalisées. Ces méthodes permettraient de s'affranchir des problèmes d'intégration de séquences étrangères au génome de l'hôte ainsi que des mutations insérées aléatoirement. La première tentative a été réalisée par Plews. Il a transfecté *in vitro* des ARNm codant pour les cinq facteurs de reprogrammation, coiffés et englobé en 5 'et 3' UTR d'α-globine. Cette transfection a donné lieu à une expression des gènes endogènes responsables de la reprogrammation cellulaire. Cependant cette reprogrammation n'a pas été complète (Plews et al. 2010). Une autre tentative a été effectuée par Yakubov et al, qui ont essayés de reprogrammer des fibroblastes de derme humain en réalisant cinq transfections consécutive sur plusieurs jours. Ils ont transfecté quatre transcrits d'ARNm qui comprennent des séquences IRES en 5' UTR et un signal polyA en 3'UTR. Les cellules reprogrammées par cette méthode étaient positives pour Nanog et l'alkaline phosphatase mais aucune différentiation de ces cellules n'est rapportée par les auteurs (Yakubov et al. 2010). Warren et al, ont produits des ARNm coiffés avec un fort signal d'initiation de la traduction dans le 5' et 3' UTR de la β-globine puis une queue poly-A flanquant le cadre de lecture (Warren et al. 2010). Afin d'améliorer cette technique, les ARNm synthétisés sont protégés de la réponse antivirale innée par la substitution de la cytidine avec la 5'methylcytidine et l'uridine par de la pseudouridine. Les ARNm sont ensuite transfectés à l'aide de véhicules cationiques combinés avec un inhibiteur d'interféron, ceci augmente l'efficacité de reprogrammation à 2%. Cette approche est disponible dans le commerce. La limite de cette approche

CONFIDENTIEL

est la nécessité de répéter les cycles de transfections, ce qui induit un stress cellulaire répété. L'autre limite est le coût de la production des ARNm qui est très élevé.

ii. Protéines

Une dernière stratégie qui vise à éviter l'introduction de matériel génétique exogène dans les cellules du donneur, est de délivrer les facteurs de reprogrammation sous forme protéique. L'équipe de Cho a extrait des protéines de cellules CSE et a transféré ces protéines dans des fibroblastes de souris. Ils ont obtenu des iPSc des souris (Cho et al. 2010). Par contre les iPSc humains n'ont jamais été obtenues par cette méthode. L'inefficacité de cette méthode sur les cellules humaines peut s'expliquer par la faible concentration en facteurs de reprogrammation. Pour remédier à ce problème, un autre groupe a produit des protéines de reprogrammation dans des cellules humaines HEK293. Ces protéines possèdent une queue de poly-arginine en C-terminal pour en faciliter la pénétration dans des cellules. Des fibroblastes humains néonataux ont été exposés à ces extraits durant des cycles de 8 heures par semaines pendant six semaines, finalement, plusieurs colonies des iPSc en ont été isolées (Kim et al, 2009). Cette méthode est encore trop peu efficace pour être utilisé en routine.

Différentiation des iPS en cardiomyocytes

i. Cardiomyogenèse

Pour pouvoir produire des cardiomyocytes dérivés des iPSc il faut connaitre et comprendre les évènements cellulaires et moléculaires menant à la cardiogénèse et qui se produisent pendant le développement embryonnaire. Pendant le développement embryonnaire l'épiblaste pluripotent subit des étapes séquentielles de différentiation. Il se transforme en mésoderme, puis en mésoderme cardiaque, puis se transforme encore pour donner des progéniteurs cardiaques qui donnent finalement des cardiomyocytes fonctionnels et battants ainsi que d'autres cellules cardiaques. Ces étapes sont contrôlées par trois familles des facteurs de croissance de nature protéique. Ces facteurs sont secrétés par l'endoderme. Ces facteurs sont les protéines Wnt (Wingless/INT), FGF (Fibroblasts Growth Factor) et la superfamille des ligands TGFβ (Transforming growth factor-beta) qui comprends les BMP (Bone morphogentic proteins), le Nodal et l'Activin A.

CONFIDENTIEL

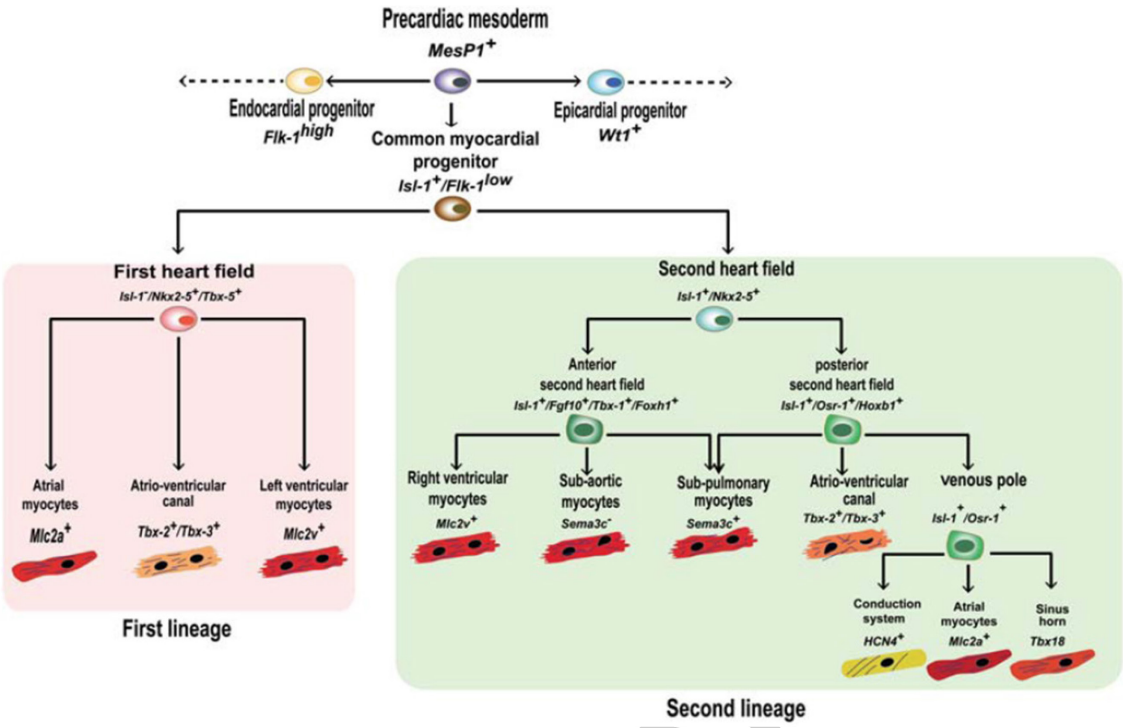


Figure 16: Schéma de la génération de cardiomyocytes (Van Vliet et al. 2012).

ii. La superfamille des ligands TGFβ

La superfamille TGFβ comprend des protéines qui sont des cytokines qui favorisent la cardiomyogenèse. Cette super famille fait partie de la voie de signalisation des Smad. Cette voie permet la transduction du signal lorsque ce facteur de croissance se lie aux récepteurs membranaires de type I et II. Les protéines Smad se divisent en trois catégories : les R-Smad, les Co-Smad et les Anti-Smad. Les récepteurs des BMP transduisent le signal via les R-Smad que sont les protéines Smad 1, 5 et 8. Les récepteurs de TGF-β et d'Activine par le biais de Smad 2 et 3. Les Co-Smad transduisent le signal par Smad4 et 4b et les Anti-Smad par le biais de Smad 6 et 7. Ces protéines possèdent deux domaines fortement conservés : MH1, qui porte le domaine de liaison à l'ADN et un signal de localisation nucléaire et MH2, qui sert à la translocation du Smad vers le noyau. Ces deux domaines sont séparés par un linker, dont la séquence est très variable. Les R-Smad possèdent en plus dans la région carboxy-terminale une séquence SSxS qui est phosphorylée par le récepteur. Le récepteur de type II est un récepteur kinase contenant un domaine riche en serine et thréonine, qui catalyse la phosphorylation du récepteur de type I.

Il existe 3 activines : l'activine A, l'activine B et l'activine AB. L'activine impliqué dans la cardiomyogenèse est l'activine A. Son recepteur de type II est l'ACVR2A et son récepteur de type I l'ACVR1B (ALK4).

CONFIDEN

Il y a plusieurs BMP mais seules deux jouent un rôle dans la cardiomyogenèse : BMP2 et BMP4. Le récepteur de type II de BMP est le BMPR2 et les récepteurs de type I sont BMPR1A (ALK3) et BMPR1B (ALK6).

Dans les premières études, de basses concentrations de BMP4 et de fortes concentrations d'Activine A ont été nécessaires pour induire l'expression de l'αMHC (α-myosin heavy chain –Myh6) dans les cellules embryonnaires de souris (Johansson et al, 1995). Dans des cellules embryonnaires de carcinome de souris (P19C16) l'implication des BMP dans la cardiomyogenèse a été démontrée par surexpression de BMP2 ou Smad1. Ces cellules ont été ensuite différenciées en cardiomyocytes par un traitement avec du DMSO. Il a été démontré que BMP2 et BMP4 induisent l'expression de Gata4 et NKX2.5 (Jamali et al. 2001). L'antagoniste de BMP « noggin » inhibe l'expression de NKX2.5. L'expression forcée de NKX2.5 et GATA4 peut surmonter l'effet de « noggin » et ainsi réactiver la différentiation cardiaque dans des cellules P19C16 traitées au DMSO, ce qui est impossible dans des cellules non traitées. Dans des CSE de souris, une douzaine des gènes ont été identifiés comme des facteurs de transcription cardiogéniques et sont inhibés par « noggin ». Dans cette liste de gènes on trouve Gata4, Hand1, Isl1 et Mef2c qui sont des marqueurs clés de la formation du mésoderme cardiaque. L'utilisation de BMP2 et de BMP4 pour la différenciation cardiaque a été souvent rapportée en combinaison avec l'Activine A et FGF2 pour induire les cellules dans la voie du mésoderme, suivi par Dickkopf (Dkk1) pour inhiber la voie Wnt et diriger le mésoderme vers le mésoderme cardiaque et FGF2 et VEGF utilisé comme mitogènes. La combinaison Activin A, FGF2, BMP4 et VEGF conduit spécifiquement à la formation de cellules progénitrices multipotentes de mésoderme, qui sont capables de générer des cellules de mésoderme comprenant les cardiomyocytes, les cellules musculaires lisses et des cellules endothéliales.

a. Wingless/INT proteins (WNTs)

Wnt est une famille de glycoprotéines. Cette famille est connue pour intervenir dans l'embryogenèse et le cancer. Son nom Wnt vient de la réunion de Wg-wingless (sans-ailes) et Int –integration site (site d'intégration). Le gène wingless a été identifié la première fois chez la mouche *Drosophila melanogaster,* étant impliqué dans la morphogenèse.

Les protéines Wnt via leurs liaisons à un récepteur composé d'une protéine Fz (Frizzled) composé de sept domaines transmembranaires et d'une protéine appelée LRP (LDL-Related Protein), joue un rôle paracrine. Dès que les protéines Fz et LRP sont rassemblées par Wnt à l'extérieur de la cellule, elles recrutent la protéine Dishevelled (Dsh ou Dvl) du coté intracellulaire. Cette protéine Dvl va ensuite recruter une protéine kinase appelée GSK3 (Glycogen Synthétase Kinase 3). La GSK3 phosphoryle la partie intracellulaire de LRP et déphosphoryle la β-caténine. La β-caténine déphosphorylée n'est alors plus reconnue par l'ubiquitine, empêchant alors la dégradation de la β-caténine par le protéasome.

CONFIDENTIEL

Ainsi, la β-caténine qui est, un facteur de transcription peut être transloqué dans le noyau de la cellule-cible des Wnt et stimuler, en interaction avec d'autres facteurs de transcription, l'expression de gènes spécifiques. La voie de signalisation des protéines Wnt via la β-caténine est appelée voie canonique. Il existe cependant des voies indépendantes de la β-caténine et qui peuvent être modulées par Wnt. Ces voies sont appelées non-canoniques et mettent en œuvre des récepteurs tyrosine-kinases appelés ROR et RYK. Il existe aussi une voie Wnt/Calcium qui met en jeu une augmentation des taux cytosoloques de calcium à partir d'un relargage du calcium du réticulum endoplasmique. Ce relargage provient de la production d'IP3 produit par l'activation de la PLc consécutive à une stimulation Wnt. Ce relargage de calcium induit à son tour une activation de voies clés dans la cardiogénèse, notamment la calcineurine, CAMKII et la PKC.

La preuve que la signalisation Wnt canonique est requise pour la formation des cardiomyocytes par des cellules pluripotentes a été mise en évidence dans des cellules P19CL6 et ensuite confirmé dans les CSE (Lindsley et al.). La différenciation des P19CL16 qui est induite par le DMSO récapitule les étapes précoces de la spécialisation cardiaque. Les médiateurs biochimiques de la signalisation Wnt- Wnt3A et Wnt8A, ainsi que les rapporteurs TCF-dépendants ont été induits beaucoup plus tôt que les premiers facteurs de transcription cardiogéniques. L'induction de facteurs cardiogéniques de transcription, de facteurs de croissance cardiogéniques, et de myosine sarcomérique a été bloquée par le Wnt inhibiteur Frz8 / Fc ou par l'activation de GSK-3. La myogenèse cardiaque dont l'activation des facteurs de transcription comme NKX2-5, Gata4, MEF2C, Tbx5 et Myh6 a été obtenue par l'inhibition de GSK3, par utilisation de milieu conditionné Wnt3A ou par l'utilisation de lithium (Nakamura et al, 2003). Le rôle de la voie Wnt /β caténine est essentiel pour la formation de mésoderme et d'endoderme par des cellules souches pluripotentes.

Il existe cependant une temporalité d'action de cette voie au cours de la formation. Dès que le mésoderme est formé, l'activation de la voie Wnt inhibe la myogenèse cardiaque. Il faut donc inhiber cette voie pour induire la myogenèse cardiaque. Les gènes sensibles au Dkk sont des régulateurs de la formation du mésoderme (T, Eomes) et du mésoderme cardiaque (Cripto et Mesp1). Si la voie Wnt est inhibée trop tôt, ceci bloque l'induction en mésoderme primitif (T, Mixl1), en mésendoderme (Sox17), en mésoderme cardiaque (Mesp1) et en progéniteurs cardiaques (Gata4, Nkx2.5). La capacité de Mesp1 à promouvoir la spécification cardiaque en mésoderme est censément dépendante de son induction par Dkk1, un inhibiteur Wnt, à ce stade. Le premier inhibiteur de la voie Wnt utilisé pour la différentiation cardiaque a donc été Dkk1, qui agit sur le complexe Fz-LRP. Ensuite d'autres familles de petites molécules inhibant la voie ont été découvertes : IWR (inhibitor of Wnt reponse) et IWP (inhibitor of Wnt production). Les inhibiteurs IWR agissent sur la réponse de la voie Wnt et donc sur la voie Tankyrase. L'inhibiteur le plus souvent utilisé de cette famille est IWR1. Les inhibiteur IWP agissent

CONFIDENTIEL

sur la production de Wnt. L'efficacité de cet inhibiteur prouve aussi que l'activité endogène de Wnt doit être bloquée pour une différenciation efficace (Willems et al. 2011). Plusieurs IWP sont utilisés : IWP2 ; IWP3 et IWP4.

De ce fait, il est possible de moduler pharmacologiquement l'ensemble de la voie Wnt ou plus spécifiquement les voies canoniques ou non canoniques. Ainsi, les molécules de type IWR modulent la voie canonique car ils ciblent le complexe d'activation de la béta-caténine. Il en est de même de Dkk1 qui bloque la voie canonique. Cependant, ces molécules ne modulent pas la voie Wnt non-canonique. A l'inverse, les molécules de type IWP bloque la sécrétion de Wnt et ainsi par retour empêchent l'activation des voies canoniques ou non-canoniques. Il n'existe pas de bloqueurs spécifiques de la voie non-canonique, hormis via l'inhibition sélective de CAMKII, de la calciuneurine et de la PKC en utilisant simultanément différentes petites molécules inhibitrices.

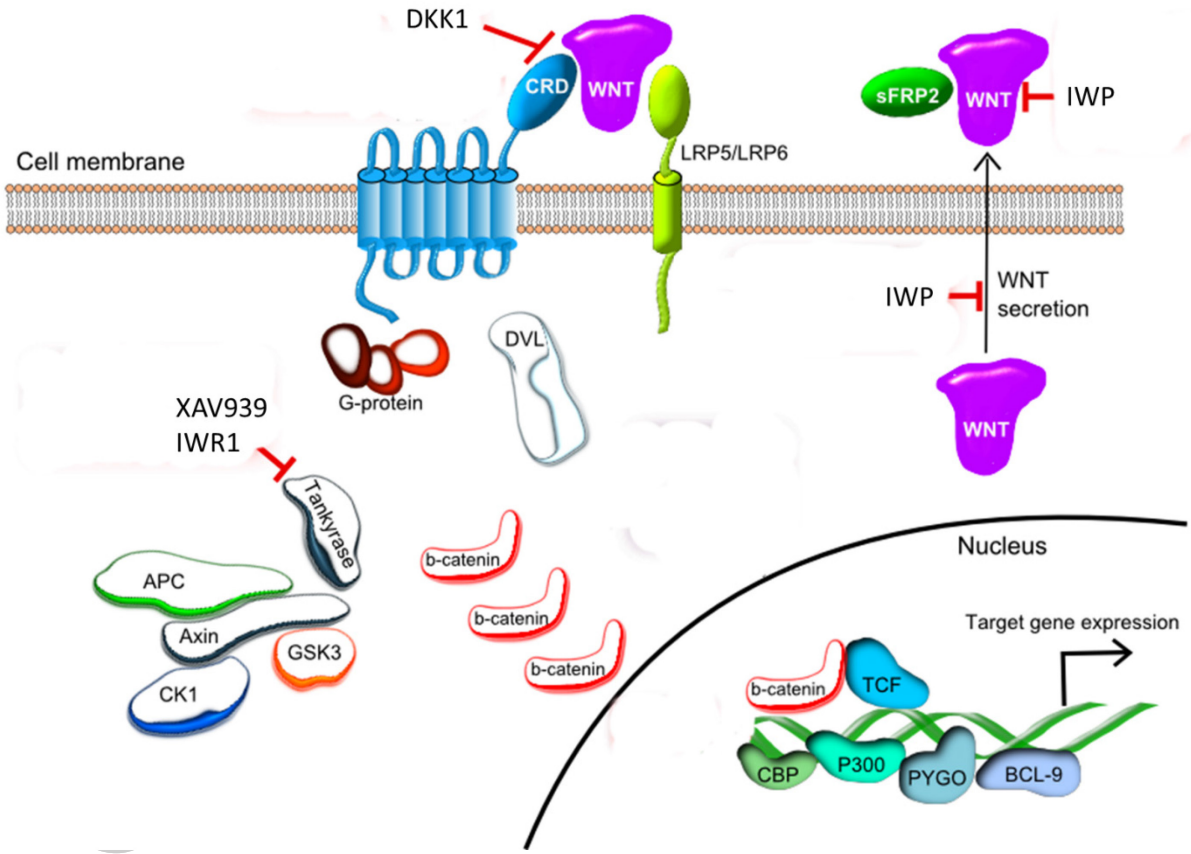


Figure 17: Schéma de la voie Wnt et les inhibiteurs de cette voie avec leur cibles active. (Adapté de Blagodatski et al, 2014)

b. Fibroblast growth factors (FGFs)

La voie de FGF2 est hautement conservée chez les mammifères. Les facteurs de croissance de fibroblastes (ou FGF, fibroblast growth factor) forment une famille comportant 23 protéines identifiées à ce jour chez l'homme (FGF1, FGF2,..., FGF23). Ce sont des protéines qui activent la migration et la

multiplication de cellules cible. Ces facteurs sont généralement sécrétés par des fibroblastes. Le rôle le plus important des fibroblastes, cellules du tissu conjonctif, est de maintenir la matrice extracellulaire des tissus conjonctifs, et de réparer les lésions dues à un traumatisme. Ils servent aussi à réguler l'organisation et la différenciation des cellules des tissus environnants.

D'intérêt pour les protocoles en vue d'améliorer la production de cardiomyocytes à partir de CSE, l'inhibition de la signalisation de type FGF par le composé SU5402 a nettement augmenté la spécification cardiogénique BMP2- dépendante. Ceci a été démontré par une induction de mésoderme et de marqueurs cardiaques 3 à 10 fois plus importantes, mais en contradiction avec la mise en valeur par FGF dans d'autres conditions. En effet, dans des CSE de souris, si on inhibe FGF4 la différenciation en mésoderme est altérée. La signalisation FGF a également un rôle démontré dans la différenciation des progéniteurs cardiaques adultes. Dans la différenciation *in vitro* de cellules Sca-1+ en cardiomyocytes, la fonction contractile était défectueuse chez les souris FGF2 KO.

iii. La différenciation cardiaque « in vitro »

Le processus de différenciation *in vitro* en cardiomyocytes reproduit les étapes de la cardiomyogenèse observé pendant le développement embryonnaire. Ceci passe par l'activation ou l'inhibition de voies de signalisation clé dans le développement cardiaque. Les questions clés pour la reproduction de ce processus in vitro sont le choix des voies ciblées (et donc des molécules pharmacologiques), le timing d'application des facteurs ou molécules sélectionnées et l'architecture globale de la différentiation. Les cardiomyocytes dérivés d'iPSCs sont les premières cellules où les interactions cellule-cellule stimulent l'expression de marqueurs mésodermique. (Rajala et al).

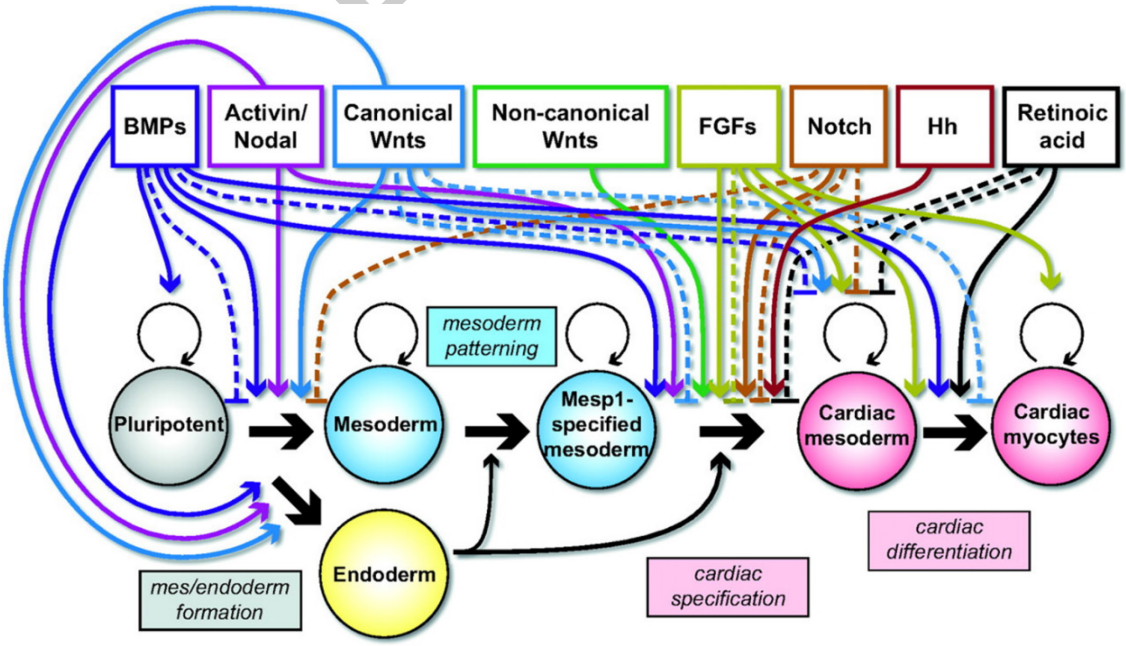


Figure 18: Signaux pour la création du muscle cardiaque au cours de l'embryogenèse et différenciation des cellules souches (Noseda et al. 2011)

a. ENDs co-culture

La différenciation d'IPSc en cardiomyocytes mime in vitro des nombreux événements moléculaires et structurels de la cardiogenèse *in vivo*. Au cours du développement cardiaque précoce, l'endoderme antérieur se trouve à l'arrière, directement sur le croissant cardiaque embryonnaire et est considéré comme essentiel pour l'initiation de la cardiogenèse en fournissant les signaux nécessaires pour le développement cardiaque. En 2003 Mummery et al, ont étudié le rôle d'une lignée END2 (visceral endoderm-like cell line) sur la différenciation de cellules souches embryonnaires humaines. Cette lignée est dérivée de cellules de carcinome embryonnaire P19 de souris. Ils ont constaté que la co-culture de cellules END2 (mitotiquement inactive) et de CSE a donné lieu à des formations des zones battantes dans 35% de la surface du puits au bout de 12 jours. Par contre seulement 2 à 3% de ces cellules étaient des cardiomyocytes. Comme le premier protocole de différenciation dirigée, la méthode de co-culture a nécessité quelques modifications afin d'améliorer l'efficacité de différenciation. Les SVF utilisés initialement ont été remplacés par un milieu sans sérum et sans insuline. Ces modifications ont permis d'augmenter jusqu'à 10 fois le nombre de colonies battantes. Ces modifications ont entraîné une différenciation efficace pour diverses lignées cellulaires souches. Le rôle de petites molécules dans la co-culture est aussi important que dans d'autres méthodes de différenciation. L'addition de Prostaglandine I2, d'acide L-ascorbique et de SB203580 (inhibiteur de la voie MAP kinase) a amélioré la différenciation cardiaque en co-culture. Bien que le mécanisme précis dans lequel les cellules END-2 induisent la différenciation reste incertain, il a été déterminé que les interactions de cellule à cellule ne jouent pas un rôle essentiel dans l'induction cardiaque parce que le milieu conditionné d'END2 (END-2-CM) seul a également été utilisé avec succès pour induire la différenciation robuste des CSE en cardiomyocytes. Cette méthode est difficile à mettre en œuvre car elle exige beaucoup de temps et son rendement est faible. Grâce à la compréhension et la découverte de facteurs secrétés par les END-2 comme des BMP, des activines et des FGF ainsi que des répresseurs de la voie Wnt, d'autres protocoles de différenciation ont pu être établis et améliorés.(Mummery 2003)

b. La différenciation en corps embryoïdes (Embryoid body)

Les premières différenciations en cardiomyocytes ont été faites à l'aide d'ECCs et de CSE. Les colonies d'ECCs et de CSE ont été dissociées en cellules unique et collectées sous une forme de gouttelettes. Les cellules s'agrègent entre elles et forment des éléments sphéroïdes. Ils contiennent une couche interne de cellules « ectoderme-like » et une seule couche extérieure d'endoderme. En raison de la similitude de ces agrégats aux embryons post-implantation, ils ont été nommés EB (pour « Embryoid Body »). Les cellules EB miment en partie les processus de développement qui se produisent dans un embryon normal tel que la différenciation en dérivé des trois couches germinales, dont des cellules

CONFIDENTIEL

qui se contractent spontanément- les cardiomyocytes. Il s'est avéré que contrairement aux CSE de souris, les CSE humaines ne tolèrent pas la dissociation enzymatique en cellules individuelles et subissent une apoptose avant de former des EB. En 2001 Kehat et al, ont dissocié des CSE humaines avec de la collagénase IV pour former de petits agrégats. Ces agrégats étaient ensuite cultivés en suspension dans un milieu contenant 20% de SVF (Sérum de veau fœtal) pendant 20 jours. Après 20 jours de culture, les EB sont transférés sur des boites de Pétri recouvertes de gélatine. 8% de ces EB battaient spontanément et leur pourcentage de troponine T (cTnT) était d'environ 30%. L'addition d'acide ascorbique dans le milieu a augmenté le pourcentage de cellules battantes à 45%.(Kehat et al. 2004) Par contre les chercheurs ont mis en évidence que dans le SVF contient de nombreux facteurs pouvant inhiber la différenciation cardiaque. En 2007 le groupe de Michel Pucéat a proposé un premier protocole sans sérum. Le sérum est remplacé par du KO-SR (*knock out serum replacement*) à 5% final afin de créer le milieu KO-DMEM. Les EBs ont été obtenu par une dissociation enzymatique et cultivé en suspension. L'obtention de mésoderme a été ensuite induit par un traitement avec du BMP2 pendant 48h en présence ou non d'un inhibiteur du récepteur de FGF2, le SU5402.(Tomescot et al. 2007) En 2008, le groupe de Gordon Keller, a mis au point le premier milieu de différenciation sans sérum. Le milieu basal sans sérum a été le StemPro34. (L. Yang et al. 2008) Le protocole a été développé en 3 parties. Pour induire des CSE en EB, de petits agrégats ont été cultivés en suspension dans du StemPro34 avec l'acide ascorbique et du BMP4 pendant une journée (J0). Des jours 1 à 4 les EB ont été cultivés dans du milieu basal supplémenté de BMP4, d'Activine A et de FGF2 pour induire la différentiation en mésoderme primitif. Pour induire le mésoderme cardiaque, les EBS s ont été ensuite traités avec du VEGF et DKK1 pendant 4 jours (Jour 4 à 8). Les cellules ont été finalement traitées avec du VEGF, du bFGF et du DKK1 pour stimuler à la fois l'expansion et la différenciation des cellules de la lignée cardiaque. Cette induction cardiaque progressive à base de facteurs de croissance a conduit à la production de cellules cTnT + (J14) représentant jusqu'à 40% des cellules totales. Les différences de rendement de la différenciation entre les lignées cellulaires souches pourraient être dues à des niveaux plus élevés de BMP endogène NODAL, de signalisation dans différentes lignées cellulaires, et éventuellement à une disparité entre les différents passages de même lignées cellulaires. Le remplacement du sérum par des facteurs de croissance dans un milieu défini a amélioré l'efficacité de différenciation et réduit le risque de contamination par des agents pathogènes associés au sérum. Pendant ce temps, de nombreux aspects moléculaires et cellulaires de la cardiogenèse *in vivo* ont été déchiffrés avec le développement de la biologie chimique et de la technologie de criblage moléculaire à haut débit. Ces avantages technologiques ont encouragé les scientifiques à les appliquer dans la biologie des cellules souches. Karakikes et al. ont utilisé un certain nombre de ces avancées pour modifier le protocole de Yang dans lequel la formation d'EB a été induite en cultivant des cellules

CONFIDENTIEL

souches embryonnaires humaines en suspension dans un milieu hESC additionné de la BMP4 et de blebbistatine pendant un jour (jours 0 -1). A l'instar de Yang, les EB ont été induites vers des lignées cardiaques après qu'ils ont été cultivées dans un milieu de différenciation qui contenait de l'acide ascorbique, du BMP4 et de l'activine A pendant 48 heures (jours 1-3). Après un temps de repos dans un milieu de base (3-4,5 jours), les EB ont été traités par un inhibiteur de la voir Wnt (IWR-1) pendant 96 heures (jours 4.5-8.5). L'efficacité de ce protocole était proche de 100% car 90% des EB battants exprimaient la cTnT et l'α-actinine. De plus, l'utilisation d'inhibiteur de Tankyrase, IWR1, a permis à tous les cardiomyocytes d'avoir un phénotype ventriculaire.(Karakikes et al. 2014) Cependant, l'application de la protéine recombinante DKK1 a généré une population hétérogène qui exprimait des phénotypes atriaux, ventriculaire et nodales. Les améliorations de ce protocole sont l'élimination du sérum et l'utilisation de milieux définis sans sérum, l'addition de facteurs de croissance, et l'application de petites molécules pour assurer une meilleure reproductibilité du protocole de différenciation.

Les paramètres qui influencent la production et la reproductibilité de la différenciation en EBs sont la taille et la morphologie des EBs. Ce paramètre influence le type cellulaire dans le quelle les cellules se différencié. La culture en gouttelettes a été développée pour augmenter l'uniformité des EBs. Cette méthode était surtout utilisée pour des CSE de souris. Pour adapter cette méthode à des CSE humaines, Yoon et al.ont dissocié mécaniquement des CSE humaines en petits agrégats puis cultivé ces agrégats sous forme des gouttelettes dans un milieu DMEM/F12 contenant 20% de SVF. L'efficacité de formation des EBs battants était significativement plus élevée dans la culture en gouttelettes par rapport à la culture en suspension. Cette efficacité augmentée jusqu'à 35% quand le milieu de culture de gouttelettes contient du 5-azacytidine.(Yoon et al. 2006) Une autre approche pour générer des EBs uniformes est fondée sur une technique de l'agrégation forcée dans laquelle les cellules souches pluripotentes ont été mises sur une plaque de 96 puits, puis agrégées par centrifugation à une faible vitesse pendant un certain temps pour générer des EBs homogènes (Burridge et al. 2007). Ce protocole a été amélioré par la même équipe en 2011.(Burridge et al. 2011) Pour se faire, 5000 iPSCs en RPMi ont été ensemencées par puits de plaques à 96 puits non coaté à fond en V, puis agrégées par centrifugation à 950 g pendant 5 min à température ambiante. Ils ont utilisé BMP4, FGF2 et l'albumine et acide L-ascorbique humaine pour induction du mésoderme et la spécification cardiaque. Quatre jours après l'agrégation cellulaire initiale, ils ont changé le milieu pour du RPMI + insuline et transféré les EBs dans une plaque de 96 puits à fond en U. La contraction des EBs a été observée à J9.

Enfin, les chercheurs ont travaillé sur une optimisation d'un milieu sans provenance animale. En 2008 Ng et al, ont établi un milieu appelé APEL (animal product free medium)(Ng et al. 2008). En 2011, Elliot et al, a amélioré ce milieu. Il l'a appelé LI-APEL (Low –insulin APEL medium) qui a été supplementé avec 5 facteurs de croissance : BMP4, VEGF, SCF, Activin A et WNT3A (BVSAW) pendant 3 jours. Puis les EBs

CONFIDENTIEL

ont été cultivé 4 jours sans facteurs de croissance dans du LI-APEL. 97% des EBs ont été contractile.(Elliott et al. 2011) L'efficacité de la différenciation dépend du ratio entre BMP4 et Activine A et aussi du timing de l'addition de facteurs de croissance. Une autre methode pour obtenir des EBs uniformisé est l'utilisation de plaques spéciales appelées AggreWell. Ces plaques contiennent des micropuits. Afin d'établir des agrégats de différentes tailles dans la même plaque, une nouvelle approche de micropuits a en effet été décrite. Cette approche génère différents micropuits comme des pyramides inverses. Les micropuits pyramidaux peuvent être ensemencés avec différents nombres de cellules pour produire des agrégats de tailles différentes sans nécessiter de micropuits de différentes tailles. Il a été démontré que, dans un système d'induction cardiaque sans sérum, la taille des agrégats de cellules souches module directement la concentration de cellules de l'endoderme extra-embryonnaire endogène, ce qui affecte à son tour la cardiomyogenèse ultérieure. En conséquence, les agrégats plus petits (100 cellules) et les agrégats plus gros (4000 cellules) présentent toujours la fréquence la plus élevée et la plus faible des cellules de l'endoderme, respectivement, même en présence de facteurs de croissance qui spécifient la lignée cardiaque. D'autres technologies comme l'ingénierie de micropuits 3D ont été rapportés pour produire des EBs uniformes de taille contrôlée. Il a été démontré que des puits de 300 µm ont été le plus efficace pour générer des EB contractantes, comparables à la gamme de 250-350 µm trouvée dans l'agrégation forcée.

La différenciation cardiaque en EBs a été rapporté par pour nombreux lignées de cellules souches (embryonnaires et IPS). Malgré les inconvénients de cette méthode de différenciation comme la faible efficacité, la difficulté, le temps consommé, les améliorations de la différenciation en monocouche (cf infra) et la grande variabilité entre les lignées cellulaires, elle reste la méthode principale dans un grand nombre de laboratoire pour générer des cardiomyocytes.

c. La différenciation en monocouche.

Les iPSC sont des cellules adhérentes qui ne conservent pas leur état de pluripotence lorsqu'elles sont ensemencées à l'état de cellule unique. Dans les cultures en EBs, des barrières diffusionnelles complexes existent et les interactions cellule-cellules tridimensionnelles sur l'ensemble de la surface cellulaire, ce qui n'est pas le cas en monocouche. Pour induire la différenciation cardiaque en monocouche -appelé aussi différenciation en 2D- il faut donc pouvoir cultiver les cellules pluripotentes en monocouche en conservant leur pluripotence puis ajouter séquentiellement la bonne combinaison, la bonne dose et au bon moment les facteurs de croissance nécessaire pour transformer les iPSC en cardiomyocytes. La première tentative de différenciation en monocouche a été réalisée par Laflamme en 2007. (Laflamme et al. 2007). Il a cultivé la lignée H7 de cellules souches embryonnaires non differenciées en haute densité (100000 cellules/cm^2) sur une couche de matrigel et dans un milieu conditionné de fibroblastes embryonnaires de souris (MEF). Le matrigel est une matrice extracellulaire

CONFIDENTIEL

utilisée pour la culture des cellules souches pluripotentes dans des conditions feeder-free donc sans cellules nourricières (MEF). Pour induire la différenciation Laflamme a changé le milieu de culture en milieu RPMI/B27. Il a traité les cellules pendant une journée avec une haute dose d'Activine A puis 4 jours avec du BMP4. Il a observé des zones battantes (30%) au bout de 12 jours post traitement avec l'Activine A. Il a réussi à augmenter le taux de cardiomyocytes à 82% après une purification en Percoll. Malheureusement ce protocole n'était pas applicable à toutes les lignées ESC ou iPSC. En 2007 Ueno et al, ont mis en évidence le rôle de la voie Wnt β catenine dépendant donc la voie Wnt canonique dans la différenciation en cardiomyocytes de cellules souches embryonnaires de souris et de cellules de poisson zèbre. Ce rôle est bi phasique. Il faut activer cette voie au début de la différenciation pour induire les cellules en mésoderme et mésoderme cardiaque puis l'inhiber pour augmenter la spécification de la cardiogénèse. En 2011, le même groupe a étudié le rôle de cette voie dans la différenciation de cellules souches embryonnaires humaines. Pour induire la différenciation cardiaque les cellules sont cultivées en RPMI-B27 et traitées avec l'activateur de la voie Wnt (le Wnt3a) et l'Activine A pendant 24h puis avec DKK1 et BMP4 pendant 4 jours. Le Dkk1 exogène a bloqué le Wnt produit par le système endogène dans le stade tardif de la cardiogenése qui a augmenté l'efficacité de la différenciation en cardiomyocytes. D'autres groupes ont remplacé le milieu RPMI/B27 par des milieux sans produits animaux, LI-APEL supplémenté avec BVSAW. Ils ont réussi à adapter leur méthode de différenciation en EBs pour une différenciation en monocouche. (Elliot et al, 2011). Ceci montre la difficulté du développement de ces protocoles de différenciation en monocouche et les avancées progressives qui ont permis de la mettre en place.

Plusieurs équipes ont montré que la manipulation de la voie canonique de Wnt est un paramètre critique pour une différenciation efficace. En 2011 Gonzalez et al, a développé une méthode progressive fondée sur l'utilisation de petites molécules pour la différenciation de cellules souches embryonnaires en cardiomyocytes. Ils ont mis en culture les CSE humaines dans du RPMI / B27 contenant un inhibiteur GSK3ß pendant 48 h, ce qui a donné lieu à> 90% de cellules positives pour des marqueurs précoces du mésorderme (braychury T, MIXL1, MESP-1 et EOMES).(Gonzalez, Lee, and Schultz 2011) La culture de ces cellules pendant 25 jours dans le même milieu de base supplémenté avec IWR-1endo, purmorphamine (agoniste de signalisation Shh) et SB431542 (antagoniste du récepteur TGFß), a abouti à ≥ 80% Nkx2.5 + et> 50% cTnT + et α-actinine +de cellules totale. Quelques mois plus tard, Lian et al, ont publié la méthode GiWi qui a représenté une amélioration majeure pour la différenciation. Ce protocole utilise exclusivement deux petites molécules qui modulent la signalisation de la voie Wnt. Dans un premier temps, ils ont activé la voie Wnt par un inhibiteur de GSK3 (CHIR) afin d'induire une différenciation, suivi de soit shRNA de la β-caténine ou l'addition d'un inhibiteur de la porcupine (Porcn) par IWP2 ou IWP4.(Lian et al. 2013) Ces dernières molécules

CONFIDENTIEL

bloquent la sécrétion de la protéine Wnt pendant 3 jours. Les cellules contractiles ont été observées au bout de 7 jours et l'expression de la cTnT atteint le 90% au bout de 15 jours.

En 2012 Zhang et al, ont amélioré le protocole original de Laflamme en remplaçant le RPMI/B27 par du RPMI/B27 sans insuline et en rajoutant du matrigel dans du milieu. L'utilisation de facteurs de croissance et une matrice cellulaire pendant la différenciation imite plus précisément le cardiogenése. Cette méthode a été appelé la méthode du sandwich. Les IPSC ont été dissociées en cellule unique puis cultivées sur du matrigel en mTesr1 (milieu utilisé pour la culture des iPSC en condition feeder-free). Quand les cellules ont atteint 90% de confluence une fine couche de matrigel a été déposé sur la monocouche de cellules en mélangeant le matrigel avec du mTesr1. A 100% de confluence le milieu a été changé pour RPMI/B27 –ins avec l'Activine A et du matrigel pendant 24h, puis pendant 4 jours les cellules le milieu a été supplémenté avec du BMP4 et FGF2. Cette méthode était efficace pour plusieurs lignées CSEC et iPSC et a permis d'obtenir de bons rendements de cardiomyocytes (98% de cellule cTnT+) qui étaient en majorité ventriculaires.(Zhang et al. 2015) Malheureusement l'utilisation du matrigel a augmenté le cout de la différenciation donc cette méthode n'était pas applicable pour beaucoup de laboratoires.

Au total, la différenciation en monocouche est plus facile à mettre en œuvre que la différenciation en EBs. La découverture du rôle biphasique de la voie Wnt canonique à permis de mettre au point des protocoles de différenciations que permettre d'obtenir une grande quantité de cardiomyocytes dérivés d'iPS. Cependant, il existe plusieurs approches de différenciation, tant au niveau de l'architecture de la différenciation menée en conditions tri- ou bidimensionnelles et au niveau des choix des molécules et donc de fait des voies ciblées durant la différenciation. De même, la reproductibilité de ces protocoles entre différentes lignées de cellules souches pluripotentes induites est parfois limitée. Enfin, l'ensemble de ces protocoles proposent des caractérisations limitées des cardiomyocytes produits, celle-ci se limitant souvent à l'apparition de cellules battantes ou au niveau d'expression de la troponine. Des paramètres plus poussés des caractéristiques architecturales ou sarcomériques des cellules produites sont très rarement disponibles.

Utilisation des cellules souches pluripotentes induites en recherche médicale

La génération des cellules souches pluripotentes induites humaines provenant de patients porteurs de maladies particulières (dont les maladies cardiaques) et la possibilité de différencier ces iPSC en cardiomyocytes a ouvert de nombreuses voies d'explorations. Il y a aujourd'hui trois utilisations principales de ces cellules : la modélisation in vitro des maladies, les tests pharmacologiques et la thérapie cellulaire.

CONFIDENTIEL

La modélisation des maladies

Un grand nombre de modèles animaux (principalement murins) ont été développés pour reproduire les maladies cardiovasculaires observées chez l'homme. Ceci a particulièrement été proposé pour la modélisation des maladies cardiaques héréditaires dont les cardiomyopathies. Malheureusement, compte-tenu de fortes différences entre les espèces, il est souvent très difficile de reproduire chez l'animal les phénotypes observés chez l'homme. De ce fait, il existe un besoin important pour compléter les données animales avec des modèles humains. Les iPSC dérivés de patients sont donc des candidats idéaux pour modéliser in vitro les maladies cardiovasculaires (« trial in a dish »). Ceci est particulièrement vrai pour la modélisation des maladies cardiaques héréditaires, notamment les canalopathies.

Il y a à ce jour plus 39 publications qui utilisent les iPSC spécifiques de patients comme modèle de maladies cardiovasculaires héréditaires. Les premières maladies décrites en utilisant les cardiomyocytes dérivés des iPSc ont été liées à des anomalies des canaux ioniques cardiaques, comme le syndrome de QT long et les Tachycardies Ventriculaire Catécholergiques. Il y a maintenant plus de 13 publications qui utilisent ce modèle pour les canalopathies.

En 2010 Moretti et al, ont utilisé les cardiomyocytes derivés des iPSc pour reproduire in vitro le QT long de type 1. Les fibroblastes de deux patients avec le syndrome de QT long de type 1 lié à la mutation R190Q dans le canal KCNQ1 et par ailleurs de fibroblastes de deux patients contrôles sains non apparentés ont été reprogrammés par retrovirus. Les iPSC obtenues ont été dérivées en cardiomyocytes par la méthode des EBs. Les cellules derivées chez les patients portant la mutation ont montré un phénotype caractéristique de la maladie comparé aux cellules de patients contrôles. Notamment, le potentiel d'action été plus long dans les cardiomyocytes dérivés de patients comparé aux contrôles. L'adaptation à des fréquences de stimulation plus elevée a été moins prononcée chez les patients. Les cellules de patients ont aussi montré des arythmies spontanées et encore plus pronocées après traitement avec un agoniste adrénergique (isoproterenol). (Moretti et al, 2011).

Dans une autre étude, le syndrome de QT long de type 2 a été modélisé à l'aide d'IPSC par Itzhaki et al. Ils ont étudié la mutation A614V codant pour la sous-unité α KCNH2 du canal potassique HERG. Les cardiomyocytes derivés d'iPSC montrnt un phénotype caractéristique de la maladie comme un potentiel d'action prolongé et la présence de post-dépolarisations précoces (Itzahaki et al, 2011). Matsa et al, a aussi modelisé le syndrome de QT long de type 2 en étudiant des iPSC derivés d'une mère et de sa fille qui portaient la mutation Ala561Thr du gène KCNH2. La fille avait 15 ans et a fait 11 épisodes de syncope, son intervalle QTc était de 571ms. Sa mère portant la même mutation était par contre porteur asymptomatique cliniquement, mais présentait une anomalie du QTc à 517ms. Les

CONFIDENTIEL

cardiomyocytes dérivés des iPSC de ces patientes montrent le phénotype de la maladie, bien qu'il fût moins prononcé dans les cellules de la mère comparé aux cellules de la fille. (Matsa et al, 2011) Egashira et al, ont utilisé des cardiomyocytes derivés des iPSC pour caracteriser une nouvelle mutation dans le canal KCNQ1. D'autres groupes ont utilisé ce modèle pour etudier le phenotype de cette maladie comme Lahti et al, 2012 et Okata et al, 2013. Globalement, toutes ces études ont montré la capacité des cellules iPSC à reproduire in vitro ces canalopathies monogéniques causées par des mutations à effet fort.

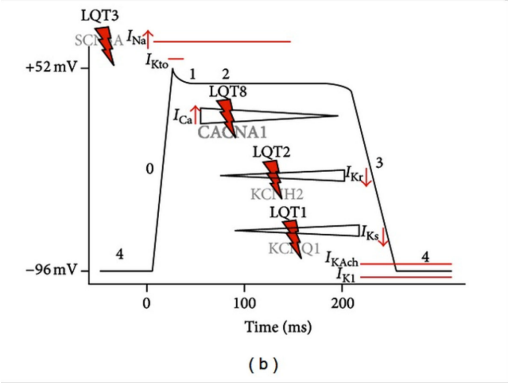
Un chevauchement entre le syndrome du QT long de type LQT3 et le syndrome de Brugada a été modélisé par des cardiomyocytes derivés d'iPSC provenant d'un patient porteur de la mutation SCN5A-1795insD. (Davis et al, 2012). Ces cellules LQT3 spécifique présentait un phénotype de la maladie caractéristique causée par la perte de fonction du canal Na +.

Par ailleurs, ces modèles peuvent aussi être utiles pour étudier des réponses pharmacologiques spécifiques. En 2013, Ma et al, a rapporté la modélisation du syndrome LQT3 basé sur iPSC à partir d'un patient porteur d'une mutation dans SCN5A. Les cardiomyocytes derivés des iPSC montré un potientiel d'action prolongé, qui a été raccourcie avec succès par l'application de mexilétine, un bloqueur de canal Na +. Yazawa et al. ont étudié des cardiomyocytes derivés des IPSC de deux patients atteints du syndrome Timothy associé à la mutation nonsense G1216A dans le gène codant pour CACNA1C la sous-unité α du type L canal de Ca2 +. Les cardiomyocytes derivés des iPSC de ces patientes présentaient l'inactivation retardé du canal $I_{Ca,L}$ et des anomalies du transport du Ca2 + intracellulaire, avec transitoires calciques plus grandes et prolongées. Le traitement par la roscovitine, un composé qui augmente l'inactivation de tension dépendante de la tension dépendante de Ca2 + canal, a restauré les propriétés électriques et de signalisation de calcium des cellules mutantes.

Une autre canalopathie étudiée par le biais de cardiomyocytes issue des iPSC sont les Tachycardies Ventriculaire Catecholergiques. Fatima et al. ont été les premiers à modéliser la CPVT utilisant le cardiomyocytes derivés d'iPSC spécifique d'un patient avec une mutation ponctuelle de RYR2 provoquant des arythmies et post-dépolarisations retardées révélées par patch-clamp (Fatima et al, 2011). Di Pasquale et al, a observé un phénotype arytmique en mesurant les transitoires calciques dans les EBs battant derivés d'iPSC de patients atteints de CPVT comparé aux sujets sains. (Di Pasquale et al, 2013). Novak et al, ont été les premiers qui ont rapporté la modélisation CPVT d'un patient porteur d'une mutation dans CASQ2. Ils ont étudié la mutation D307H. Ils ont reprogrammé des fibroblastes de 2 patients portant cette mutation à partir de fibroblastes de peau. Les iPSC étaient ensuite derivées en cardiomyocytes selon la technique EBs. Les cardiomyocytes derivés de cellules des patients montrent un phénotype plus immature avec des myofilaments désorganisés. Ils ont aussi observé l'extension des citernes du réticulum sarcoplasmique et un nombre réduit de cavéoles dans les

CONFIDENTIEL

cardiomyocytes dérivés d'iPSC de patient. Les caractéristiques fondamentales des arythmies induites par l'isoprotérénol présentées par cardiomyocytes CPVT illustrés par les enregistrements électrophysiologiques et mécaniques suggèrent que ces cardiomyocytes mutées constituent un modèle pour l'étude des arythmies survenant chez les patients CPVT.



LQTS subtype	Gene	Reference
LQTS1	KCNQ1	Moretti et al, 2010 Egashira et al, 2012
LQTS2	HERG	Itzhaki et al. 2011, Matsa et al. 2011 & 2013; Lahti et al. 2011 Bellin et al. 2013
LQTS3	SNC5A	Malan et al 2011, David et al. 2012 Terrenoire et al 2012, Ma et al. 2013
LQTS8	CACNA1c	Yazawa et al 2011

Figure 19: Tableau récapitulatif de modélisation du syndrome QT (Savla et al, 2014)

En dehors des canalopathies, plusieurs équipes ont cherché à modéliser d'autres cardiomyopathies héréditaires rares en utilisant des cardiomyocytes dérives d'iPSC. En 2013, Hicks et al, ont reprogrammé des cellules des deux patients présentant une ataxie de Friedreich, qui est une maladie génétique neurodégénérative associée à une cardiomyopathie. Cette maladie est causée une expression réduite de la frataxine, une protéine mitochondriale essentielle. Cette équipe a ensuite derivé ces iPSC en neurones et en cardiomyocytes. Dans des cardiomyocytes dérivés des patients, ils ont observé deux types d'anomalies des mitochondries : premièrement, une prolifération et/ou accumulation de mitochondries structurellement normales et, deuxièmement, les mitochondries dégénérées avec une matrice sombre et mal définie. Dans des cardiomyocytes contrôles, ils ont aussi observé ces structures sombres mais en plus petite quantité (Hick et al, 2013).

Un autre syndrome génétique rare qui est associé à une cardiomyopathie chez l'enfant est le syndrome LEOPARD. Cette maladie génétique touche la voie RAS-MAPKinase. Le phénotype majeur de la maladie chez les patients atteints du syndrome de LEOPARD est une cardiomyopathie de type hypertrophique. Carvajal-Vergara et al, ont reprogrammé des fibroblastes de deux patients portant la mutation ponctuelle nonsense T468M dans le gène *PTPN11* qui code pour la phosphatase SHP2. Le groupe a montré que les cardiomyocytes derivés d'iPSC de patient portant cette mutation sont plus grands en taille et que leur sarcomère est plus organisé comparé aux iPSC contrôle derivéx d'un frère sain d'un

CONFIDENTIEL

patient mais aussi de CSE humaines Ces caractéristiques sont corrélés avec l'état hypertrophique (Carvajal-Vergara et al, 2010).

Enfin, quelques équipes s'intéressent à la modélisation de la DVDA à partir d'iPSC. Les protéines associées à cette maladie sont des protéines du desmosome, ce qui implique une anomalie de la jonction entre cellules. Caspi et al, ont reprogrammé des fibroblastes de patients avec une insertion dans le gène codant pour la plakophilin-2 (PKP2) A324fs335X/N. En comparant les cardiomyocytes derivés des patients avec des cardiomyocytes contrôles, Caspi et al ont pu identifier les anomalies desmosomales significatives. Ils retrouvent aussi l'accumulation de gouttelettes lipidiques. Les auteurs concluent à la possibilité de modéliser la DVDA en utilisant cette approche (Caspi et al, 2013).

Paradoxalement, et sans rapport avec la fréquence plus importante de ce type de cardiomyopathie, peu d'études se sont intéressés aux sarcoméropathies. Le premier groupe d'avoir modélisé les sarcomeropathies est le groupe de Joseph Wu à Stanford. En 2012, l'équipe s'est intéressée à la cardiomyopathie dilatée (CMD) en dérivant des iPSC portant la mutation ponctuelle R173W dans le gène codant pour une protéine sarcomérique de la troponin T cardiaque. Par rapport aux cardiomyocytes d'iPSC contrôle issu des individus sains de la même famille, les cardiomyocytes d'IPSC issue des patients malades avait une transitoire calcique altérée, une diminution de la contractilité à l'échelle cellulaire, et une anomalie de la structure des sarcomères montré par une distribution d' α-actinine anormale. Cette étude suggère que les cardiomyocytes dérivés d'iPSC de patients atteint de la CMD peut être reproduit dans une certaine au niveau morphologique et fonctionnel. Les auteurs suggèrent que l'approche peut donc servir de plate-forme utile pour explorer les mécanismes moléculaires et cellulaires et optimiser le traitement de cette maladie particulière (Sun et al, 2012). Les paramètres analysés restaient cependant limités notamment sur l'évaluation systématisée et précise de la structure et de la fonction des sarcomères. De plus, la cardiomyopathie dilatée est caractérisée par une dilatation de la cavité cardiaque, qui peut être difficile à reproduire à l'échelle cellulaire. Hinson et al, nt uitlisé un approche 3-dimensionelle pour etudier les mutations dans la titin chez le patients CMD. Ils ont utilisé de CMTs (cardiacs microtissues) pour voir l'influence de la mutation de titine à l'organisation du sarcomère (Hinson et al. 2015). En 2013, Lan et al ont modélisé la cardiomyopathie hypertrophique à l'aide des cardiomyocytes dérivés d'iPSC de patients portant la mutation Arg663His dans le gène codant pour la chaine lourde de la myosine (MYH7). Ils ont étudié une cohorte de 10 patients de la même famille. Les cardiomyocytes d'IPSC patient spécifique ont récapitulé un certain nombre de caractéristiques de la CMH y compris l'hypertrophie cellulaire, l'activation de la calcineurine-NFAT, la surexpression des facteurs de transcription hypertrophiques et arythmie. (Lan et al, 2013). En 2014 un autre groupe a confirmé les résultats de Lan et al, en étudiant

CONFIDENTIEL

les cardiomyocytes dérivés des iPSC de patient portant une autre mutation du gène MYH7 (Arginine442Glycine). (Han et al, 2014).

L'ensemble de ces études, pourtant de nombre assez limité, démontrent la capacité des iPSC à reproduire in vitro les cardiomyopathies héréditaires. Les principales pathologies reproduites sont cependant des canalopathies. La modélisation des sarcoméropathies, pourtant plus fréquente et posant des problèmes d'évolution vers l'insuffisance cardiaque, est beaucoup plus limitée, suggérant une plus grande difficulté soit d'analyser la fonction ou la structure des sarcomères soit de produire des cardiomyocytes développant une architecture suffisante pour modéliser les sarcoméropathies.

Tests pharmacologiques

La production de cardiomyocytes dérivés des iPSC humains a ouvert des nouvelles pistes de tests pharmacologiques pour la toxicité et l'efficacité de nouvelles molécules.

Comme mentionné ci-dessus, Itzhaki et al, ont ainsi modélisé in vitro le syndrome du QT long de type 2 à l'aide de cardiomyocytes dérivés des iPSC. Ils ont aussi utilisé ces cellules pour étudier les effets de différents agents thérapeutiques sur la prévention des arythmies. Le raccourcissement du potentiel d'action et la prévention de l'apparition de post-dépolarisation précoce a été réalisée par l'application de la nifédipine. La nifedipine est inhibiteur du canal calcique de type L, il bloque l'influx calcique qui contribue à la durée du potentiel d'action et la formation de post-dépolarisation précoce. Ils ont aussi utilisé le pinacidil, une molécule qui ouvre le canal $I_{K,ATP}$ et augmente les courants de repolarisation. Les cardiomyocytes derivés d'IPSC spécifique du patient ont ainsi permis de mettre en évidence que la ranolazine inhibe le canal Na+ et peut empêcher la survenur de post dépolarisation précoce sans raccourcir la durée du potentiel d'action (Itzaki et al).

Matsa et al, après avoir modélisé le QT de type 2, ont demontré que l'application des activateurs de canaux potassiques tels que le nicorandil et PD-118057 ont un effet anti-arythmique et ces molécules raccourcissent la durée du potentiel d'action (Matsa et al, 2011). En 2013 le même groupe a testé une nouvelle thérapie potentielle sur des cardiomyocytes derivés d'iPSC de patient. Cette thérapie serait spécifique du patient et allèle spécifique par rapport à la mutation de la protéine mutée hERG (Matsa et al, 2013).

Yazawa et al, après avoir modélisé le syndrome de Timothy par les cardiomyocytes derivés d'iPSC, ils ont testé un traitement par la roscovitine. C'est un composé qui augmente l'inactivation voltage-dépendante du canal calcique. Ce traitement a restauré la signalisation électrique et la transitoire calcique dans les cardiomyocytes dérivées d'iPSc mutant (Yazawa et al).

Terrenoire et al, ont étudié une cohorte d'une famille avec le syndrome QT long de type 3 avec une mutation de-novo du gène SCN5A (F1473C) et un polymorphisme (K897T) dans KCNH2 qui est plutôt

CONFIDENTIEL

un gène du syndrome de QT long de type 2. Ils ont reprogrammé des fibroblastes de ces patients et ont ensuite dérivés des cardiomyocytes mutés à partir des iPSC. Après avoir montré que les cellules des patients montrent des signes typiques d'un syndrome primaire du QT long de type 3, les auteurs ont utilisé cette plate-forme cellulaire pour tester différents traitement anti-arythmique. Les chercheurs ont ainsi trouvé que la mexilétine administré à haute dose pouvait prévenir les arythmies induites in vitro. Ils ont ensuite proposé un ajustement thérapeutique du patient à partir de ces résultats avec une réduction clinique de la survenue d'événements rythmiques. Cette étude est la première à proposer l'utilisation d'iPSc spécifiques de patients comme un modèle in vitro d'optimisation individualisée des traitements préventifs du QT long (Terrenoire et al, 2013).

Jung et al, ont reprogrammé des fibroblastes d'une patiente de 24 ans diagnostiqués avec une CPVT qui a fait un arrêt cardiaque puis implanté avec un défibrillateur. Un dépistage génétique a démontré que la patiente porte une mutation nonsense dans le gène codant pour RYR2 (S406L). Cette mutation est située dans un hotspot. Les cardiomyocytes dérivées d'iPSc ont été traités avec du dantrolene. Ce traitement a restauré la transitoire calcique dans des conditions basales et a corrigé l'hyperactivité des cellules après une stimulation adrénergique.

Itzahaki et al, a modélisé la CPVT avec les iPSc de patients. Les fibroblastes dermiques ont été obtenus à partir d'un patient CPVT portant une mutation hétérozygote de RYR2 (M4109R) et reprogrammés pour générer les iPSc-CPVT. Les hiPScs spécifiques du patient ont été différenciés en cardiomyocytes et comparés à des cardiomyocytes contrôles dérivés d'iPSc. Les résultats d'enregistrements électrophysiologiques ont démontré d'apparition de post-dépolarisations retardés dans 69% des cardiomyocytes-CPVT comparé à 11% pour de cardiomyocytes contrôles. La stimulation adrénergique par l'isoprotérénol ou la forkoline a augmenté la fréquence et l'ampleur des post-dépolarisations. En revanche l'administration de flécainide et thapsigargine élimine toutes les post-dépolarisations dans ces cellules.

Caspi et al, ont réussi à modéliser la DVDA avec les cardiomyocytes dérivés d'iPSC. Ils ont utilisé ce modèle pour vérifier, si comme observé dans le modèle animal, les cellules produites à partir des iPS mutées et issus de patients présentant une DVDA subissent a une accumulation de lipides. Ils ont traité des cellules dérivées de patient avec un mélange de 3-isobutyl-1-méthylxanthine, dexaméthasone, et de l'insuline en association avec un supplément en lipides. Les cellules contrôles ne présentaient pas d'accumulation de gouttelettes lipidiques et une structure desmosomale et sarcomérique normale. En revanche, des cardiomyocytes dérivés de patients montrent une forte accumulation de gouttelettes lipidiques et très peu de desmosomes. Ils ont aussi mis en évidence que l'activation de la voie canonique de Wnt par la petite molécule BIO (qui est un inhibiteur spécifique de GSK3β) peut inverser le phénotype de l'accumulation lipidique.

CONFIDENTIEL

Sun et al, ont modélisé la CMD ont utilisant les cardiomyocytes derivés de IPSC de patients. Ils ont mise en évidence que le traitement prolongé avec des β-bloquants (métoprolol) a un effet bénéfique sur le phénotype du sarcomère anormal de ces cardiomyocytes en augmentant le nombre des cellules α-actinin positives. Ce traitement a aussi un effet chronotrope negatif et améliore le transitoitre calcique de ces cellules. De plus, dans cette étude, cette plate-forme cellulaire a été utilisée pour tester l'effet de la restauration de l'expression de Serca2a par transfert de gène. Au-delà des tests pharmacologiques, cette étude est ainsi la première à proposer l'utilisation des iPSC pour tester des thérapies géniques. La surexpression de Serca2a dans ces cellules corrige ainsi le phenotype de la CMD. Tanaka et al, ont dérivé d'iPSC à partir des fibroblastes et lymphocytes de patients CMH portant ou pas une mutation causale et aussi à partir de patient contrôle. Ils ont mesuré la surface des cardiomyocytes dérivées de patient et contrôle et ils n'ont observé que peu de différences entre les deux populations. En revanche, cette différence devient évidente après avoir traité les cellules avec Endothelin−1. Les auteurs ont notamment mis en évidence une hypertrophie ainsi une désorganisation myofibrillaire dans le cardiomyocytes dérivés des patients. Cette étude confirme que la stimulation pharmacologique peut parfois être utile pour détecter des différences phénotypiques qui ne seraient pas vues à l'état basal.

La thérapie cellulaire

Les iPSC représentent un grand espoir pour la thérapie cellulaire et les applications en médecine régénérative, notamment en apportant une source cellulaire qui pourrait être spécifique d'un patient donné. Grace à leur capacité d'auto-renouvellement et la différenciation indéfinie dans tous les types de de cellules du corps humain y compris le cardiomyocytes, les iPSC pourrait théoriquement être une source illimitée de cellules cardiaques humaines utiles pour des approches de remplacement cellulaire. Cependant, le développement des nouvelles techniques de reprogrammation sans utilisation de transgènes ont été développé dans ce but.

L'utilisation des cellules souches pluripotentes induites en application thérapeutiques pose des problèmes spécifiques. Tout d'abord, le maintien de cellules conservant un état pluripotent peut provoquer la tumorogenèse après transplantation. De même, il a été proposé que ces cellules ne fussent pas immunogènes mais il semble que cette donnée soit liée au degré de différenciation obtenu. Ainsi, d'autres problèmes comprennent la faible efficacité de la production de cardiomyocytes et la variabilité d'une lignée cellulaire à une autre. Compte tenu de l'évolution rapide des technologies dans ce domaine, il est possible que ces obstacles techniques seront bientôt surmontées, et que les approches fondées sur iPSC se révélera être utile pour le traitement d'insuffisance cardiaque et leur l'application dans la recherche clinique.

CONFIDENTIEL

À ce jour, une grande variété de différents types de cellules souches ont été étudiées pour leur capacité à réparer le cœur infarci à la fois études animales et dans la recherche clinique chez humain (Lovell et al, 2010). La découverte des iPSC a ajouté une source cellulaire supplémentaire qui peut avoir une application clinique potentielle dans ce domaine, bien que la recherche en médecine régénérative utilisant ces cellules souche soit encore à un stade expérimentale (Yoshida et al, 2011). Cependant, l'enthousiasme pour l'utilisation des iPSc en médecine régénérative a été entravé par les problèmes de plus en plus reconnus de l'instabilité génétique de ces cellules et leur potentiel à présenter une différenciation non maitrisée.

A ce jour, les maladies rétiniennes dégénératives font l'objet de phases de test pour des traitements par therapies basées sur des iPSC. Ces premières études cliniques sont cependant retardées par les difficultés à produire des cellules iPS de grade clinique et satisfaisant l'ensemble des critères de contrôle sécurité. Dans le domaine de la recherche en cardiologie, quelques études utilisant des iPSC pour traiter l'insuffisance cardiaque ischmique ont été récemment rapportées. Nelson et al, ont démontré qu'après l'injection des IPSc dans des zones infarcies chez la souris, ces cellules exogènes ont donné naissance à de nouveaux cardiomyocytes qui peuvent se greffer sans perturber l'architecture globale du cœur. Ils ont aussi constaté que le traitement avec les iPSC a rétabli la contractilité, l'épaisseur de la paroi ventriculaire et la stabilité électrique du cœur. Ces cellules ont aussi participé dans la régénération du tissu cardiaque, du muscle lisse et du tissue endothéliale (Nelson et al, 2009). Dans une autre étude de preuve de concept Mauritz et al, ont montré que l'injection d'IPSc trié pour une population des cellules progénitrices Flk+ d'un myocarde infarci améliore la fonction cardiaque après l'infarctus. Ces cellules sont capables de se différencier en cellules des lignées cardiovasculaires *in vitro* comme *in vivo* (Mauritz et al, 2011). Les études de greffe de CM dérivés d'iPSC chez des mammifères sont en plein développement. Récemment un essai d'allogreffe de CM dérivés d'iPSC a été réalisé chez les primates. Il a été basé sur l'allogreffe de CM d'iPSC de singe. Les singes ont subi une opération visant à créer une ischémie suivie d'une reperfusion du cœur, afin de mimer un infarctus du myocarde. Deux semaines après l'intervention, des CM issus d'iPSC ou seulement le véhicule ont été injectés dans la zone infarcie et la zone en bordure de l'infarcissement. Les animaux ont été sacrifiés 12 semaines après la transplantation. Dans les deux groupes étudiés, aucune formation de tératome n'a été observée. Dans cette étude il a été démontré que les CM issus d'iPSC de singe se sont correctement intégrés et couplés au receveur, ils participent à la fonction contractile du cœur et en améliorent la force contractile dans ce modèle d'infarctus bien que des effets paracrines notamment puissent également rentrer en jeu (Shiba et al, 2016).

Cet effet paracrine a été étudié chez la souris dans le cadre d'une cardiomyopathie induite par la Doxorubicine. Ce composé est souvent utilisé en chimiothérapie. Ce médicament peut induire une

CONFIDENTIEL

cardiomyopathie et a permis de développer un modèle de cardiomyopathie chez la souris. Dans cette étude les chercheurs ont comparé la thérapie cellulaire basée sur l'injection de cellules mésenchymateuses (MSC) dérivées de la moelle osseuse ou dérivées d'iPSC. Les auteurs ont constaté que les cellules dérivées d'iPSC produisent des effets bénéfiques plus importants grâce à des réponses anti-oxydantes et anti-apoptotiques plus fortes ; ces effets contribuent à une efficacité thérapeutique supérieure dans l'atténuation de la cardiomyopathie induite par la Dox. En comparaison avec des cellules dérivées de la moelle osseuse, les MSC d'iPSC secrètent des cytokines impliquées dans des mécanismes anti-apoptotiques, anti-inflammatoires, anti-oxydatifs, et permettent également la régulation de la mobilisation et la réactivité cellulaire (Zhang et al, 2015).

CONFIDENTIEL

Chapitre 3 : EDITION DU GENOME

L'édition génomique (anglais : *genome editing*) ou « édition du génome avec des nucléases modifiées » regroupe un ensemble de techniques de manipulations du génome via la « réécriture du matériel génétique ». Cette technique peut être appliquée aux plantes, animaux, champignons et microbes, et surtout au génome humain. Les techniques d'édition de génome regroupent des techniques de génie génétique dans lesquelles un ou plusieurs morceaux d'ADN sont insérés, remplacés ou retirés d'un génome en utilisant des nucléases artificiellement modifiées et qui fonctionnent comme des «ciseaux moléculaires». Le mot anglais « editing » évoque le vocabulaire de l'informatique et la fonction « couper-coller ». Ces « ciseaux » sont des nucléases : des enzymes de restriction qui peuvent sectionner le double-brin d'ADN à des emplacements précis. Mais à la différence des enzymes de restriction qui reconnaissent des séquences consensus fréquentes dans un génome, les outils d'édition génique sont capables de cibler une séquence précise d'un génome. En théorie, ces outils permettent donc de cibler précisément un locus donné d'un génome annoté.

L'ensemble des outils ont une fonction nucléase qui crée une coupure double brin de l'ADN. Les cellules répondent à ces coupures par des mécanismes de réparation d'ADN selon deux mécanismes principaux :

La jonction d'extrémités non homologues (en anglais Non-Homologous End-Joining ou NHEJ). C'est un mécanisme non-conservatif, de réparation de l'ADN. Il permet de réparer des lésions provoquées par des cassures double brin. Cette réparation peut conduire à un changement de l'information génétique, généralement une délétion et plus rarement une insertion. Si la cassure survient à l'intérieur d'un gène ceci peut conduire à modifier le cadre de lecture. Cette approche peut donc permettre d'éteindre l'expression d'un gène (knock out). Pour effectuer, cette réparation la cellule emploi la protéine Ku70/80. Cette protéine interagit avec les deux extrémités d'ADN résultant de la cassure. Cette protéine agit par essais et erreurs pour tenter d'établir une interaction transitoire entre les deux extrémités d'ADN. Pour cela la protéine Ku possède plusieurs activités :

- une activité de nucléase pour éliminer les nucléotides endommagé par la cassure et incompatibles avec la ligature des extrémités. La protéine Ku permet de produire des extrémités 5'-phosphate et 3'-OH compatibles avec la suture des brins par l'ADN ligase.
- Recrutement d'autres protéines impliquées dans la réparation : Une protéine-kinase ADN dépendante (DNA-PK), une ADN ligase spécifique, une terminal-transférase.

La protéine Ku70/80 vérifie s'il y a une homologie de 2 à 4 bases et donc si l'hybridation est possible. La jonction est stabilisée et la cassure est transformée en deux lésions simples brin. Le brin

CONFIDENTIEL

complémentaire est synthétisé par une ADN polymérase à partir du brin qui vient être réparé par la protéine Ku. La protéine Ku a aussi un rôle de l'ADN ligase qui reforme les liaisons phosphodiester.

La recombinaison homologue :

C'est une recombinaison génétique où les séquences de nucléotides sont échangées entre des molécules d'ADN identique ou similaires. Elles sont utilisées pour réparer les cassures doubles brin. Elle permet de créer de nouvelles combinaisons pendant la méiose. La recombinaison homologue est aussi utilisée par les bactéries et les virus pour s'échanger le matériel génétique. Ce mécanisme est appelé le transfert de gène horizontal. La recombinaison homologue suit une série d'étapes :

1) la résection qui consiste à supprimer une section d'ADN autour des extrémités 5' de la lésion
2) l'invasion du brin où les extrémités de 3' restantes autour de la lésion se fixent à une molécule intacte d'ADN de séquence similaire
3) la formation de la « jonction de Holliday » qui se fait la connexion de molécules
4) la coupure de brins pendant la méiose par des enzymes
5) la réparation d'ADN

Le phénomène de recombinaison est conservé au sein de tous les domaines de la vie, et même des virus, suggérant qu'il s'agit d'un mécanisme biologique universel. Une dysfonction de ces gènes étant corrélée avec l'apparition de plusieurs types de cancers, les protéines concernées font l'objet de recherches actives.

La technique de « gene targeting » ou de « genome editing » utilise le principe de la recombinaison homologue avec l'objectif d'introduire des changements dans le génome. Les premières tentatives de modification des génomes ont consisté à modifier des séquences génétiques en utilisant uniquement la recombinaison homologue. Ce mécanisme de maintenance naturel de l'ADN permet de réparer un brin d'ADN en utilisant comme modèle une séquence homologue située sur un autre brin. Il est possible d'induire des recombinaisons homologues entre l'ADN naturel d'une cellule et un brin d'ADN exogène introduit par les chercheurs, en utilisant comme vecteur le génome modifié empaqueté dans un système vecteur par exemple. Le phénomène de recombinaison est suffisamment souple pour qu'il soit possible d'introduire un certain niveau de changement (ajout, suppression ou modification d'une portion d'ADN) au niveau de la zone d'homologie visée. Dès les années 1980, Mario R. Capecchi et Oliver Smithies ont travaillé sur la recombinaison homologue de l'ADN comme outil de « ciblage de gène », c'est-à-dire comme instrument d'inactivation ou de modification de gènes précis. Avec la collaboration de Martin J. Evans, ils ont mis au point un procédé permettant de modifier le génome de souris en modifiant l'ADN de cellules souches embryonnaires murines en culture, et en injectant ces cellules souches modifiées dans des embryons de souris. Les souris génétiquement modifiées ainsi

CONFIDENTIEL

générées permettent d'étudier des maladies humaines en laboratoire. C'est aujourd'hui un outil couramment utilisé en recherche médicale. Les travaux des trois chercheurs leur ont valu le Prix Nobel de physiologie ou médecine en 2007.

Différents outils provoquant une cassure de l'ADN ont été découverts et améliorés. Les premiers outils coupaient les deux brins de l'ADN, par la suite la modification de ces outils a permis d'obtenir des cassures simple brin. Le chapitre suivant présente les différents outils disponibles à l'heure actuelle ainsi que leurs modes de fonctionnement.

Nucléases et nickases

Les nucléases à doigt de zinc (zinc-finger nucleases - ZFN)

Les nucléases à doigts de zinc (ang : finger nucleases zinc (ZFN)) sont des protéines modulaires constituées d'une série de motifs Cys_2-His_2 à doigt de zinc qui lie l'ADN et le domaine de clivage de l'enzyme Fok I qui est un enzyme de restriction de type IIS. Chaque motif à doigt de zinc reconnaît 3-4 paires de bases de l'ADN, ainsi que la nature modulaire du motif à doigt de zinc permet une liaison spécifique à une séquence composite en associant plusieurs motifs en tandem. L'activité de la nucléase FokI nécessite la dimérisation. Par conséquent, les deux ZFN ont été conçus pour se lier sur des côtés opposés de l'emplacement cible avec les domaines FokI respectifs orienté une vers l'autre. Cette conception améliore encore plus la spécificité de ZFN comme la dimérisation de FokI ainsi le clivage est dépendent de la longueur de la cible (Caroll, 2011). Une paire de ZFN contient trois motifs à doigt zinc ce qui est suffisant pour une hybridation spécifique d'une séquence de 18 pb dans le génome humain. En pratique, le chercheur utilise quatre à six motifs pour augmenter la spécificité. Ceci a été testé et prouvé par Bhakta et al (Bhakta et al, 2013). Parmi tous les nucléases synthétiques, les ZFN sont les plus anciennes et donc les mieux étudiées. Il y a beaucoup de ressources technologiques pour le dessin ainsi que l'assemblage de ZFN. De ZFN bien dessinés sont très efficaces pour l'insertion ou la correction du gène cible. Malgré de nombreux rapports réussis d'édition génomique de cellules humaines en utilisant de ZFN, la technologie de ZFNs a plusieurs limites. L'assemblage de doigts de zinc motifs ne sont pas modulaires dans le sens le plus strict. L'affinité de liaison des motifs individuels est dépendante du contexte. Le nombre de sites ciblés est réduit. Pour obtenir de ZFN fonctionnels il faut donc une quantité considérable d'expérience, beaucoup de temps et d'efforts. Une autre limite de ZFN est leur clivage non spécifique hors cible (ang : off-target). Ce clivage non spécifique peut induire la cytotoxicité, l'apparition des mutations et induire des effets d'autres que celle induit avec l'édition génomique de la cible (Gabriel et al, 2011). Des variants de FokI ont été crés pour minimiser cette non-spécificité (Doyon et al, 2011). La conversion de FokI en nickase a aussi permis de diminuer le clivage

CONFIDENTIEL

hors cible. Malgré cette amélioration il faut contrôler ces clivages hors cible. L'approche la plus directe pour se faire est le séquençage haut débit.

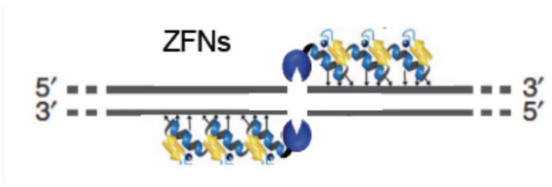


Figure 20: Representation de ZFNs

TALENs

En 2009, une autre nucléase synthétique appelé TALEN (ang : Transcription Activator-like Effector Nucleases) a été décrite comme une alternative aux ZFNs. L'architecture de TALENs est similaire à celle de ZFN, avec un domaine de liaison à l'ADN fusionné à un domaine Fok I. Le module de liaison à l'ADN de TALENs provient d'un domaine liaison à l'ADN composé des repetitions TALEs (transcription activator-like effectors) qui sont des protéines bactériennes de l'agent pathogène de la plante Xanthomonas. (Joung et al, 2013). Contrairement aux doigts de zinc, chaque répétition de TALENs a une correspondance avec un ratio 1 :1 (i.e., 1 à 1 pb). La plupart des 34 acides aminés dans chaque répétition sont hautement conservés, à l'exception des deux résidus variables, qui déterminent la spécificité de la base de l'ADN. Les TALENs existent naturellement sous forme des tandems de motifs répétés, ce qui signifie qu'ils ont été «pré-optimisé" pendant évolution pour l'assemblage modulaire. Cela se traduit par un avantage unique lors de l'assemblage TALENs. Contrairement à ZFNs, l'assemblage modulaire de TALENs a un taux de réussite de 100%, ce qui a deux conséquences importantes :

1) Tout laboratoire de biologie moléculaire peut produire des TALENs rapidement
2) Une automatisation de la production de TALENS est possible

La comparaison côte à côte de ZFNs et TALENs montre que les TALENs ont une efficacité comparable et une toxicité inférieure. Une de limitations de TALENs est que la séquence de la cible doit commencer avec une Thymine (T). (Pattanayak et al, 2011, Ding et al, 2013) Ceci peut poser problème pour les applications. Les TALENs ont un effet hors cible mais moins important que le ZFNs. Les effets hors cible sont diminués grâce à des bouts collants laissés par les TALENs sur l'ADN. (Ding et al, 2013). Une base de données de TALENS ciblant 18740 gènes codant pour des protéines humains. (Kim et al, 2013). Les kits d'assemblage des TALENS sont commercialisés.

CONFIDENTIEL

Figure 21 : Representation de TALENs

CrispR/Cas9

La découverte la plus récente de nucléase est la découverte de CRISPR. Ce concept est adapté à partir du système immunitaire des bactéries et archées, qui reconnaissent une séquence spécifique de l'ADN viral et, pour le dégrader, utilise une endonucléase guidée par un ARN guide. Les fragments d'ADN de l'envahisseur sont intégrés comme des espaceurs dans le locus CRISPR. Les locus CRISPR produit les crRNAs (ARNs CRISPR) qui contient une séquence unique complémentaire à la séquence l'ADN cible (protospacer) et une séquence répété qui s'hybride a une petit séquence d'ARN qui s'appelé tracrRNA (ang : transactivated crRNA). L'hybride crRNA/tracrRNA guide les protéines CAS (ang : CRISPR-associated system) sur l'ADN et permet au complexe de cibler pour cliver cet ADN. Depuis 2013, il y avait plusieurs publications apportant l'utilisation de ces systèmes pour l'édition génomique sur des cellules humaines (Jinek et al, 2013, Mali et al, 2013). Le clivage à l'aide du système CRISPR/Cas9 dans des cellules humaines nécessite l'introduction d'un vecteur exprimant la CAS9 et les ARNs guides (crRNA et tracrRNA). Par une fusion de ces deux ARNs dans un ARN chimerique les chercheurs ont réussi à simplifier ce système (Cho et al, 2013). Pour cibler la CAS9 sur l'ADN cible il suffit de cloner une séquence de 20bp dans la région espacer dans le locus crRNA. Plusieurs versions des plasmides CRISPR/Cas9 sont disponibles auprès des services de partage de plasmides. En raison de la petite taille de l'ARN guide, il est possible de fournir plusieurs ARN guide au même temps pour obtenir un ciblage multiplex (Cong et al, 2013). Ding et al, ont comparé les CRISPRs et TALENs en ciblant la même région dans le génome des iPSC. Les Cas9 ont été plus performant dans la perturbation de gènes, l'introduction des gènes et du ciblage bi-allélique. Les chercheurs pensent que ceci est possible à cause du niveau d'expression plus élevé et la plus faible cytotoxicité de la protéine Cas9. Malgré sa polyvalence, le système / cas9 CRISPR présente plusieurs limites. Tout d'abord les sites ciblés par le Cas9 sont limitées par la nécessité d'un motif spécifique : $GN_{20}GG$. La reconnaissance de la cible par le complexe Cas9 nécessite la présence d'un motif de séquence spécifique immédiatement en aval de la séquence 20 nucléotidique cible par gARN et qui est le motif adjacent protospacer (PAM). La séquence PAM pour CRISPR-Cas9 dérivés de Streptococcus pyogenes est NGG. Ceci peut poser un problème pour cibler certains loci. Le deuxième limite de ce système est que le système tolère jusqu'à 6 « mismatchs » entre le crRNA et ADN cible. Ceci peut avoir comme conséquence un effet hors cible. En effet, une

CONFIDENTIEL

étude a montré que les nucléases CRISPR / Cas9 induisent des mutations au niveau des sites hors-cible avec un maximum de cinq « mismatchs » (Fu et al, 2013). Le système CRISPR/Cas9 a été converti en une nickase, qui provoque une coupure simple brin de l'ADN. Ainsi, dans ce sytème, deux nickases sont combinées pour cibler et couper un ADN donné. Cette approche réduit la mutagenèse sur des sites hors-cible (Cong et al, 2013).

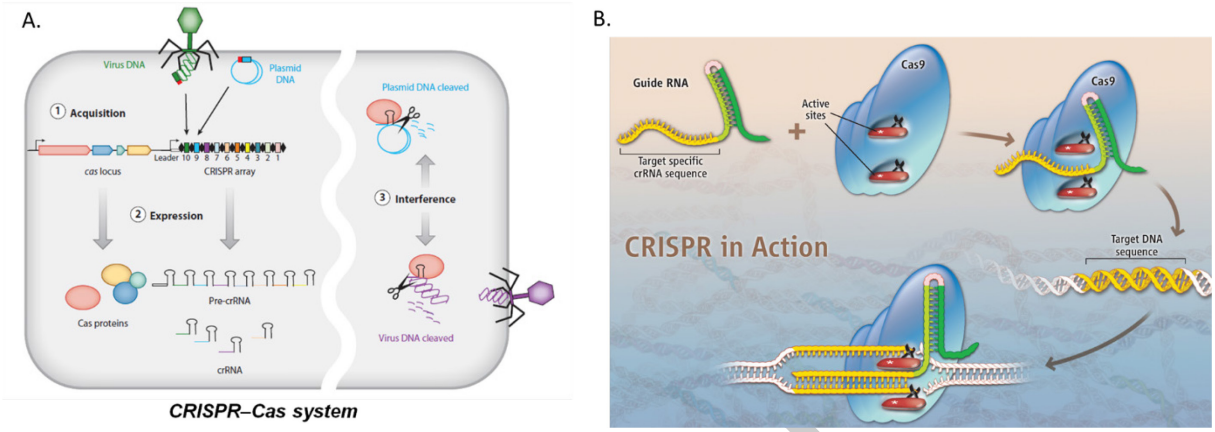


Figure 22 : Representation de CRISPR

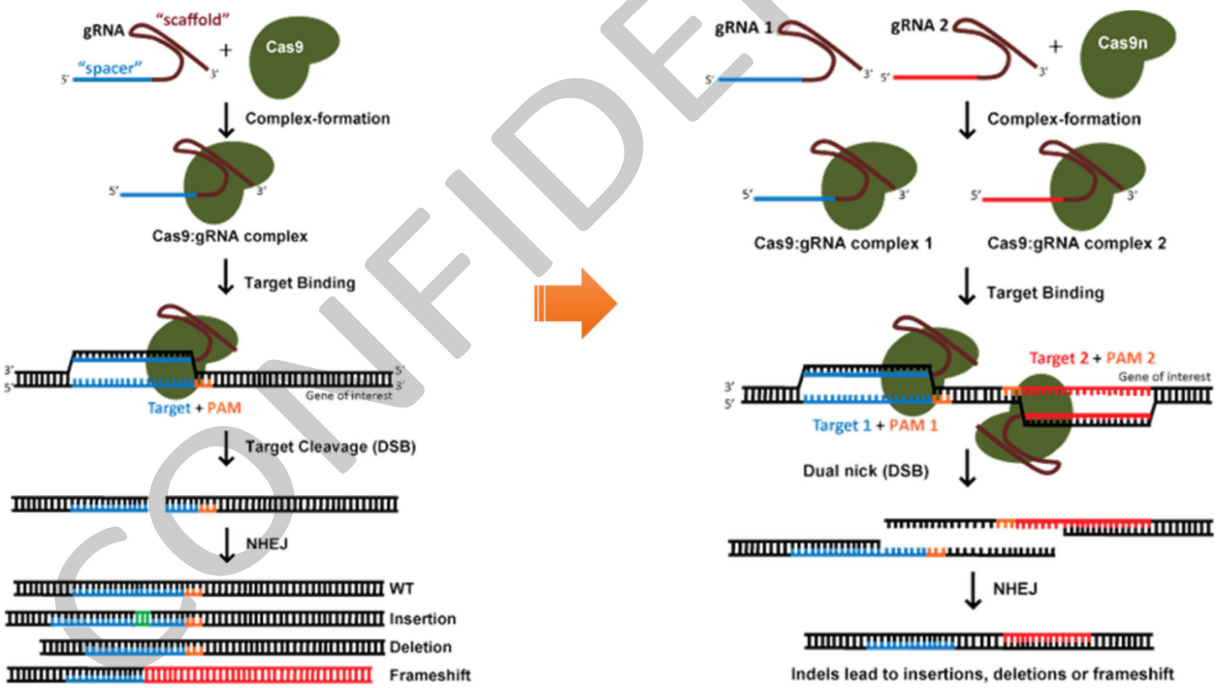


Figure 23: L'évolution de nucléases au nickases

CONFIDEN

CRISPRi et CRISPRa

La nucléase Cas9 peut être convertie en Cas9 désactivé (dCas9) pour une liaison à la protéine ADN-ARN programmable par mutation de deux résidus clés dans les domaines de nucléase. Ce système peut être utilisé pour activer ou désactiver des gènes.

CRISPRi

Dans le cas le plus simple, dCas9 peut réprimer la transcription en interférant stériquement avec l'initiation de la transcription ou l'élongation en étant ciblée sur le gène d'intérêt avec un guide ARN convenablement choisi (Jinek et al, 2012). La résistance à la répression est fortement dépendante de la position par rapport au promoteur de la cible, ainsi que la nature du promoteur lui-même. Chez les procaryotes, la répression jusqu'à 1000 x a été atteinte lors du ciblage dCas9 sur un brin d'ADN dans un promoteur ou sur un brin d'ADN en aval (Nielsen et al, 2014). Toutefois, dans des cellules eucaryotes la répression stérique est plus faible : jusqu'à 2x et 20x avec des promoteurs naturels de mammifère et des cellules de levure. Comme une exception notable, des promoteurs synthétiques spécialement conçus pour la répression directe par dCas9 peuvent être réprimées jusqu'à 100x dans des cellules de mammifères (Kiani et al, 2014). Potentiellementune répression plus forte dans des cellules eucaryotes peut être obtenue en fusionnant dCas9 avec les domaines répresseurs de la transcription. Une répression jusqu'à 50x a été réalisée à l'aide d'une fusion avec un répresseur transcriptionnel MXI1 dans la levure (Gilbert et al, 2013). Dans les cellules de mammifères, dCas9 est fusionné avec l'histone déméthylase LSD1 (Kearns et al, 2015). Ceci peut également être utilisé pour réprimer la transcription par des amplificateurs distaux. Le système le plus largement utilisé dCas9-KRAB fusion est responsable d'une liaison forte et hautement spécifique à la fois chez la levure et dans des cellules de mammifères (Zalatan et al, 2015).

CRISPRa

L'activation transcriptionnelle peut également être obtenue en convertissant la dCas9, les ARN guides, dans un système de trans-activation nommé CRISPRa. Dans E. coli, un activateur a été construit par fusion de la sous-unité ω de l'ARN polymérase native avec la dCas9 chez un hôte déficient pour sous-unité ω (Bikard et al, 2013). Cet activateur est modérément actif avec des promoteurs faibles (jusqu'à 23 x d'activation). Les activateurs le plus simples chez l'eucaryotes peuvent être conçus en fusionnant dCas9 avec VP64 (et ses variations), EDLL, TAD, p65, et les domaines $p300^{core}$ effectrices. Les niveaux d'activation en utilisant un seul ARN guide pour cibler un promoteur sont généralement faibles.

CONFIDENTIEL

Cependant, l'activation peut être augmentée de façon appropriée en utilisant avec plusieurs ARN guides pour cibler un promoteur. Cette observation a conduit à la construction d'activateurs qui contiennent plusieurs domaines effecteurs dCas9 par molécule. Tout d'abord, trois domaines d'activation différents (VP64, p65, et Rta) ont été fusionnés pour former un activateur appelé VPR (Chavez et al, 2015). Cet activateur était 1 à 2 x plus efficace qu'une simple fusion de VP64. En second lieu, dCas9 a été fusionné avec Suntag, un peptide contenant une matrice de plus de 10 répétitions en tandem. Chaque répétition a ensuite recruté un activateur VP64 de transcription fusionné à un fragment d'anticorps modifié génétiquement scFv. Un inconvénient potentiel de ce système est de nature encline à l'agrégation des scFv. Néanmoins, l'activation de la transcription d'environ 50 fois a été obtenue en utilisant cet activateur guidé par un seul ARN guides dans les cellules K562 humaines

CONFIDENTIEL

Objectifs de travail

CONFIDENTIEL

L'objectif général de ce travail de doctorat a été centré sur l'utilisation des cellules pluripotentes induites humaines dans la modélisation et l'évaluation thérapeutique des pathologies cardiaques. En effet et comme présenté dans l'introduction, depuis leur découverte en 2006, ces cellules offrent une opportunité sans précédent pour le développement de modèles cellulaires humains et spécifiques de patients pour l'étude des mécanismes physiopathologiques, l'évaluation de réponses pharmacologiques et la génération de cellules redifférenciées (ici en cardiomyocytes) pour des applications thérapeutiques cellulaires.

Cependant, ces trois applications partagent un obstacle commun qui est lié à la capacité de pouvoir différencier de manière efficace, reproductible et spécifique les cellules iPS en cardiomyocytes. Idéalement, ces cardiomyocytes dérivés d'iPS doivent présenter des caractéristiques appropriées à la question posée. Plusieurs protocoles de différenciation en cardiomyocytes ont été développés et proposés mais il existe peu de données sur la caractérisation fine des cardiomyocytes obtenus. Les cardiomyocytes dérivés d'iPSC sont utilisés pour modéliser de nombreuses maladies cardiovasculaires qui peuvent affecter différents types cellulaires cardiaques (à l'étage ventriculaire, nodal ou atrial) ou toucher différents éléments clés des cardiomyocytes (comme les canaux ioniques cardiaques, ou les protéines du sarcomère). Pourtant, on ne sait pas à l'heure actuelle si les protocoles de différentiation permettent de spécifier correctement une cellule iPS vers un sous-type de cardiomyocytes puis de modéliser correctement l'ensemble de ces éléments. Si le but ultime est de pouvoir remplacer les modèles animaux actuels par un modèle humain (et potentiellement spécifique de chaque patient), il est indispensable de pouvoir élucider les facteurs critiques qui régulent de manière fine la différenciation cardiaque. De plus, il apparaît important de pouvoir améliorer les protocoles actuels en proposant des approches plus ciblées au niveau moléculaire afin de mieux maitriser la différenciation de ces cellules.

Enfin, le développement récent des techniques d'ingénierie génomique permet la manipulation ciblée du génome des cellules iPS. Ceci offre des opportunités uniques pour la compréhension du rôle de mutations d'intérêt en permettant la correction ciblée de celles-ci dans des cellules iPS spécifiques de patients. Cependant, ces techniques offrent de nombreuses possibilités d'application, soit par la mise en place de différentes stratégies d'application (correction de mutation, délétion génique, insertion de mutations), soit par la diversification de leur fonction (nucléase mais aussi régulatrice d'expression génique).

Pendant ma première année de thèse j'ai eu l'opportunité d'être formé sur la culture des iPS et la reprogrammation au sein de l'institut iStem à Evry. J'ai ensuite eu la possibilité de partir en formation à l'hôpital Mount Sinaï de New York dans le centre de recherche cardiovasculaire (Directeur Roger

CONFIDENTIEL

Hajjar). Là-bas j'y ai appris la technique de différenciation en cardiomyocytes par la technique des EB et j'ai pu commencer les premières expériences de ma thèse.

Durant mon travail de doctorat, j'ai donc essayé de répondre aux questions suivantes :

I. Mon premier objectif a été de répondre à une première question essentielle : Existe-t-il des différences critiques dans les caractéristiques des cardiomyocytes obtenus par les différents protocoles de différenciation actuellement disponibles ? Dans la première partie de ma thèse j'ai comparé trois protocoles de différenciation qui sont typiques des protocoles actuellement utilisés par l'ensemble des équipes travaillant dans le domaine. Ces trois protocoles différents par la technique architecturale utilisée (aggrégation cellulaire vs. monocouche) et dans les composés pharmacologiques utilisés (ciblant différentes voies de signalisation régulés par Wnt). Notamment, dans l'objectif de pouvoir proposer des protocoles adaptés à la modélisation des cardiomyopathies, nous avons voulu savoir quel protocole permet d'obtenir des cardiomyocytes ayant un sarcomère mature comparable à celui de cardiomyocytes adultes. Nous nous sommes également interrogés sur l'importance de la modulation de la voie Wnt sur la différenciation et sur la maturation des IPSC en CM. J'ai tenté de répondre à ces questions dans la première partie de ma thèse et dans l'article intitulé : « Differential sarcomere maturation of human iPSC-derived cardiac myocytes in monolayer vs. aggregation-based differentiation protocols » (Article soumis, 1er auteur, European Heart Journal)

II. Mon second objectif a été de travailler sur la qualité de modélisation des cardiomyocytes dérivés d'iPSC pour les pathologies monogéniques mais aussi pour les pathologies multigéniques. En ce qui concerne les pathologies monogéniques, j'ai travaillé sur la mise en place et l'utilisation de techniques d'édition génomique, initialement par des Talens puis par la technique CRISPR/Cas9. Cette technique permet d'avoir notamment d'obtenir des cellules contrôles isogéniques des cellules transformées, ces dernières ayant donc le même fond génétique mais ne se différenciant que par la mutation causale corrigée. L'expertise développée ici m'a amené à pouvoir collaborer dans plusieurs projets qui sont en cours de finalisation. J'ai par exemple collaboré avec une l'équipe du centre de recherche de Saint Antoine sur la modélisation de laminopathies avec une réversion d'une mutation du gène LMNA par des Talens puis leur comparaison avec des cellules mutés et contrôle afin d'identifier leur rôle dans la sénescence prématurée de cellules endothéliales (données non publiées et non abordées dans ce manuscrit). J'ai aussi contribué à la mise en place de deux nouveaux projets qui utilisent des techniques d'édition génomique pour étudier les cardiomyopathies dilatées (ciblant BAG3) et les cardiomyopathies hypertrophiques (MYH7 et MYBPC3). Ce

CONFIDENTIEL

dernier projet a fait partie d'une collaboration avec un industriel pharmaceutique (données non publiées, non abordés dans ce manuscrit). La mise en place de ces projets m'a amené à développer une expertise dans l'utilisation de ces techniques et leur évolution. J'ai ainsi pu rapporter ceci dans une revue intitulée : « Generating patient-specific induced pluripotent stem cells- derived cardiomyocytes for the treatment of cardiac diseases » (Jeziorowska D. et al., Expert Opin. Biol. Ther. (2015) 15(10)). De plus, j'ai participé à une étude cherchant à démontrer qu'une librairie de cellules iPS permet de refléter in vitro la diversité des phénotypes observés in vivo. Nous nous sommes ici intéressés à la modélisation de la prolongation du QT long induit par médicament, une condition pathologique qui mime le QT long congénital (maladie monogénique affectant les canaux ioniques cardiaques). Ce syndrôme pharmacogénomique survient cependant chez quelques sujets prédisposés qui ne présentent pas d'anomalies de la repolarisation cardiaque à l'état basal mais présentent une réserve de repolarisation cardiaque limitée. Il a été proposé que cette limitation de la réserve de repolarisation soit liée à l'action simultanée de plusieurs polymorphismes génétiques constituant un fond génétique de susceptibilité. Dans ce travail, basé sur une librairie d'iPS provenant de sujets avec des réponses extrêmes à une même stimulation pharmacologique par Sotalol, nous avons pu démontrer que les cellules iPS sujets-spécifiques reproduisaient in vitro le phénotype observé in vivo. Cette étude est importante car elle est l'une des premières démonstrations que les cellules iPS peuvent être utilisées pour la modélisation de pathologies plus complexes et multigéniques (Article en révision, co-auteur, eLife).

III. Mon troisième objectif a enfin été d'améliorer le processus de différenciation in vitro en utilisant une approche moléculaire ciblée. Pour ceci, nous avons développé une technique de différentiation totalement originale basée sur un dérivé de CRISPR/Cas9. Ce travail a été réalisé avec Sébastien Dussaud, ingénieur d'étude de notre équipe. Nous avons utilisé un système d'édition génomique dérivé de CRISPR, qui a été dénué de sa fonction nucléase au profit d'une fonction activatrice de l'expression génique. Nous avons ainsi choisi d'utiliser le système CRISPRa, pour l'activation ciblée de gènes impliqués dans la cardiogenèse et ainsi induire une différenciation cardiaque des cellules iPS par une approche moléculaire. Ce travail très innovant et récent a fait l'objet d'un dépôt de brevet en Octobre 2016. Un article est en cours de rédaction et sera soumis d'ici le début de l'année 2017.

CONFIDENTIEL

Première partie : La maturation différentielle du sarcomère de cardiomyocytes dérivés d'iPSC par un protocole en monocouche vs un protocole basé sur l'agrégation

CONFIDENTIEL

Dorota Jeziorowska, Vincent Fontaine, Charlène Jouve, Eric Villard, Sébastien Dussaud, Magali Fradet, David Akbar, Valérie Letang Pauline Cervello, Jean-Michiel Itier, Marie-Pierre Pruniaux, Jean-Sébastien Hulot

Article soumis à European Heart Journal

Contexte : Les cellules souches pluripotentes (iPSC) représentent un modèle humain puissant pour étudier les maladies cardiaques *in vitro*, notamment les canalopathies et cardiomyopathies. Différents protocoles pour la différenciation cardiaque d'iPSC humains ont été proposés, soit sur la base de la formation du corps embryoïdes (3D) ou, plus récemment, sur la différenciation des monocouches (2D). En outre, différentes molécules pour induire les cellules en mésoderme sont utilisées afin de promouvoir la cardiogenèse. L'impact des différences architecturales et pharmacologiques sur les caractéristiques des cardiomyocytes générées (CM) selon ces différentes approches est cependant indéterminé.

Méthodes et résultats : Dans la méthode de différenciation en 3D, les iPSC ont été induites dans le mésoderme à l'aide de l'activine A et BMP4 pendant 2 jours et un inhibiteur de la voie Wnt (IWR-1) a été appliquée pendant 4,5 jours. Dans les méthodes 2D, les iPSC sont induites dans le mésoderme en inhibant la voie de la GSK pendant 3 jours, puis deux inhibiteurs différents de Wnt sont appliqués : IWR1 (inhibiteur de réponse de Wnt visant la voie canonique) ou IWP2 (inhibiteur de la production Wnt visant les voies canoniques et non-canoniques). Les protocoles ont été comparés à J25 (jour 25) de la différenciation. Pour définir le nombre de CM, le niveau d'expression de la troponine T (TNNT2) a été mesuré par FACS. La proportion de cellules TNNT2 + était plus élevée pour les deux protocoles 2D par rapport au protocole 3D. Dans les trois méthodes, les CM dérivés d'iPSC présentent des structures sarcomériques qui ont été évaluées par une double immunofluorescence contre la TNNT2 et la SA. Cependant, les protocoles en 2D ont généré des CM ayant des sarcomères plus grands et plus longs que ceux obtenus en 3D et plus proches des valeurs attendues dans un cardiomyocyte humain adulte mature. En outre, les analyses d'expression quantitative (qRT-PCR) révèlent des ratios de CTNi supérieur aux ratios de ssTNi ainsi qu'une meilleure expression des protéines du cycle calcique dans les protocoles 2D basés sur l'utilisation d'IWP2, ce qui indique une meilleure maturation du sarcomère. Nous avons ensuite réalisé une analyse d'imagerie cellulaire automatisé (coloration TNNT2 / DAPI) et nous avons constaté que le protocole 2D donne un état plus physiologique de binucléation par rapport à la 3D.

Conclusion : La différenciation des cardiomyocytes réalisée avec des protocoles en monocouche (2D) et l'utilisation d'IWP2 pour cibler les voies canoniques et non-canoniques de Wnt permettent d'obtenir un rendement plus élevé de cardiomyocytes, qui ont les caractéristiques nécessaires pour étudier les cardiomyopathies sarcomériques..

CONFIDENTIEL

CONFIDENTIEL

Differential sarcomere maturation of human iPSC-derived cardiac myocytes in monolayer vs. aggregation-based differentiation protocols

Dorota Jeziorowska[a,b], Vincent Fontaine[a,b], Charlène Jouve[a,b], Eric Villard[a], Sébastien Dussaud[a], Magali Fradet[b], David Akbar[c], Valérie Letang[d], Pauline Cervello[d], Jean-Michiel Itier[e], Marie-Pierre Pruniaux[d], Jean-Sébastien Hulot[a,b]

a. Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, AP-HP, INSERM, Pitié-Salpêtrière Hospital, F-75013 Paris, France
b. Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN), F-75013 Paris, France
c. Institut du Cerveau et de la Moelle épinière – ICM, CNRS UMR 7225 - Inserm U 1127 - UPMC-P6 UMR S 1127, Plateforme d'exploration cellulaire – CELIS-Culture Cellulaire, F-75013 Paris, France
d. Sanofi Recherche et Développement, F-91380 Chilly-Mazarin, France
e. Sanofi Recherche et Développement, F-94403 Vitry, France

Corresponding author:
Pr. Jean-Sebastien Hulot, MD PhD FESC FAHA
Jean-sebastien.hulot@upmc.fr
Tel: +33 1 40 77 96 81 Fax: +33 1 40 77 95 84

CONFIDENTIEL

ABSTRACT

Aims: Human induced pluripotent stem cells (iPSCs) represent a powerful human model to study cardiac disease *in vitro*, notably channelopathies and sarcomeric cardiomyopathies. Different protocols for cardiac differentiation of iPSCs have been proposed either based on embroid body formation (3D) or, more recently, on monolayer culture (2D). We performed a direct comparison of the characteristics of the derived cardiomyocytes (iPSC-CMs) between 3D and 2D differentiation protocols.

Methods and results: In the 3D differentiation method, iPSCs were induced into mesoderm with Activin A and BPM4 and a WNT inhibitor (IWR-1) was applied thereafter. In the 2D methods, iPSC were induced into mesoderm by inhibiting the GSK pathway for 3 days and then two different Wnt-inhibitors were compared: IWR-1 (inhibitor of Wnt response) or IWP-2 (inhibitor of Wnt production). The derived iPSC-CMs were compared on day 27±2 of differentiation. We firstly found that the level of Troponin T (*TNNT2*) expression measured by FACS was significantly higher for both 2D protocols as compared to the 3D protocol. In the three methods, iPSC-CM show sarcomeric structures. However, iPSC-CM generated in 2D protocols constantly displayed larger sarcomere lengths as compared to the 3D protocol. In addition, mRNA and protein analyses reveal higher cTNi to ssTNi ratios in the 2D protocol using IWP2 as compared to both other protocols, indicating a higher sarcomeric maturation.

Conclusion: Differentiation of cardiac myocytes with 2D monolayer-based protocols and the use of IWP2 allows the production of high yield of cardiac myocytes that have suitable characteristics to study sarcomeric cardiomyopathies.

Keywords: induced pluripotent stem cells, differentiation, cardiomyocytes, sarcomere, cardiomyopathies,

CONFIDENTIEL

Translational perspectives: Human induced pluripotent stem cells (iPSCs) represent a new way to model patient's disease in a dish, notably for cardiomyopathies. However, directing iPSC-cardiomyocytes to acquire physiological structure closed to the mature human cardiac tissue is a major obstacle. Here we show that the architectural and pharmacological characteristics of the protocol used to differentiate pluripotent stem cells into cardiomyocytes have significant impact on the quality of the generated cardiomyocytes. We notably report a protocol that is specifically associated with better sarcomere characteristics in terms of length and maturation. This protocol should now be considered when modeling sarcomere cardiomyopathies.

INTRODUCTION

The ability to generate human induced pluripotent stem cells (hiPSC) from patients and the capacity to differentiate these iPSCs into disease-relevant cell types represent a major breakthrough for human diseases modeling, preclinical evaluations and drug discovery. In the field of cardiology, the hiPSCs technology has been successfully used to model a number of inherited heart diseases, including monogenic channelopathies (notably long QT syndrome [1,2] and catecholaminergic polymorphic tachycardia[3]), cardiomyopathies due to mutations in mitochondrial (Friedreich's ataxia [4]) or desmosomal proteins (ARVC [5,6]) and other rare genetic disorders (LEOPARD[7], pompe disease[8], laminopathies[9]). On the other hand, hiPSC models of sarcomeric cardiomyopathies have been less reported so far [10–15]. Sarcomere mutations are associated with hypertrophic and dilated cardiomyopathies, two prevalent inherited cardiac disorders, and constitute one of the most common causes of cardiac sudden death and represent a major cause for cardiac transplantation.

It has indeed been generally considered that directing hiPSC-derived cardiomyocytes (hiPSC-CM) to acquire the requisite sub-cellular and cellular adult myocyte morphology as well as the appropriate protein content and organization was a major obstacle. All current protocols for cardiomyocyte differentiation are based on development signals in the embryo that first direct mesodermal fate, induce cardiogenic mesoderm and eventually result in the formation of bona fide cardiomyocytes. Initial protocols have been developed as aggregation-based methods in which undifferentiated cells are forced together as clumps (or embryoid bodies). More recently, monolayer-based methods, in which cells are seeded and differentiated on a culture substrate, have been developed as they achieve higher efficiency in terms of quantity of generated cardiomyocytes. In addition, different mesoderm differentiation-inducing molecules have been proposed. In the first days of differentiation, the use of bone morphogenetic protein (BMP) and Activin A, has been progressively replaced by the use of GSK-3 inhibitor, such as CHIR (REF). In addition, different studies have shown the critical role of Wnt signaling inhibition, which can be achieved with different molecules that can disrupt the pathway at different levels. Notably, some small molecules (such as IWR1) specifically block the canonical Wnt beta-catenin signaling pathway while others (such as IWP2) block the Wnt-mediated mechanisms irrespective of pathway mechanisms.

Consequently, different architectural (i.e., aggregation vs. monolayer) and pharmacological strategies can be adopted to generate hiPSC-CM. However, so far, there has been no direct comparison of methods for cardiomyocyte differentiation using the same lines in parallel experiments and assessing their quantitative efficiency but also the qualitative characteristics of generated hiPSC-CM. Here, we directly compared three different popular protocols to

CONFIDENTIEL

generate hiPSC-CM, the classical aggregation-based methods and two monolayer-based approaches differing by the Wnt inhibitor used. In order to limit selection biases in the evaluation, we set up a high-content cell imaging analysis system to systematically evaluate main cardiomyocytes characteristics. Our analyses demonstrate the strong influence of the differentiation method on the sarcomere formation and its maturation.

CONFIDENTIEL

METHODS

Human iPSC derivation

A total of four different iPS clones reprogrammed by different methods from skin fibroblasts originating from unrelated individuals were used (Figure S1). Firstly, we used a hiPSC line (named 31.3) derived from the skin biopsy of a volunteer as previously described[16] and provided by the Cardiovascular Research Center at Mount Sinai, New York, USA. Then, we generated three different new clones coming from two other donors. Human dermal fibroblasts (HDFa) were purchased from Life Technologies (# C-013-5C lot 1168064, Carlsbad, CA, USA) and Cell Application inc (# 106-05a lot 1392, San Diego, CA, USA) and were used to generate three other clones (clones 3.7 and 3.8 originating from HDFa purchased at Life Technologies and one other clone named 4.9 originating from HDFa purchased at Cell Application).

The fibroblasts were cultured with fibroblast growth medium containing DMEM medium (Life technologies, Carlsbad, CA, USA), 10% of FBS (Sigma Aldrich, Saint-Louis, MO, USA), 10ng/ml FGF-2 (R&DSystems, Minneapolis, MN, USA) and 1% penicillin-streptomycin (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Cell media were changed every 2 days. Reprogramming of fibroblasts into iPSCs was carried out using episomal vectors [17]. The HDFa were trypsined and counted, $6x10^5$ cells were electroporated with Nucleofector II (Lonza, Bale, Swiss) with 100µl of NHDF Nucleofector® Kit (Lonza Bale, Swiss) and 1µg/µl of each episomal vector (ref : 27077, 27078, 27080, Addgene, Cambridge, MA, USA). The cells were seeded (100,000 cells/well) in 6-well plates coated with matrigel matrix (Corning,New York, NY,USA) and cultured with fibroblast growth medium for 5 days. On Day 6 the medium was switched to reprogramming medium containing Essential 6 medium (Life technologies,Carlsbad, CA, USA) and 10ng/ml FGF2. The media was changed every 2 days. Around 25-30 days post-electroporation the iPS colonies appeared. The iPSCs colonies were picked and expanded in mTeSR1 (Stemcell technologies Vancouver, Canada) on matrigel matrix coated plates. The iPSCs were passed once a week manually using a Lynx Microscope (Vision Engineering, New Milford, CT, USA) and the culture medium was changed daily. The cells were cultivated in 5% CO_2, 5% O_2 at 37°C. The expression of pluripotency genes was verified by qPCR, immunostaining and alkaline phosphatase staining. In addition, a predictive qPCR analysis using TaqMan® hPSC Scorecard™ Assay was performed to assess the ability of each iPSC clone to differentiate into the three germ line lineages. The karyotype of the iPSC control cell line was normal.

CONFIDENTIEL

Aggregation cardiac differentiation – 3D protocol

iPSCs were passed and cultured 7 days before differentiation then incubated with PBS for 5 min, detached with a cell scraper and induced into mesoderm in suspension on low-attachment plates (Nunc # 056263) in mTeSR1 supplemented with BMP4 (10ng/ml, R&DSystems Minneapolis, MN, USA) and blebbistatin (5µM, Sigma-Aldrich Saint-Louis, MO, USA). After 24h, the medium was changed to 3D basal differentiation medium composed by StemPro34 SFM (Life technologies Carlsbad, CA, USA), ascorbic acid 50µg/ml (Sigma-Aldrich Saint-Louis, MO, USA) and 2mM GlutaMax-I (Life technologies Carlsbad, CA, USA) supplemented with BMP4 (10ng/ml) and Activin A (25ng/ml, R&DSystems Minneapolis, MN, USA) for 48h and then switched to 3D basal differentiation medium for another 36h. To induce the cells into cardiac progenitors, the small molecule IWR1 (Sigma-Aldrich Saint-Louis, MO, USA) was added to the media on day 4.5. The differentiated cells were maintained in 3D basal differentiation medium from day 8 until day 25. The cells were cultivated in 5% CO_2 at 37°C.[18]

Monolayer cardiac differentiation- 2D IWR1 and 2D IWP2

iPSCs were passed and cultured 7 days before differentiation. The cells were cultured in 2D differentiation medium composed of RPMI1640 medium (Life technologies Carlsbad, CA, USA) and B27 supplement minus insulin (Life technologies Carlsbad, CA, USA). The mesoderm progenitors were induced by supplementing the 2D differentiation medium with CHIR99021 (Abcam Cambridge, Great Britain) for 3 days. The cardiac progenitors were induced on day 3 with 2D differentiation medium supplemented with either a Wnt inhibitor IWR1 (Inhibitor of Wnt Reponse) or IWP2 (Inhibitor of Wnt Production) (Tocris, Bristol, USA) for 2 days. The differentiated cells were maintained in 2D differentiation medium from day 5 until day 25. The cells were cultivated in 5% CO_2 at 37°C.

Flow cytometry

On day 27±2 of the differentiation the cells were detached and dissociated with Detachment Kit 2 (Promocell Heidelberg,Germany) centrifuged 5 min at 200g then fixed with paraformaldehyde (4%) for 10min at RT (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) and permeabilized with 90% cold methanol for 15min at +4°C. The cells were washed 3 times with PBS and then stained with Anti-Cardiac Troponin T-APC, recombinant human IgG1, clone REA400 (MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Germany) or CTL-I APC, Monoclonal REA Control (I) antibody human, clone REA293 (MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Germany) diluted in PBS plus 0.1% Triton X-100 and 0.5% BSA for 45min at RT in the dark. The cells were washed and resuspended with PBS plus 0.5% BSA and collected on MACSQuant® Analyzer 10 (MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Germany) and analyzed using FlowJo.

CONFIDENTIEL

Automated cell imaging

On day 27±2 of differentiation the cells were detached and dissociated with a Detachment Kit 2 and cultured for 7 days on matrigel-coated plates. The cells were fixed in paraformaldehyde (4%) and permeabilized in blocking/permeabilization buffer (2% BSA, 0,5% Triton-X-100 in PBS) for 45 min then incubated overnight at +4°C with rabbit polyclonal anti-Cardiac Troponin T antibody (Ref #ab45932 Abcam Cambridge, Great Britain) diluted at 1:500 in blocking/permeabilization buffer. The cells were washed 3 time in PBS and incubated with 488-Alexa-conjugated secondary antibody (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and DAPI (SantaCruz, Dallas, Tx USA) both diluted at 1:1000 in blocking/permeabilization buffer for 45min at RT. The plates were scanned and analyzed using the Cell Insight CX5 Platform (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA USA). This automated cell imaging strategy was used to evaluate the morphology of the cells, their surface size as well as the number of nuclei per cell. To define the cell geometric morphology, a specific algorithm was defined using the CX5 cell imaging program (HCS studio) and based on the aspect ratios between two axis traced in the cells. A ratio below 1.5 was considered as indicating a rounded cell (called round) whereas ratios >1.5 indicated an elongated cells (called long).

Immunocytochemistry

iPSC were cultured on 4 Well Culture Slide (Corning,New York, NY, USA) for 3 days and then fixed in paraformaldehyde (4%) and permeabilized in blocking/permeabilization buffer (2% BSA, 0,5% Triton-X-100 in PBS) for 45 min then incubated overnight at +4°C with primary antibodies diluted in blocking/permeabilization buffer. The cells were washed 3 time in PBS and incubated with Alexa-conjugated secondary antibodies and DAPI both diluted at 1:1000 in blocking/permeabilization buffer for 45min at RT. The images were acquired using a Nikon Epifluorescence Microscope. The following antibodies were used: rabbit anti-Nanog (Cell Signaling-Ozyme, #4903S, 1:200), rabbit-Oct4 (Biovision, Cliniscience, #3576-100, 1:200), rabbit anti-Sox2 (Millipore, #AB5603, 1:200), mouse anti- Tra-1-60 (Millipore, #MAB4360, 1:100), mouse anti- Tra-1-81 (Millipore, #MAB4381, 1:100), mouse Anti-SSEA4 (Santa Cruz, #sc-21704, 1:100).

On day 27±2 of differentiation the cells were detached and dissociated with a Detachment Kit 2 and cultured for 7 days on matrigel-coated coverslips. The cells were fixed in paraformaldehyde and permeabilized in blocking/permeabilization buffer (2% BSA, 0,5% Triton-X-100 in PBS) for 45 min then incubated overnight at +4°C with mouse monoclonal anti-α-Actinin (Sarcomeric) antibody clone EA-53 (, #A7732 Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA) diluted at 1:1000 in blocking/permeabilization buffer. The cells were washed 3 time in PBS and incubated with 546- Alexa-conjugated secondary antibody (Life Technologies, # A10036) and

CONFIDENTIEL

DAPI (SantaCruz, Dallas, Tx USA) both diluted at 1:1000 in blocking/permeabilization buffer for 45min at RT. The images were acquired using DeltaVision Elite Deconvolution System (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) and analyzed using Fiji Software.

Western blot analysis

Cells and control cardiac and muscular tissues were lysed in RIPA buffer (150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS , 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, Protease inhibitors). Proteins were separated on 12% NuPAGE™ Novex™ 12% Bis-Tris Protein Gels,(Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) on denaturing conditions and transferred to a nitrocellulose membrane by iBlot System (Life technologies, Carlsbad, CA, USA). After blocking with 5% milk in PBS-Tween 0.1%, the membrane was incubated with primary antibodies overnight at 4°C. The following antibodies were used: mouse monoclonal anti-TNNI1 antibody clone 12F10 (Abcam, #ab8293), rabbit polyclonal anti-Cardiac Troponin I (Abcam, #ab47003), rabbit anti-GAPDH (Abcam #ab9485). The membrane then was then washed, incubated with an anti-mouse/rabbit peroxidase-conjugated secondary antibody (1:1,000, Cell Signaling) at room temperature for 1 h, and developed on ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare,Chicago, IL, USA). The quantification was performed using Fiji Software and normalized to GAPDH.

Quantitative RT-PCR

Relative gene expression was determined using a two-steps quantitative real-time PCR method. Total RNA was isolated on day 30 of differentiation with the PureLink® RNA Mini Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and reverse-transcribed using the Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).
Quantitative RT-PCR was performed with SYBR Select Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) on the LightCycler® 480 Instrument II (Roche Life Science, Bale, Swiss). Fold changes in gene expression were determined using the comparative CT method (□□Ct) with normalization to the housekeeping gene RPL32. All the primers used are listed in Table S1.

Patch clamping

Dissociated iPSC derived CMs differentiated during 25 days were directly seeded at the density of $7x10^5$ cells on glass coverslips (Corning, #354086)) coated with fibronectin and then incubated for 3 to 8 days in cultivation medium in a 5% CO_2 incubator at 37°C.
Patch-clamp experiments were performed at 37°C and the cardiomyocytes were continuously perfused with an external solution containing (in mM): 140 NaCl, 5 KCl, 1 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 10

CONFIDENTIEL

glucose, 10 HEPES. pH was set to 7.4 with NaOH 1M. The patch pipettes were pulled from thick-walled borosilicate glass capillaries (Harvard Apparatus, Edenbridge, UK) on a DMZ-universal electrode puller (Zeitz-Instruments GmbH). Electrode impedance was 4-6 MOhms when filled with an internal solution containing (in mM): 110 Kaspartate, 20 KCl, 1 $MgCl_2$, 0.1 Na-GTP, 5 Mg-ATP, 5 phosphocreatine, 1 EGTA, 10 HEPES. pH was adjusted to 7.2 with KOH 1M. Data were all corrected for liquid junction potentiel (15.4mV).

Ionic currents and action potentials were recorded on spontaneous beating CMs in the whole-cell configuration of the patch-clamp technique using digidata 1550/ Multiclamp 700B (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) for data amplification and acquisition. Data were acquired at 10KHz and low-pass filtered at 5KHz using Clampex software (pClamp 10.5, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

The same following protocol was applied to all CMs (n=427): upon seal formation and following patch membrane break, a 50ms test pulse from a holding potential of -80mV to 0mV was applied in voltage-clamp mode in order to record Na^+-current maximal amplitude. The patch was then switched to current-clamp mode and spontaneous action potentials (APs) were recorded for 1min at resting potential without injecting any current.

For currents and AP analysis, Clampfit software was used (pClamp 10.5, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Na^+-current density was obtained by normalizing Na^+-current maximal amplitude to the cell capacitance and expressed in pA/pF. For AP analysis, common electrophysiological characteristics such as action potential duration at 50% of repolarization (APD_{50}), action potential amplitude and resting membrane potential (RMP) were calculated.

Statistical analysis

All analyses were performed using Prism 6.0 (GraphPad). Continuous data are presented as Mean±SEM. Continuous variables were compared using 1-way analysis of variance followed by a Tukey's multiple comparison test. Exact tests were used for experiments with n<5. Chi square testing was used for frequency comparisons. A P-value ≤ 0.05 is considered significant. For comparison of mRNA expression, the values for the human LV tissue were reported as standard but were excluded from the statistical analysis where results obtained from the 3 different protocols were statistically compared.

CONFIDENTIEL

RESULTS

Yield of cardiomyocytes differentiation is higher with monolayer-based protocols

We investigated three differentiation protocols that differed in terms of architectural and pharmacological environment (Figure 1A). We firstly used a classical aggregation method of EB-formation (3D) where cardiomyocytes differentiation was initiated by enzymatic dissociation and formation of "cardiogenic" embryoid bodies (EBs). The mesoderm progenitors were induced by using a combination of BMP4 and Activin A. Blebbistatin was used to enhance the cell viability (day 0-4.5). Then, cardiogenesis was promoted by inhibiting the Wnt canonical pathway using a small molecule (IWR-1) which stabilizes the axin destruction complex (day 4.5-8) [18]. We also tested two different protocols where iPSC were firstly seeded as monolayer (2D) on matrigel 7 days before mesoderm induction. The induction was obtained by inhibiting the GSK pathway by the use of a small molecule (CHIR99021). Manipulation of the Wnt pathway to promote cardiogenesis was then achieved using two different pharmacological inhibitors: IWR1 (adapted from Burridge[19]) or IWP-2 protocol (adapted from Lian[20]) to inhibit Wnt production by inactivating Porcupine, a membrane bound O-acyltransferase responsible for activating Wnt proteins (Figure 1B).

We initially assessed the yield of cardiomyocyte generation using three different iPS clones (31.3, 3.7 and 3.8) that were differentiated at least 10 times. We firstly observed that differentiated cells started to beat at day 8 in all protocols (Figure 1C). However, analysis by flow cytometry of cTnT expression at 27 (±2) days (Figure 1D & 1E) revealed that the yield of differentiation was similar for the 3 iPSC clones (not shown) but significantly higher with both 2D protocols compared to the 3D protocol (14±11% vs 54±22% vs 54±20% for 3D, 2D-IWR1 and 2D-IWP2, $p<0.0001$).

High-content cell imaging

We then designed a high-content cell imaging analysis that performed a systematic screen of all cells in each culture well and then recognized all cells stained with cTNT and DAPI (Incellsight CX5 system, Thermofisher). This approach was primarily set to systematically quantify cell surface and measure nucleation per cell ~~to evaluate the maturation of the cells~~. We then developed a specific recognition tool to systematically determine the morphology of the analyzed cells (Figure 2A-B).

We firstly observed significant differences in cell surface of generated hiPSC-CM according to the methods. The analysis showed that the cells derived using the 2D protocols were significantly bigger than the cells derived with the 3D protocol (1967± 1545 μm^2 vs 2850±2807 μm^2 vs 2478±2390 μm^2 for 3D, 2D IWR1 and 2D IWP2, $p<0.0001$, Figure 2C). In addition,

CONFIDENTIEL

hiPSC-CM generated using the 2D-IWR1 protocol were also bigger with a higher dispersion of cell size as compared to the 2D-IWP2 protocol (Figure 2D). We were also able to quantify the number of nucleus per cell in the three protocols. We classified the cells as three groups: mononucleated cells, binucleated cells and cells with 3 or more nuclei (multinucleated). The percentage of each type of cells was calculated. The 2D protocols led to up to 20% of binucleated cells and about 60-65% of mononucleated cells. On the other hand, the aggregation-based 3D protocol was associated with a higher proportion of multinucleated cells (Figure 2E). Finally, the morphology of the generated cells was systematically analyzed by comparison with pre-established cell masks and aspect ratios. Figure 2B shows a typical example of the determination of cell morphology within a given field. We thereby defined two populations: round cells and long cells. We found that the 2D protocols were comparable between each other with 60% of round cells and 40% of long cells (Figure 2E). The 3D protocol however generated 40% of round cells and 60% of long cells. The round and long cells were analyzed for their size and their multinucleation (Figure S2 and S3) showing consistent results with the one observed on total cells. These high-throughput results show that the hiPSC-CM structure significantly depends on the differentiation protocol and suggest a higher inter-cell homogeneity in hiPSC-CM generated using the 2D-IWP2 protocol.

Measurement of the sarcomere length

The sarcomere length was then measured in hiPSC-CM stained with α sarcomeric actinin using a deconvolution microscope and Fiji software. Measurements were performed in a total of 45 cells for each studied protocol. A 20µm line was traced across the sarcomeres on myofibrils (Figure 3A). The sarcomere length of the cells generated with both 2D protocols were very similar, ranging from 1.6µm up to 2.2µm with an average size of 1.9µm (±0.17 SD) which was close to the sarcomere length of adult cardiomyocytes [21]. The sarcomere length of the cells derived by the 3D protocol was highly variable ranging from 1.3µm to 2.2µm and with a smaller average size (1.7µm± 0.21 SD) compared to the one observed with 2D protocols (Figure 3B). The sarcomere length was variable between generated cells but similar for the studied iPS clones.

Quantitation of sarcomere proteins

We then measured the mRNA and protein expression of the different troponins (Tni) isoforms as markers of sarcomere maturation. Cardiac Tni (cTni/*TNNI3*) is a key myofilament protein and is expressed only in adult cardiac muscle. The slow skeletal troponin I (ssTni/*TNNI1*) is another Tni isoform that is expressed in slow skeletal muscle fiber but also in the fetal cardiac muscle. The transition from ssTni to cTni has thus been proposed as a key adult maturation

CONFIDENTIEL

marker [22]. We firstly measured the expression of mRNA of both of Tni isoforms and found that cTni mRNA level was the highest in the cells derived with the 2D protocol using IWP2 as compared to the 2D-IWR1 and 3D protocols (Figure 4B). The cTni:ssTni ratio was however much lower than the one observed from RNA isolated from human LV tissue as a positive control. Both proteins were then quantified by Western Blot. We used human skeletal muscle tissue as a control for the presence of ssTNi and human LV tissue for the presence of cTnI. cTni was detected in hiPSC-CM generated with both 2D protocols but higher ssTNi expression was seen in cells generated with the 2D-IWR1 protocol (Figure 4C). Consequently, the cTni:ssTni protein ratio was significantly higher in hiPSC-CM derived from 2D-IWP2 protocol (Figure 4D),

Strikingly, cTni and ssTni proteins were not detected in hiPSC-CM derived using the 3D protocol. Similarly, the gene expression profiling of key calcium cycling proteins (Serca2a, PLN, CASQ, RYR2) showed a significantly lower expression in 3D-derived cardiomyocytes as compared to both 2D protocols (Supplemental Figure 4). Altogether, this suggests that monolayer-based differentiation protocols improve sarcomere formation but that the use of IWP-2 as a differentiation molecule is more efficient for sarcomere maturation.

Electrophysiological characteristics

As we found significant differences in sarcomere formation and maturation, we asked whether differentiation protocols also influenced that electrophysiogical characteristics of generated cardiomyocytes. We firstly analyzed gene expression of main cardiac ion channels (Supplemental figure 5A). As compared to 3D protocol, we found that *SCN5A, CACNA1, KCNQ1* and *HCN4* were more expressed in cardiomyocytes generated with the monolayer-based protocols while *KCNH2* and *HCN2* expression were similar. Of note, expression levels of cardiac ion channels were of the same magnitude than the one observed in human LV cardiomyocytes, while the expression of sarcomeric and calcium cycling genes were globally much lower.

Finally, action potentials were recorded in cardiomyocytes generated from the three protocols but did not show significant differences between protocols (Supplemental Figure 5B).

CONFIDENTIEL

DISCUSSION

The cardiomyocytes derived from human iPSC represent a novel cellular platform for modelling cardiovascular diseases. Since the discovery of iPSC in 2006 many methods to differentiate them into cardiomyocytes were established and progressively improved. Multiple research laboratories and projects have adopted the iPSC technology and for pragmatic reasons usually select one differentiation protocol into cardiomyocytes. However, the direct comparison of the achievements between protocols has not been performed so far.

In this study we have compared three protocols that represent the most frequent methods currently used to generate iPSC-CM. These protocols differ by multiples ways in term of architectural and pharmacological environment. In the 3D protocol [18] the induction into mesoderm is obtained by the activation of the BMP and Nodal pathway which activates the transcription factors of cardiac progenitor cells like GATA4 and NKX2.5. This protocol originates from the seminal report from Keller's group and has been largely used in different research projects to model cardiomyopathies. Our results show that this protocol provides efficient differentiation at the electrophysiological level but not at the sarcomere level. In this study, the cardiac progenitors were induced by inhibiting the Axin complex with IWR-1, which differs from the original protocol but has been proposed to provide more reproductible differentiations[18]. In the 2D protocols, the mesoderm was induced by inhibiting the GSK pathway. The biphasic role of the Wnt/β catenin pathway is known in cardiogenesis.[23] Wnt/β-catenin signaling promotes cardiac differentiation at early developmental stages and inhibits it later. Adding an exogenous Wnt3a in the early stage of differentiation enhances cardiogenesis[24]. The molecule CHIR99021 is a selective inhibitor of GSK3. It promotes self-renewal by stabilizing β catenin and activating the Wnt/ β catenin signaling[25]. The activation of the Wnt/ β catenin signaling promotes the early cardiac transcription factors.

We then tested two different pharmacological ways to induce cardiac progenitor cells using monolayer-based approaches as more recently proposed [19,20]. We used two different Wnt inhibitors. In the IWR-1 protocol [19] we specifically inhibited canonical Wnt beta catenin signaling pathway by using molecule that stabilizes the Axin destruction complex thus leading to beta-catenin degradation. On the other hand in the IWP-2 protocol [20] the inhibition of Wnt is obtained by blocking the production of Wnt and its secretion and therefore blocks both the canonical and non-canonical pathways. It was revealed that the endogenous Wnt activity must be also blocked to enhance the transcription of cardiac factors[26]. Strinkingly, we found a significant impact of IWP-2 on the sarcomere maturation as compared to IWR-1, as assessed by a lower ssTni and a higher cTni expression, thus suggesting an involvement of the non-

CONFIDENTIEL

canonical Wnt pathways in this process. The molecules from the IWP family block PORCN. PORCN is a membrane-boundO-acyltransferase and it catalyzes the palmitoylation of the serine corresponding to Ser-209 of WNT3A [27]. It is unclear why IWP-2 drives a better sarcomere maturation but it could be related to differences in downstream targets of PORCN or to an unknown influence of Wnt secretion. It was recently reported that the Wnt canonical pathway is critical in the early stage of cardiogenesis through mesoderm induction but that the noncanonical Wnt pathways have a greater role role in late stages of cardiomyocytes differentiation[28]. The non-canonical Wnt pathway involves the Wnt/Calcium signal transduction cascade that regulates the activities of Calcineurin/Nfat and of CaMKII, two critical pathways for cardiomyocyte growth and regulation of sarcomere functionality. Our results highlight the involvement of Wnt non canonical pathways in functional cardiomyocytes differentiation and suggests the need to achieve transitory blocking of the pathway for a better sarcomere formation in iPSC-derived cardiomyocytes.

There are only five reports of iPSC models of sarcomeric cardiomyopathies. In the first four reports [11,12,15,29]the cardiomyocytes were derived using the 3D method. We have observed in our study that this method did not achieve the highest level of sarcomere formation and maturation. In another study published in 2015 the titin mutation was studied using 2D protocol and also a microtissue platform (CMT)[10]. The use of this microtissue platform can help to study the contractility of the cells and their organization. New methods of tissue engineering were reported in the past years[30]. Different matrix scaffolds were used to obtain the most representative and reproductive tissue. Engineered heart Tissues (EHT) are a powerful tool to model cardiovascular diseases and can strongly influence the characteristics of the generated cardiomyocytes as measured in our study. However, the constitution of EHT also relies on the method of cardiomyocytes differentiation that is used before reseeding the cells in the tissue. Consequently, our results might also be of strong importance to improve the quality and throughput of tissue engineering.

It is generally viewed that hiPSC-CMs are immature as they do not display the requisite sub-cellular, cellular and tissue-level adult myocytes morphology and the sarcomeric protein content and organization. In this study we have observed that the use of IWP-2 provides cardiomyocytes with a more mature sarcomere, albeit still largely different from the one observed in adult isolated cardiomyocytes from human hearts. Our results however highlight the lack of current differentiation protocols to achieve this goal.
Finally, to allow for an unbiased evaluation of cell characteristics between protocols, we also designed a new method of high throughput cell imaging for iPSC-derived cardiomyocytes. This

CONFIDENTIEL

tool represent an ideal platform to study and compare a large number of cardiomyocytes in a single acquisition step. We based our method on typical cardiomyocyte staining to simply identify these cells. Using this method, we were especially able to efficiently measure cell sizes in a large number of cells and estimate cell size distribution between the protocols, thus better characterizing cell heterogeneity in response to a given protocol. In addition, other parameters including the number of nuclei and cell morphology can be acquired at the same time. These two parameters have been proposed as maturation markers of iPSC-derived cardiomyocytes. Adult human cardiomyocytes typically present as rod and elongated cells whereas immature cardiomyocytes are more rounded. Similarly, around 25% of adult cardiomyocytes are multinucleated while immature cardiomyocytes are mononucleated. With this approach, we delineate the monolayer-based protocols as providing more mature cells as compared to the aggregation based protocol.

In conclusion, by directly comparing methods for cardiomyocytes generation from different iPSC lines and using high-screening tools, we found that differentiation of cardiac myocytes with 2D monolayer-based protocols and the use of the Wnt inhibitor IWP-2 allows the production of higher yield of cardiac myocytes that have more suitable characteristics to study sarcomeric cardiomyopathies.

ACKNOWLEDGEMENTS

In our research we used automated fluorescence imaging workstations (Cellinsight) from the CELIS facility at ICM which was supported by program Investissements d'Avenir [ANR-10-IAIHU-06] and Translational Research Infrastructure for Biotherapies in Neurosciences [ANR-11-INBS-0011-NeurATRIS] and Macquant Cytometer from the Flow cytometry Facility Core at ICAN which was supported by program Investissements d'Avenir. We thank Alice Raffennes-Devillers and Véronique Briand (Sanofi RD) for their technical support.

CONFIDENTIEL

REFERENCES

1. Lahti AL, Kujala VJ, Chapman H, Koivisto A, Pekkanen-mattila M, Kerkelä E, Hyttinen J, Kontula K, Swan H, Conklin BR, Yamanaka S, Silvennoinen O. Model for long QT syndrome type 2 using human iPS cells demonstrates arrhythmogenic characteristics in cell culture. 2012;**230**:220–230.
2. Ma D, Wei H, Zhao Y, Lu J, Li G, Sahib NBE, Tan TH, Wong KY, Shim W, Wong P, Cook SA, Liew R. Modeling type 3 long QT syndrome with cardiomyocytes derived from patient-specific induced pluripotent stem cells. *Int J Cardiol* Elsevier Ireland Ltd; 2013;**168**:5277–5286.
3. Itzhaki I, Maizels L, Huber I, Gepstein A, Arbel G, Caspi O, Miller L, Belhassen B, Nof E, Glikson M, Gepstein L. Modeling of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia with patient-specific human-induced pluripotent stem cells. *J Am Coll Cardiol* Elsevier Inc.; 2012;**60**:990–1000.
4. Hick A, Wattenhofer-donzé M, Chintawar S, Tropel P, Simard JP, Vaucamps N, Gall D, Lambot L, André C, Reutenauer L, Rai M, Teletin M, Messaddeq N, Schiffmann SN, Viville S, Pearson CE. Neurons and cardiomyocytes derived from induced pluripotent stem cells as a model for mitochondrial defects in Friedreich ' s ataxia. 2013;**621**:608–621.
5. Caspi O, Huber I, Gepstein A, Arbel G, Maizels L, Boulos M, Gepstein L. Modeling of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with human induced pluripotent stem cells. *Circ Cardiovasc Genet* 2013;**6**:557–568.
6. Ma D, Wei H, Lu J, Ho S, Zhang G, Sun X, Oh Y, Tan SH, Ng ML, Shim W, Wong P, Liew R. Generation of patient-specific induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes as a cellular model of arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Eur Heart J* 2013;**34**:1122–1133.
7. Carvajal-vergara X, Sevilla A, Souza SLD, Ang Y, Schaniel C, Lee D, Yang L, Kaplan AD, Adler ED, Rozov R, Ge Y, Cohen N, Edelmann LJ, Chang B, Waghray A, Su J, Pardo S, Lichtenbelt KD, Tartaglia M, Gelb BD, Lemischka IR. Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome. *Nature* Nature Publishing Group; 2010;**465**:808–812.
8. Huang HP, Chen PH, Hwu WL, Chuang CY, Chien YH, Stone L, Chien CL, Li LT, Chiang SC, Chen HF, Ho HN, Chen CH, Kuo HC. Human Pompe disease-induced pluripotent stem cells for pathogenesis modeling, drug testing and disease marker identification. *Hum Mol Genet* 2011;**20**:4851–4864.
9. Siu D, Chan Y, Siu CW, Lee YK, Chung J, Ho Y, Lai WH, Chan YC. Modeling of lamin A / C mutation premature cardiac aging using patient-specific induced pluripotent stem

CONFIDENTIEL

cells Modeling of lamin A / C mutation premature cardiac aging using patient - specific induced pluripotent stem cells. 2012;

10. Hinson JT, Chopra A, Nafissi N, Polacheck WJ, Craig C, Swist S, Gorham J, Yang L, Schafer S, Calvin C, Haghighi A, Homsy J, Hubner N, Church G, Cook A, Linke WA, Chen CS, Seidman JG. Titin Mutations in iPS cells Define Sarcomere Insufficiency as a Cause of Dilated Cardiomyopathy. *Science (80-)* 2015;**349**:982–986.
11. Sun N, Yazawa M, Liu J, Han L, Sanchez-Freire V, Abilez OJ, Navarrete EG, Hu S, Wang L, Lee A, Pavlovic A, Lin S, Chen R, Hajjar RJ, Snyder MP, Dolmetsch RE, Butte MJ, Ashley E a., Longaker MT, Robbins RC, Wu JC. Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells as a Model for Familial Dilated Cardiomyopathy. *Sci Transl Med* 2012;**4**:130ra47-130ra47.
12. Lan F, Lee AS, Liang P, Sanchez-Freire V, Nguyen PK, Wang L, Han L, Yen M, Wang Y, Sun N, Abilez OJ, Hu S, Ebert AD, Navarrete EG, Simmons CS, Wheeler M, Pruitt B, Lewis R, Yamaguchi Y, Ashley EA, Bers DM, Robbins RC, Longaker MT, Wu JC. Abnormal calcium handling properties underlie familial hypertrophic cardiomyopathy pathology in patient-specific induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* Elsevier Inc.; 2013;**12**:101–113.
13. Karakikes I, Stillitano F, Nonnenmacher M, Tzimas C, Sanoudou D, Termglinchan V, Kong CW, Rushing S, Hansen J, Ceholski D, Kolokathis F, Kremastinos D, Katoulis A, Ren L, Cohen N, Gho JM, Tsiapras D, Vink A, Wu JC, Asselbergs FW, Li RA, Hulot JS, Kranias EG, Hajjar RJ. Correction of human phospholamban R14del mutation associated with cardiomyopathy using targeted nucleases and combination therapy. *Nat Commun* 2015;**6**:6955.
14. Hwang HS, Kryshtal DO, Feaster TK, Sánchez-Freire V, Zhang J, Kamp TJ, Hong CC, Wu JC, Knollmann BC. Comparable Calcium Handling Of Human iPSC-derived Cardiomyocytes Generated By Multiple Laboratories. *J Mol Cell Cardiol* Elsevier B.V.; 2015;**85**:79–88.
15. Lu Han, Yang Li, Jason Tchao, Aaron D. Kaplan, Bo Lin, You Li, Jocelyn Mich-Basso, Agnieszka Lis, Narmeen Hassan, Barry London, Glenna C.L. Bett, Kimimasa Tobita, Randall L. Rasmusson LY. Study Familial Hypertrophic Cardiomyopathy Using Patient Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Cardiovasc Res Adv* 2014;
16. Rapti K, Stillitano F, Karakikes I, Nonnenmacher M, Weber T, Hulot J-S, Hajjar RJ. Effectiveness of gene delivery systems for pluripotent and differentiated cells. *Mol Ther — Methods Clin Dev* 2015;**2**:14067.
17. Okita K, Yamakawa T, Matsumura Y, Sato Y, Amano N, Watanabe A, Goshima N, Yamanaka S. An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced

CONFIDENTIEL

pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells. *Stem Cells* 2013;**31**:458–466.

18. Karakikes I, Senyei GD, Hansen J, Kong CW, Azeloglu EU, Stillitano F, Lieu DK, Wang J, Ren L, Hulot JS, Iyengar R, Li RA, Hajjar RJ. Small molecule-mediated directed differentiation of human embryonic stem cells toward ventricular cardiomyocytes. *Stem Cells TranslMed* 2014;**3**:18–31.
19. Burridge PW, Matsa E, Shukla P, Lin ZC, Churko JM, Ebert AD, Lan F, Diecke S, Huber B, Mordwinkin NM, Plews JR, Abilez OJ, Cui B, Gold JD, Wu JC. Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat Methods* 2014;**11**:855–860.
20. Lian X, Zhang J, Azarin SM, Zhu K, Hazeltine LB, Bao X, Hsiao C, Kamp TJ, Palecek SP. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/β-catenin signaling under fully defined conditions. *Nat Protoc* 2013;**8**:162–175.
21. Lundy SD, Zhu W-Z, Regnier M, Laflamme MA. Structural and functional maturation of cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev* 2013;**22**:1991–2002.
22. Bedada FB, Chan SSK, Metzger SK, Zhang L, Zhang J, Garry DJ, Kamp TJ, Kyba M, Metzger JM. Acquisition of a quantitative, stoichiometrically conserved ratiometric marker of maturation status in stem cell-derived cardiac myocytes. *Stem Cell Reports* 2014;**3**:594–605.
23. Ueno S, Weidinger G, Osugi T, Kohn AD, Golob JL, Pabon L, Reinecke H, Moon RT, Murry CE. Biphasic role for Wnt/beta-catenin signaling in cardiac specification in zebrafish and embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;**104**:9685–9690.
24. Paige SL, Osugi T, Afanasiev OK, Pabon L, Reinecke H, Murry CE. Endogenous wnt/??-Catenin signaling is required for cardiac differentiation in human embryonic stem cells. *PLoS One* 2010;**5**.
25. Wu Y, Ai Z, Yao K, Cao L, Du J, Shi X, Guo Z, Zhang Y. CHIR99021 promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells by modulation of protein-encoding gene and long intergenic non-coding RNA expression. *Exp Cell Res* Elsevier; 2013;**319**:2684–2699.
26. Willems E, Spiering S, Davidovics H, Lanier M, Xia Z, Dawson M, Cashman J, Mercola M. Small-molecule inhibitors of the Wnt pathway potently promote cardiomyocytes from human embryonic stem cell-derived mesoderm. *Circ Res* 2011;**109**:360–364.
27. Tanaka K, Kitagawa Y, Kadowaki T. Misexpression of mouse porcupine isoforms modulates the differentiation of P19 embryonic carcinoma cells. *Cell Biol Int* 2003;**27**:549–557.

CONFIDENTIEL

28. Mazzotta S, Neves C, Bonner RJ, Bernardo AS, Docherty K, Hoppler S. Distinctive Roles of Canonical and Noncanonical Wnt Signaling in Human Embryonic Cardiomyocyte Development. *Stem Cell Reports* The Authors; 2016;**7**:764–776.
29. Tanaka A, Yuasa S, Mearini G, Egashira T, Seki T, Kodaira M, Kusumoto D, Kuroda Y, Okata S, Suzuki T, Inohara T, Arimura T, Makino S, Kimura K, Kimura A, Furukawa T, Carrier L, Node K, Fukuda K. Endothelin-1 induces myofibrillar disarray and contractile vector variability in hypertrophic cardiomyopathy-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *J Am Heart Assoc* 2014;**3**.
30. Hirt MN, Hansen A, Eschenhagen T. Cardiac tissue engineering : State of the art. *Circ Res* 2014;**114**:354–367.

CONFIDENTIEL

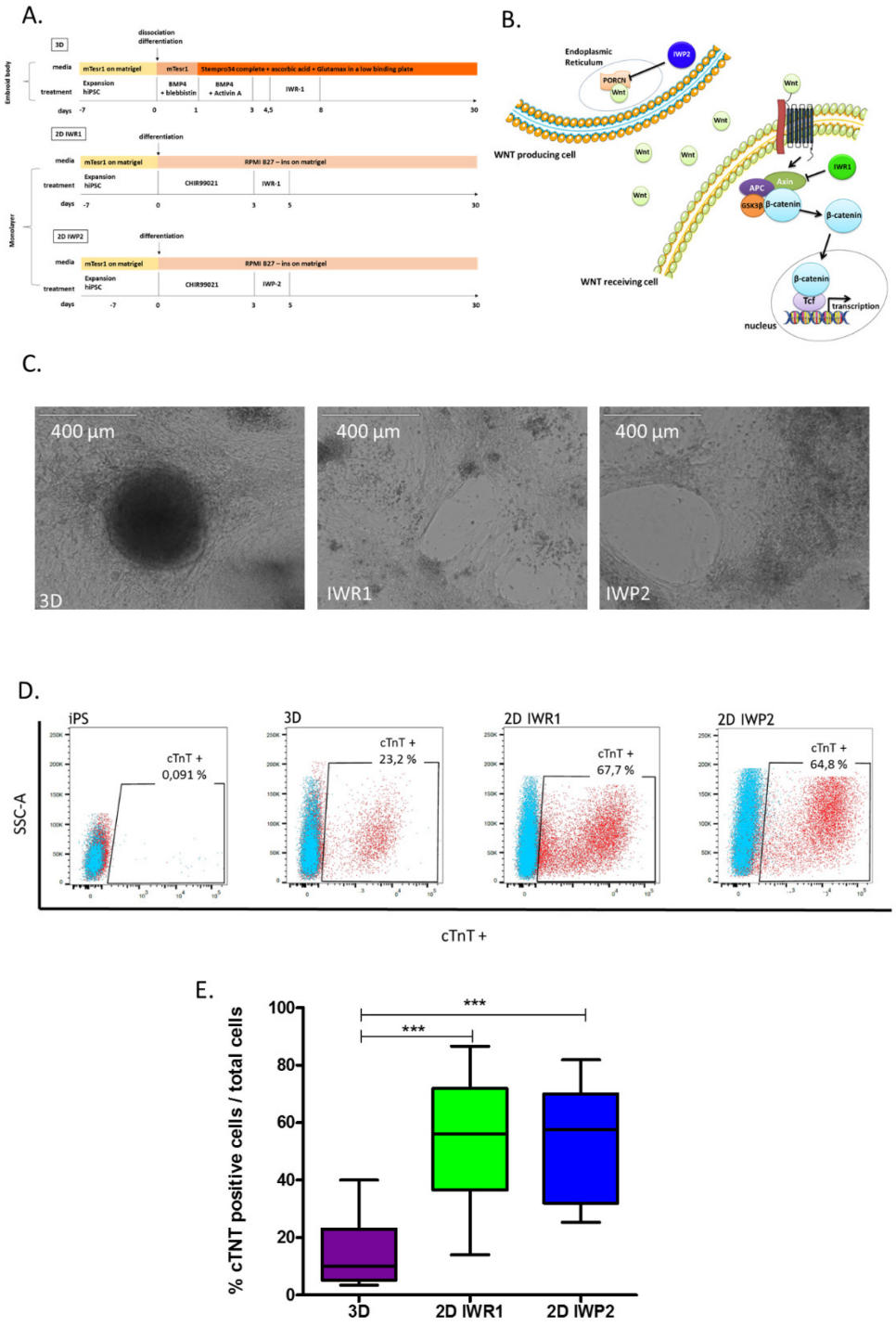


Figure 1: Comparison of protocols 2D vs 3D. A. Schematic representation of differentiation protocols **B.** Schematic overview of the canonical Wnt pathway and the targets of the Wnt inhibitors used. **C** Aspect of differentiated iPSCs on day 30 in transmitted light. **D.** Troponin expression at day 27±2 analyzed by flow cytometry. Typical flow cytometry plots show negative IgG control in blue and cTnT+ cells in red **E.** Quantification of cardiac troponin T expression measured by flow cytometry in the three compared protocols. N=11 to 16 differentiations with 3 different clones. *** $p<0.001$.

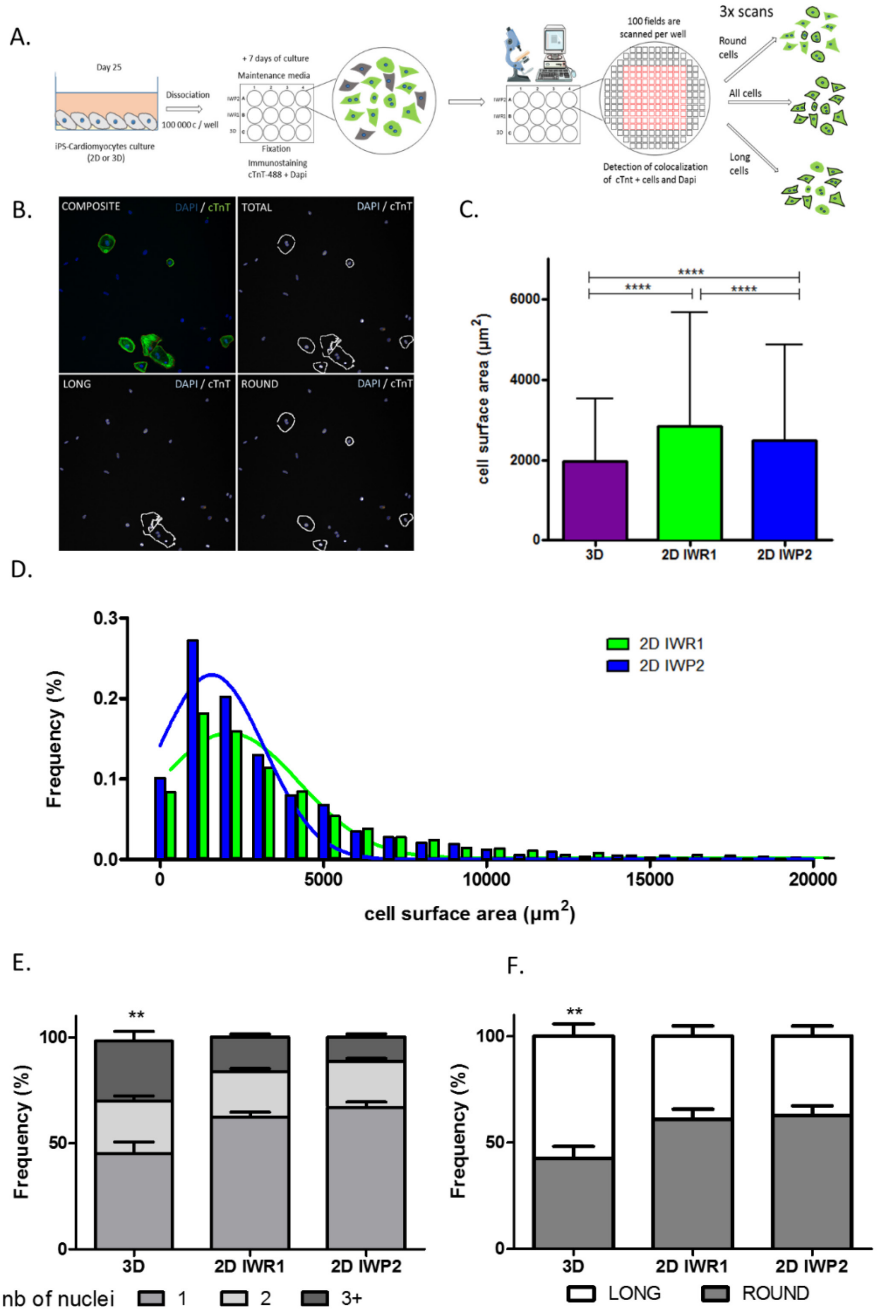


Figure 2: High content cell imaging to analyze the cell size, nucleation and morphology using the cTnT and Dapi staining. A. Design of the automated cellular imaging high content analysis **B.** Composite image of the detection of cTnT+ and Dapi+ cells. Detection setting for total, round and long cells **C.** Cell surface comparison at day 27±2. N>1500 cells from at least three different differentiations with three different iPS clones,**** $p<0.0001$. **D**. Distribution of cell surface area in generated cTNT+ cells from the 2D IWR1 (green) and 2D IWP2 (blue). **E.** Frequency of number of nuclei in the total cells for each protocol **F.** Distribution of round and long cells obtained with each protocols.** $p<0.01$.

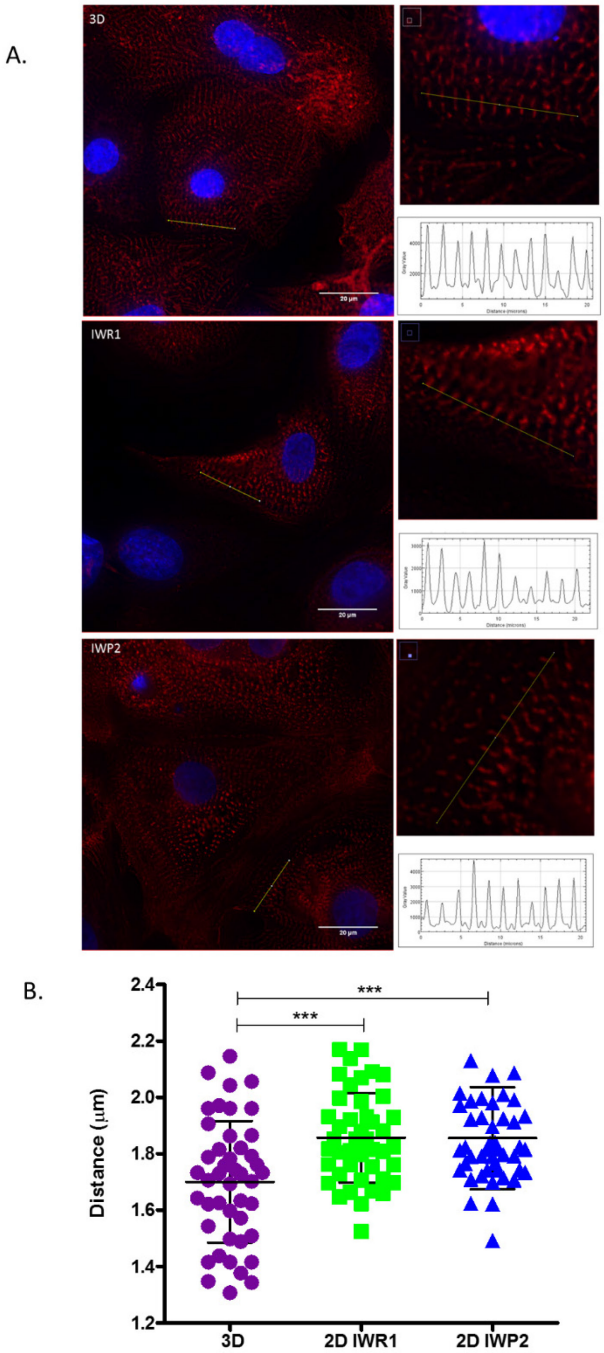


Figure 3: Measurement of the sarcomere length. A. Deconvolution microscopy imaging. α-actinin is stained in red and nucleus in bleu. The sarcomere was measured by tracing a line of 20µm by Fiji. The intensity of fluorescence across the line was translated into longitudinal plots. **B.** Distribution of the sarcomere sizes. N=45 cells for each protocol, from three different differentiations and three different iPSC clones. ***p<0.001.

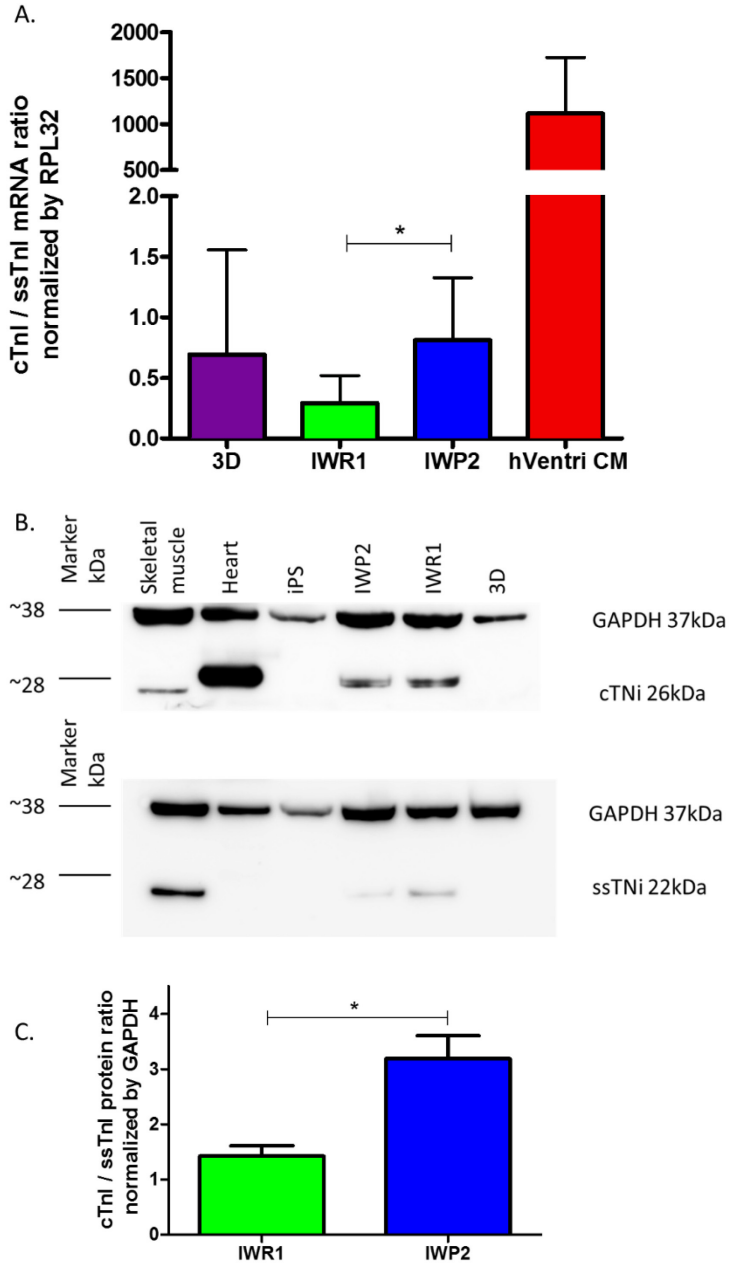


Figure 4: Quantification of sarcomere mRNA and proteins. A. The mRNA expression of cTNi and ssTNi was quantified by quantitative RT PCR. (n=8 to 12 from four iPSC clones, $p<0.05$ Kruskal-Wallis and Dunn's Multiple Comparison Test, hVentriCM was excluded from statistical analysis) **B.** Typical western blot of cTNi and ssTNi proteins **C.** Quantification of the ratio of cTNi/GAPDH on ssTNi/GAPDH proteins. N=4 iPS clones, $p<0.05$, Mann-Whitney test.

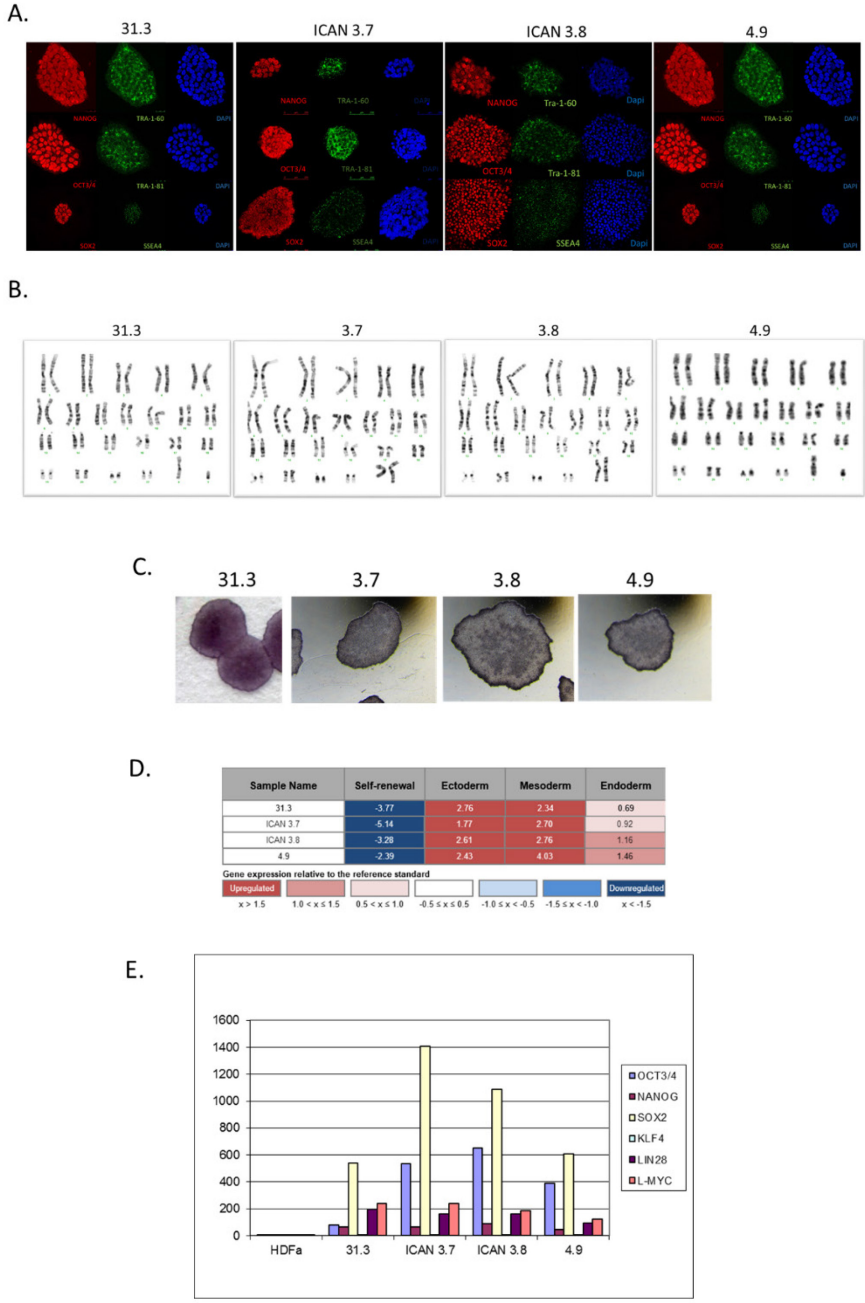


Figure S1: Pluripotency of iPS control cell lines A. Immunostaining of iPS with antibodies directed against the pluripotency markers NANOG, OCT4, SOX2 (red), TRA1-60 TRA1-81 and SSEA3/4 (green). Nuclei were stained with DAPI (blue). **B**. Normal karyotyping of cell lines **C.** Positive alkaline phosphatase staining **D.** RT-PCR showing the expression of pluripotency genes compared human dermal fibroblasts and control iPS cell line. **E.** Scorecards™ analysis assessing pluripotency and trilineage differentiation.

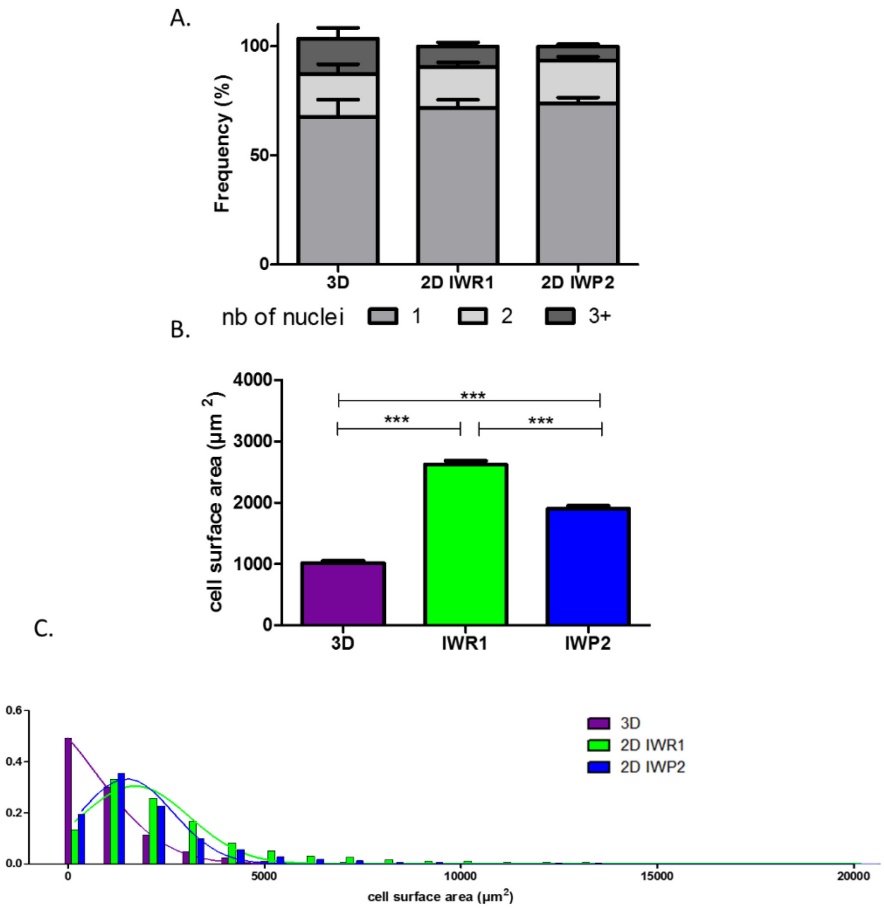


Figure S2 related to Figure 2: Automated cellular imaging to analyze the cell size and nucleation of the round cells population. A. Frequency of number of nuclei in the round cells for each protocols **B.** Cell size comparison in the round population **C.** Cell size distribution in the 2D protocols in the round population.

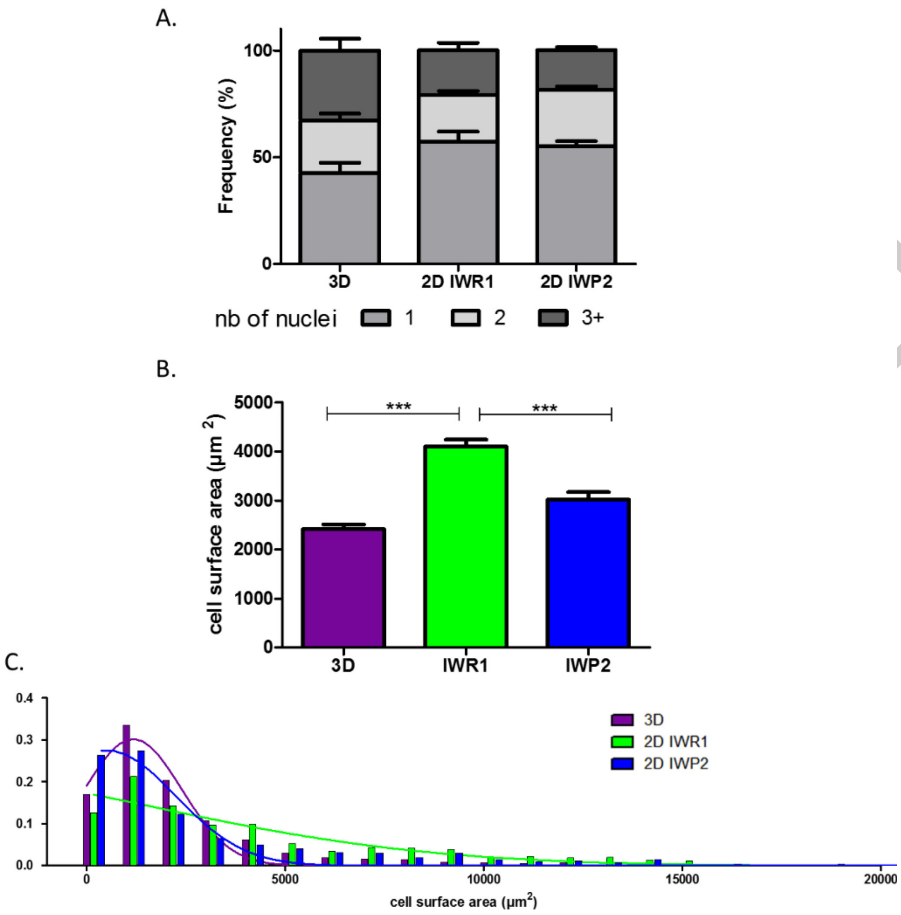


Figure S3 related to Figure 2: Automated cellular imaging to analyze the cell size and nucleation of the long cells population. A. Frequency of number of nuclei in the long cells for each protocols **B.** Cell size comparison in the long cell population **C.** Cell size distribution in the 2D protocols in the long population.

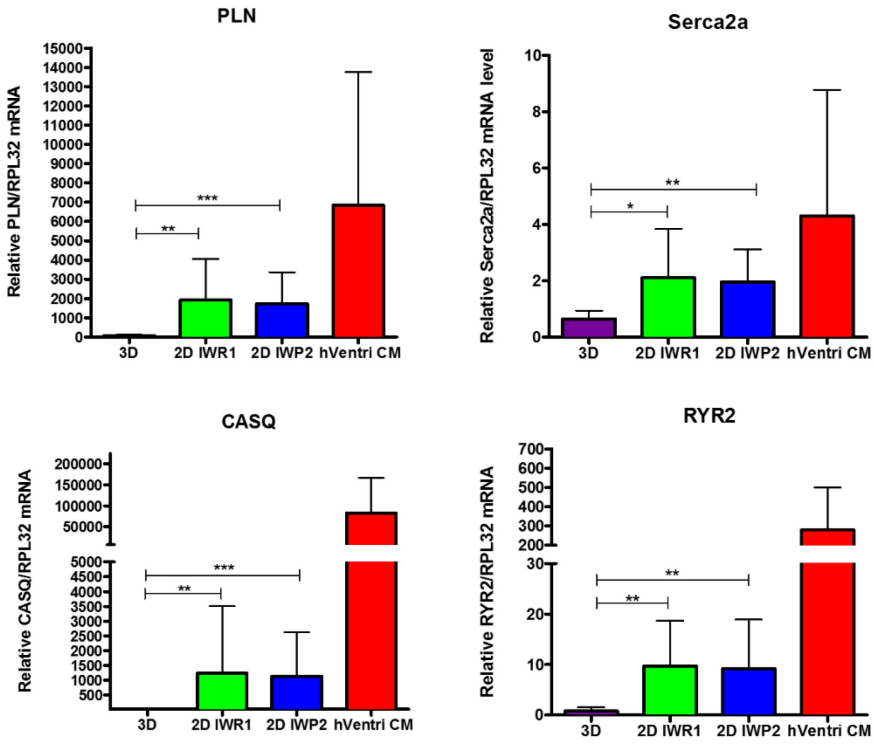


Figure S4: mRNA expression of calcium cycling proteins. Quantitative PCR results for the mRNA expression of *PLN, CASQ, Serca2a, RYR2.* Adult LV tissue was used as a positive control. n=8 to 12 differentiations, *p<0.05 , **p<0.01, ***p<0.001.

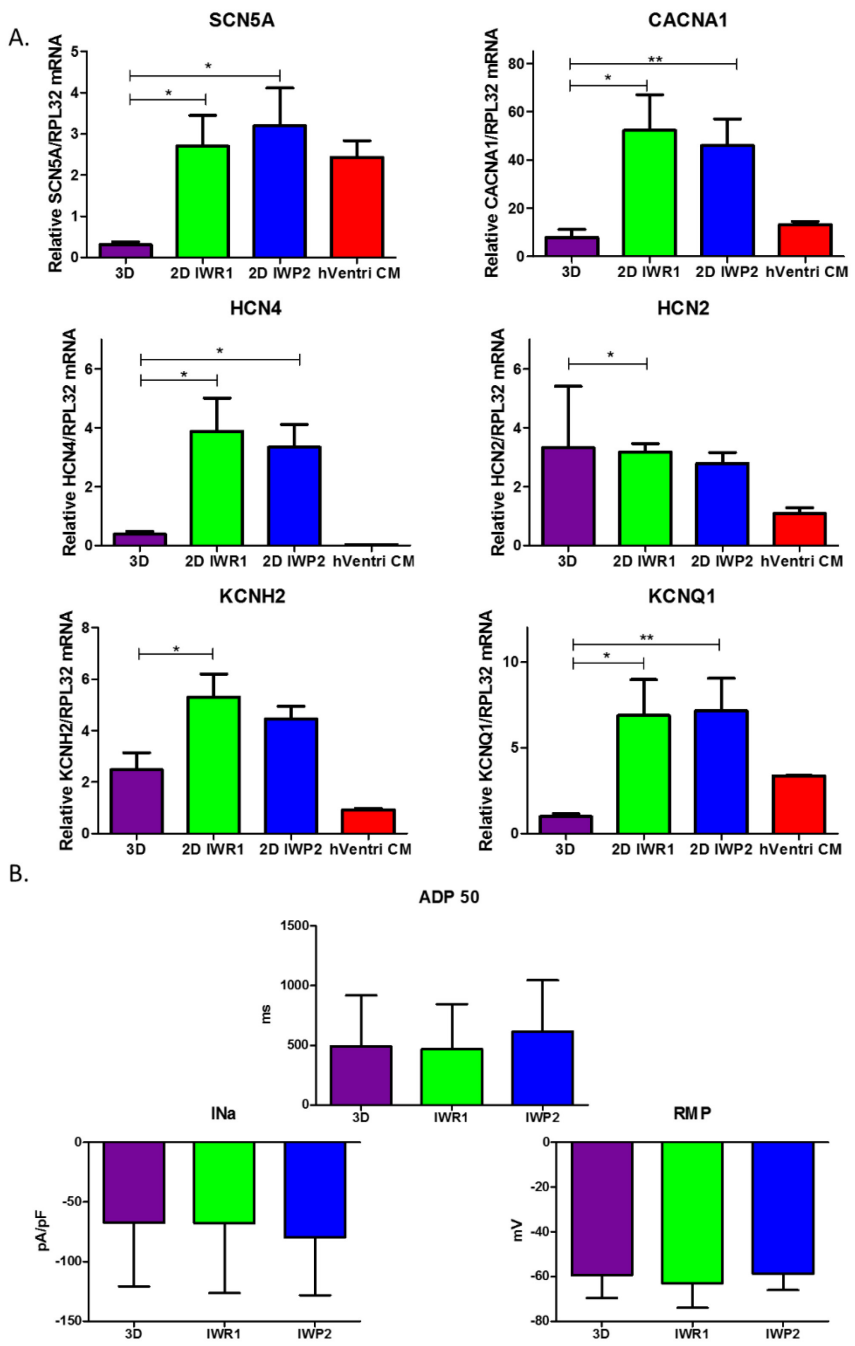


Figure S5: Expression of cardiac ion channels and electrophysiogy parameters A. Expression of main human cardiac ion channels**.** Quantitative PCR results for the expression of *SCN5A, CACNA1, HCN2, HCN4, KCNQ1, KCNH2,*. Adult LV tissue is used as a positive control. n=8 to 12 differentiations, *p<0.05, **p<0.01 **B.** Electrophysiology analysis: Graphs represent the APD50, RMP and canal Na+. No significative difference are observed between the protocols.

TABLES

Table S1: Sequences of primers

NAME	FOWARD SEQUENCE (5' > 3')	REVERSE SEQUENCE (5' > 3')
cTNi	CCAACTACCGCGCTTATGC	CTCGCTCCAGCTCTTGCTTT
ssTNi	AACCCAAGATCACTGCCTCCCG	CGCTTGAACTTCCCACGGAGGT
PLN	CTCACTCGCTCAGCTATAAGAAG	AGAGAAGCATCACGATGATACAG
SERCA2A	ACCCACATTCGAGTTGGAAG	CAGTGGGTTGTCATGAGTGG
CASQ2	GAGCTTGTGGCCCAGGTCCT	GATCTCCACTGGGTCTTCAA
RYR2	GGTGGTCATCGAACACTCCT	CGAGCAATACAACCTGACCA
KCNH2	CCCAACACCAACTCAGAGAAGATC	TAGCATACATGAGGGAGCCAATG
KCNQ1	GCCTCCTGCTTCTCTGTCTTT	CTTCTGCCTCTGCTTCTGCT
CACNA1	CGAAGTAGGTGGAGTTGACCAC	GCAGGAGTACAAGAACTGTGAGC
HCN2	ATCCAGTCGCTGGACTCCT	GATCTTCTGGCGGAAGTCAG
HCN4	TCTACTCGCTGAGCGTGGACAA	GAGTTGAGGTCGTGCTGGACTT

CONFIDENTIEL

Deuxième partie : Modélisation de la susceptibilité au syndrome de QT long induit par des médicaments avec un panel de cellules iPS sujets spécifiques

CONFIDENTIEL

Francesca Stillitano, Chi-wing Kong, Jens Hansen, Ioannis Karakikes, Christian Funck-Brentano, Stuart Scott, Stephan Reynier, Ma Wu, Emilie Laurent, Yannick Valogne, Aurélie Papadopoulos, Carole Desseaux, Joe-Elie Salem, Dorota Jeziorowska, Noël Zahr, Ronald Li, Ravi Iyengar, Roger J. Hajjar, Jean-Sébastien Hulot.

Article en revision eLIFE

Contexte : De nombreux médicaments peuvent induire une prolongation de la repolarisation cardiaque et des arythmies cardiaques mortelles. La prédiction de ces effets secondaires est cependant difficile car ceux-ci sont généralement observés chez certains individus génétiquement prédisposés mais présentant une repolarisation cardiaque normale en l'absence de stimulation pharmacologique.

Méthodes et résultats : Nous décrivons une plateforme basée sur un panel génétiquement diversifié de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) qui reproduit la susceptibilité à développer un effet cardiotoxique de médicaments. Nous avons généré des cardiomyocytes dérivés d'iPSC de patients présentant *in vivo* des changements minimes ou très élevés de repolarisation cardiaque à la réponse au sotalol. *In vitro* les réponses au sotalol ont été variables mais en grande partie corrélés aux différences inter-individuelles observées *in vivo*. Ces résultats ont été confirmés par mesures des potentiels de champs par micor-électrodes ou par électrophysiologie. Le profil transcriptomique a montré une dérégulation des gènes (DLG2, KCNE4, PTRF, HTR2C, CAMKV) impliqués en aval dans la régulation de la repolarisation cardiaque dans les iPSC-CM dérivés de patients avec une haute sensibilité au sotalol

Conclusions : Nos résultats offrent de nouvelles perspectives pour le développement de tests de criblage à base d'iPSC des effets toxiques des médicaments.

CONFIDENTIEL

Modeling susceptibility to drug-induced long QT with a panel of subject-specific iPS cells

Francesca Stillitano[1*], Jens Hansen[2*], Chi-wing Kong[1], Ioannis Karakikes[1], Christian Funck-Brentano[3], Stuart Scott[4], Stephan Reynier[5], Ma Wu[5], Emilie Laurent[5], Yannick Valogne[5], Aurélie Papadopoulos[5], Carole Desseaux[5], Joe-Elie Salem[3], Dorota Jeziorowska[3], Noël Zahr[3], Ronald Li[1], Ravi Iyengar[2], Roger J. Hajjar[1], Jean-Sébastien Hulot[1,3,¶]

1. Cardiovascular Research Center, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY 10029, USA.
2. Department of Pharmacology and Systems Therapeutics, Systems Biology Center, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY 10029, USA.
3. Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, AP-HP, INSERM, CIC-1421, Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ICAN), Pitié-Salpêtrière Hospital, F-75013 Paris, France
4. Department of Genetics and Genomic Sciences, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, NY 10029, USA
5. Cellectis Stem Cells, F-75013 Paris, France

*Both authors contribute equally to this work

¶Correspondence: jean.hulot@mssm.edu or jean-sebastien.hulot@upmc.fr

Short title: iPSCs to predict drug-induced long QT

CONFIDENTIEL

Abstract

A large number of drugs can induce prolongation of cardiac repolarization and life-threatening cardiac arrhythmias. The prediction of this side effect is however challenging as it usually develops in some genetically predisposed individuals with normal cardiac repolarization at baseline. Here, we describe a platform based on a genetically diverse panel of induced pluripotent stem cells (iPSCs) that reproduces susceptibility to develop cardiotoxic drug response. We generated iPSC-derived cardiomyocytes from patients presenting in vivo with extremely low or high changes in cardiac repolarization in response to a pharmacological challenge with sotalol. In vitro, the responses to sotalol were highly variable but strongly correlated to the inter-individual differences observed in vivo. Transcriptomic profiling identified dysregulation of genes (*DLG2, KCNE4, PTRF, HTR2C*, *CAMKV*) involved in downstream regulation of cardiac repolarization machinery as underlying high sensitivity to sotalol. Our findings offer novel insights for the development of iPSC-based screening assays for toxic drug reactions.

CONFIDENTIEL

Introduction

A large number of drugs have the undesirable side effect of prolonging cardiac repolarization which can trigger life-threatening cardiac arrhythmias (Kannankeril et al., 2010). A typical cause is the inhibition of the inward rectifying potassium channel (hERG or *human ether-a-go-go* related gene encoded by *KCNH2*) (Kannankeril et al., 2010; Roden, 2008a), which results in the prolongation of the repolarization time and induces an increase of the QT interval on the electrocardiogram. The early prediction of drug-induced long QT (diLQT) is a major requirement to avoid exposing patients to cardiac arrhythmias and ultimately sudden cardiac death (Sarganas et al., 2014). Eventually, diLQT is a major cause of drug withdrawal or of premature termination during development (Fermini and Fossa, 2003). Regulatory agencies require that new drug candidates be systematically screened for hERG inhibition in animal models or in heterologous over-expression cellular systems (Sager et al., 2014). Because of species-dependent differences of cardiac electrophysiology and the failure of heterologous systems to express all cardiac proteins, hERG screening however remains suboptimal and has a poor positive predictive value for subsequent proarrhythmia risk (Gintant, 2011; Giorgi et al., 2010; Sager et al., 2014).

The risk of developing diLQT varies markedly between subjects. Previous studies in the general population have shown that a small proportion (i.e., less than 10%) of patients exposed to QT-prolonging drugs actually develop diLQT (Behr and Roden, 2013; Kannankeril et al., 2010; Soyka et al., 1990). Different observations support the existence of a genetic determinism to diLQT including the higher propensity to develop drug-induced repolarization abnormalities in first-degree relatives of patients with diLQT (Kannankeril et al., 2005) and the similarity to the congenital form of the long QT syndrome (LQTS), a rare inherited cardiac disorder (Moss and Robinson, 1992). Multiple rare mutations with marked effects in genes encoding ion channels have been reported to underlie LQTS (Cerrone and Priori, 2011). However, candidate gene screening studies in large cohorts of patients with diLQT have reported a small prevalence (from 10 to 15%) of these mutations in the known LQTS genes

CONFIDENTIEL

(Paulussen et al., 2004; Yang et al., 2002). QT prolongation can be induced by mutations in many genes that occupy a substantial region of the human interactome and contain many drug targets (Berger et al., 2010). The factors leading to diLQT in some individual subjects remain largely unclear but are probably driven by the additive effect of common genetic variants that reduce the cardiac repolarization reserve (Behr and Roden, 2013; Kannankeril et al., 2005; Roden, 2006, 2008b). As a consequence, diLQT is difficult to predict as it usually develops in individuals with a predisposing genetic makeup which favors exaggerated response to a pharmacological challenge with QT-prolonging drugs (Kannankeril et al., 2010; Roden, 2008b) but does not affect cardiac repolarization features at baseline (Behr and Roden, 2013; Kannankeril et al., 2010; Sarganas et al., 2014).

Human induced pluripotent stem cells (iPSCs) have recently been proposed to model monogenic disorders including congenital LQTS (Itzhaki et al., 2011; Moretti et al., 2010; Sinnecker et al., 2013). Cardiomyocytes derived from congenital LQTS patient-specific iPSCs lines typically exhibit significant electrophysiological abnormalities due to the deficient function of some key cardiac ion channels (Itzhaki et al., 2011; Moretti et al., 2010). These cells display increased arrhythmogenicity under native conditions and can be used as a test system for customization of anti-arrhythmic drugs in these patients (Terrenoire et al., 2013; Wang et al., 2014). In addition, QT prolonging drugs can trigger changes in the electrical potential developed by iPSC-derived cardiomyocytes (iPSC-CMs) (Liang et al., 2013; Navarrete et al., 2013; Nozaki et al., 2014).

To expand upon these observations, our goal was to determine whether iPSC-CMs from a group of subjects with quantitative measure of diLQT *in vivo* could recapitulate the phenotype *in vitro* thereby providing a model system for diLQT. In this study, we show that iPSC-CMs from subjects shown to be susceptible to diLQT *in vivo* but otherwise normal present no abnormalities in their basal characteristics but higher cardiotoxic responses to drug stimulation as compared to control iPSC-CMs. The contrasted responses to sotalol in iPSC-CMs were strongly correlated to the inter-individual differences in response to sotalol as recorded during

CONFIDENTIEL

clinical investigations. Our findings offer novel insights on the use of a genetically diverse panel of induced pluripotent stem cells to model complex pharmacogenetic traits.

Results

Identification of subjects susceptible to develop drug-induced long QT

We first performed a clinical study (clinicaltrials.gov NCT01338441) where we prospectively evaluated cardiac repolarization of healthy subjects in response to a pharmacological challenge with a single 80mg oral dose of sotalol. Sotalol is a non-selective competitive β-adrenergic receptor blocker with additional Class III antiarrhythmic properties by its inhibition of potassium channels (Zanetti, 1993). Sotalol is widely recognized as a classical QT-prolonging drug (Soyka et al., 1990). A total of ninety-two subjects were enrolled in the study (Figure 1A). All subjects gave their written informed consent to participate the study. Included subjects were aged from 18 to 40 years (30.1 ± 6.2 years), had a body mass index (BMI) between 19 and 29 kg/m² (23.9 ± 2.3 kg/m²), were from Caucasian origin and had no known significant disease or long-term treatment. Forty-four percent (n=40) were male. Cardiac repolarization parameters were analyzed through standardized measurements of digital high-resolution ECG (sampling rate 1000 Hz). All subjects had a normal sinus rhythm and no significant conduction or repolarization abnormalities. Basal QT interval ranged from 340 to 458 ms (393.4±26.3 ms), with a corresponding heart rate ranging from 47 to 88 bpm (63.3±8.7 bpm). QT interval was corrected according to Fridericia's formula ($QTcf=QT/[RR]^{1/3}$) providing corrected QTcf in the physiological range from 350 to 447 ms (399.0±18.6 ms). Three hours after sotalol intake, QTcf had increased by 23.4±2.4 ms. A large inter-individual variability was however noticed with a change in QTcf ranging from - 9 ms to + 81 ms and a resulting post-sotalol QTcf ranging from 351 to 489 ms (412.6±43.0 ms) (Figure 1B).

Twenty subjects with the most extreme responses to sotalol (i.e., 10 subjects with high-sensitivity (high-S) and 10 subjects with low-sensitivity (low-S)) underwent skin biopsy (Figures 1A and C). These subjects displayed highly contrasted responses to the same

CONFIDENTIEL

pharmacological stimulation (average change in QTcf: 48.5±7.1 ms in high-S subjects vs. 0.2±4.8 ms in low-S subjects; p<0.0002; Figures 1C-E) while having no significant differences in their basal ECG characteristics (Table S1). Demographic characteristics were well balanced between groups with the exception of gender, subjects with high-S being mostly female (90%, n=9) whereas subjects with low-S were mostly males (80%, n=8) (Table S1). Sotalol plasma level was measured 3 hours after sotalol intake and was not significantly different in subjects with high-S as compared to the other participating subjects (753.1±210.9 vs. 620.7±195.3 µg/ml, p=0.10).

Derivation and differentiation of iPSCs into cardiomyocytes

Dermal fibroblasts were collected from the twenty subjects with high or low-sensitivity to sotalol stimulation. Human iPSCs were derived through retroviral infection of dermal fibroblasts with the reprogramming factors OCT4, SOX2, c-MYC and KLF4 with a successful generation for 17 out of the 20 subjects (Figure S1). All iPSC clones expressed the characteristic human embryonic stem cell (ESC) pluripotency markers TRA-1-60, NANOG, OCT3/4 and SSEA-4 (Figure S2A), had positive alkaline phosphatase staining and maintained a normal karyotype (Table S2). All clones showed silencing of the exogenous retroviral transgenes and reactivation of the endogenous pluripotency genes OCT3/4, NANOG and SOX2 (Figures S2B and C).

The generated iPSCs lines were then encoded to ensure that all further biological experiments were performed in a blinded fashion without knowledge of the associated clinical phenotype (Figure S1). The code was kept securely by a blinded third party and was only disclosed once all characterizations and electrophysiological measurements with microelectrode array (MEA) mapping system were finalized. All classifications of lines according to observed response to sotalol were therefore performed before the unblinding process.

Subject-specific iPSCs were differentiated using a small molecule-mediated directed differentiation protocol that involves sequential modulation of the canonical Wnt pathway and

CONFIDENTIEL

yields a high proportion of ventricular-like cardiomyocytes as previously described (Karakikes et al., 2014). As early as 7 days following initiation of cardiac differentiation, spontaneously beating embryoid bodies (EBs) appeared. Immunocytostaining studies showed positive staining for the sarcomeric proteins troponin T (cTnT), and alpha-actinin and for the gap-junction protein connexin 43 (Cx43) (Figure 2A). Cardiac troponin T staining of iPSC-CMs showed a typical striated pattern (Figure 2A, upper panels).

In line with previous reports (Liang et al., 2013), quantitative PCR demonstrated the presence of major cardiac ion channel genes found in adult left ventricular tissue, including of the relevant *KCNH2* gene (Figure 2B and Figure S2D).

Genetic profiling of cell lines

We then screened for common single nucleotide polymorphisms (SNPs, total of 4130) in the 15 genes associated with congenital long QT (*AKAP9, ANK2, CACNA1C, CALM1, CALM2, CAV3, KCNH2, KCNE1, KCNE2, KCNJ2, KCNJ5, KCNQ1, SCN4B, SCN5A, SNTA1)* using a high-density chip (Human Omni 2.5 genotyping array). We found 25 SNPs in *ANK2, SCN5A, KCNQ1, CACNA1C, CALM1, KCNE2, KCNH2* and *KCNJ5* as being significantly imbalanced between low-S vs. high-S groups (Table S3). This suggests the presence of an allelic series comprising multiple variants of unknown significance that can create a particular predisposing genetic background. Of note, the *CALM1* c.*1952C (rs3814843) mutated allele was recently associated with increased risk of sudden cardiac death in patients with heart failure (Liu et al., 2015). The allele is rare in Europeans (anticipated allelic frequency of 1.8%) but displayed a 22.2% allelic frequency in the high-S group. In addition, the rare C allele of *KCNH2:*c.307+1932G>C polymorphism (rs3778873) was significantly more frequent in high-S as compared to low-S (minor allelic frequency: 44.4% vs. 6.2% respectively, p=0.02). *KCNH2* encodes for the hERG potassium channel that is targeted by sotalol and this variant was identified in a large genome-wide association study on the physiological regulation of QT interval (Pfeufer et al., 2009).

CONFIDENTIEL

The library of iPSC-CMs reproduces susceptibility to develop cardiotoxic drug response

To evaluate the electrophysiological properties of iPSC-CMs, we used a microelectrode array (MEA) mapping system (Figure S3). iPSC-CMs were seeded onto a 6-well MEA chamber in order to form a monolayer in contact with the electrodes. Few days after seeding iPSC-CMs regain spontaneous beating activity thus allowing recordings of field potential duration (FPD) (Figures 2C-D and movie S1). FPD is analogous to the QT interval in the electrocardiogram (ECG) and was previously shown to correlate with action potential duration (APD) and can be used to test drug effects on repolarization (Navarrete et al., 2013). IPSC-CMs were first tested for their responses to E4031, a specific and potent experimental hERG blocker. E4031 resulted in a dose-dependent increase in FPD with typical flattening of the waveform in all but two cell lines (Figure 2D and Figure S3C). There was moderate inter-line variability, except for line P11019 which demonstrated higher sensitivity to E-4031 and was found to belong to the high-S group after unblinding. There was however no significant differences in sensitivity to E4031 between groups as assessed by computations of half maximal effective concentration EC50 ($2.4\pm0.7\times10^{-8}$ vs $6.6\pm3.0\times10^{-8}$ M in high-S and low-S groups respectively, p=0.59) or of maximal effect Emax (49±20% vs 30±2% in high-S and low-S groups respectively, p=0.76). The two lines displaying no responses to E4031 were the ones with the lowest expression of hERG (P11021 and P11023, Figure 2B) suggesting inappropriate capacities of these two cell lines to further detect any effect of QT prolonging drugs.

The response to the clinically relevant drug sotalol was then tested in a blinded fashion in the remaining 15 lines (8 vs. 7 lines in low-S and high-S groups respectively). After unblinding, we found that the different recordings showed a significantly higher response to sotalol in the CMs generated from iPSCs derived from high-S subjects as compared to low-S subjects (Figures 3A-D). Increasing sotalol concentrations was associated with a significant prolongation in FPDs in all iPSC-CMs, an effect that was however significantly enhanced in lines from the high-S group (Figure 3A). There was a dose-dependent sotalol-induced FPD prolongation that typically appears for sotalol concentrations above 30 µmol/L (Figure 3A), as seen in other

CONFIDENTIEL

reports (Navarrete et al., 2013). The application of low sotalol concentration (10 µmol/L) was however associated with a significant increase in FPD in lines from the high-S group as compared to low-S (p=0.03). The maximal FPD prolongation observed in response to sotalol was also significantly higher in the high-S as compared to low-S iPSC-CMs (52±6% vs. 26±6%, p=0.009, Figure 3B). Sotalol is known to induce arrhythmic events including ectopic beats and short-long-short rhythm. We found that 5 of the 7 lines derived from the high-S group displayed arrhythmias in response to sotalol stimulation as they showed development of irregular spontaneous beating rate. On the other hand, arrhythmias only occurred in one of the 8 lines from the low-S group (Figure 3C). We plotted the relative change in FPD in response to sotalol 30µM against the observed change in QTcf in donors (Figure 3D). With the exception of one cell line in each group, the remaining 7 low-S and 6 high-S cell lines were correctly discriminated according to the clinical phenotype. These data indicate that the contrasted responses to sotalol in iPSC-derived CMs are strongly related to the inter-individual differences in response to sotalol as recorded during clinical investigations.

We also evaluated the effect of sotalol on action potential duration (APD) measured in a representative iPSC-CMs line from each group (P11030 as low-S and P11024 as high-S). Experimenter for APD measurement was however kept blinded of the observed drug sensitivity of selected iPS lines. Sotalol (100 µM) significantly prolonged the APD at 90ms (APD_{90}) of high-S (P11024) iPSC-CMs (280±105 in drug-free vs. 504±167 after sotalol, n=5) but not that of the low-S line (P11030) (370±141 vs. 392±269ms after sotalol, n=7) (Figure 4A-B and Table S4). Consistently, sotalol reduced the firing frequency of high-S (P11024) iPSC-CMs by ~80% (from 0.9 ± 0.2 Hz before to 0.3 ± 0.3 Hz after sotalol) while the reduction was by ~50% (from 0.9 ± 0.5 Hz vs 0.5 ± 0.5 Hz) in the low-S (P11030) iPSC-CMs (Figure 4C).

Dysregulation of downstream regulators of cardiac ion channels

To gain insight into molecular mechanisms leading to differential susceptibility to developing diLQT, we performed a transcriptomic profiling of iPSC-CMs from low-S vs. high-S groups

CONFIDENTIEL

using RNA-sequencing. We looked for differentially expressed genes (DEGs) between the two groups (all cell lines included) and used a prior knowledge based approach to identify potential risk markers that could be mechanistically connected to QT prolongation development. By analyzing the LQTS neighborhood in the human interactome we recently demonstrated that graph theoretical models allow the prediction of new gene variants and drug targets that are involved in disease pathogenesis (Berger et al., 2010). Here, we used a similar approach and searched for differentially expressed direct neighbors of the known congenital LQTS genes in the human interactome (Figure 5A). Of note, expression of these LQTS genes was similar between high-S and low-S groups. We identified 4 up-regulated (*DLG2, KCNE4, PTRF,* and *HTR2C*) and 1 down-regulated direct neighbors (*CAMKV*) (Figures 5A-B). Among these newly identified candidates, *DLG2* (a member of the family of anchoring proteins called MAGUK), *KCNE4* (a regulatory sub-unit of potassium channel), *CAMKV* (a kinase-like protein that, in the presence of calcium, interacts with calmodulin (*CALM1*), and *PTRF* (Polymerase I and transcript release factor, or cavin-1) were relevant candidates as downstream regulators of cardiac ion channels.

The expression levels of the genes between the low-S and the high-S groups show that the risk specific expression (i.e. low expression for *CAMKV* and high expression for the other direct neighbors) does not accumulate on a few high-S subjects but is more or less equally distributed over all high-S subjects (Figure 5B). Each subject has a risk-associated expression of at least one direct neighbor, arguing for multiple ways to disturb the LQTS genes and therefore confer different susceptibility to develop diLQT.

Since most of the high-sensitivity subjects were females, while most of the low sensitivity subjects were males, we then estimated whether gender could impact our results. To neutralize gender-specific effects on gene expression, we generated new groups consisting of one high-S and one low-S subject of the same gender (16 female groups, 6 male groups, Table S5). DEGs were identified between all possible combinations of one female versus one male group (16 x 6 = 96 sets of DEGs). We counted for each gene how many sets of DEGs identified

CONFIDENTIEL

the gene as significantly up-regulated or down-regulated. Down-regulated counts were subtracted from up-regulated counts and resulting netto counts were normalized to the number of total comparisons (i.e. divided by 96). Using this approach, a gene that is up-regulated in the high-S group because of gender specific expression, should be identified as significantly up-regulated in most of the female versus male groups sets of DEGs. The same accounts for down-regulated genes. As shown in Figures 5B and 5C, this trend was not observed for most of the genes, arguing against gender differences being the reason for differential gene expression between the high-S and low-S group.

Finally, to further investigate if the DEGs are the consequence of sex specific gene expression, we predicted regulatory transcription factors of the DEGs based on two transcription factor target databases and ranked them by significance (Figure S5). The sex-hormone related transcription factors were ranked 14 (AR), 19 (ESR1) and 24 (ESR2) or 64 (PGR) and 169 (ESR1), and no sex hormone related transcription factor was among the top 10 candidates. These data suggest that the observed differences in expression patterns between high-S and low-S iPS-CMs are mostly indicative of a signature associated with drug sensitivity rather than a gender effect.

Discussion

Our data illustrate the potential of using a genetically diverse panel of subject-specific iPSCs to model complex and acquired phenotypes. So far, iPSCs technology has been successful in recapitulating monogenic diseases with clear causative mutations including congenital long QT syndrome (Itzhaki et al., 2011; Moretti et al., 2010; Sinnecker et al., 2014). In contrast, diLQT develop in clinically normal individuals who have a genetic predisposition requiring an additional stressor to become manifest (Roden, 2006, 2008b). The exact nature of this predisposing genetic background remains uncertain (Petropoulou et al., 2014) but is likely made of an allelic series of common variants with modest independent effect on cardiac

CONFIDENTIEL

repolarization but potential for a stronger impact in a polygenic model, as exemplified by our genetic profiling.

Here, we provide evidence that susceptibility to develop diLQT can be best reproduced *in vitro* using a targeted library of iPSCs derived from patients presenting with an extreme pharmacodynamic response to drug stimulation *in vivo*. Extreme phenotype selection is a well-defined methodology that helps enrich the frequency of alleles that contribute to a trait and this methodology has been successfully applied in genetic studies aimed at identifying variants associated with complex traits (Cirulli and Goldstein, 2010). The use of this methodology is particularly suitable when investigating variability in drug responses by segregating individuals with opposite predisposing genetic makeup, a characteristic that can be transmitted to iPSCs as shown by our data. Importantly, in order to avoid experimental biases, *in vitro* assessment of iPSC-CMs sensitivity to sotalol was performed blinded to the clinical phenotype. In addition, as we aimed at reproducing a more complex phenotype, we designed our study with a larger sample size than typical studies using iPSCs for disease modeling of monogenic disorders. As a consequence, we were only able to explore one iPSC clone per patient and we did not evaluate potential inter-line variability. The likelihood that inter-line variability would have systematically biased our results to reproduce the anticipated effect as seen *in vivo* and thus explain our results is however unlikely on a panel of 17 different cell lines as appreciated by p-values for comparison between groups which were below 0.01 (Figure 3). Under our hypothesis, it is likely that the discrepant results obtained in two cell lines reflect that potential false results associated with inter-line variability from a same patient. However, external replication would further strengthen the potential of subject-specific iPSCs to model complex phenotypes as shown in our seminal study.

This library also represents a unique opportunity to explore the molecular mechanisms underlying pro-arrhythmic adverse drug reactions. The transcriptomic comparison of the generated iPSC-CMs from both groups combined to bioinformatics network analysis revealed significant changes in expression of genes related to the regulation of ion channels

CONFIDENTIEL

homeostasis (*DLG2, KCNE4, CAMKV* and *PTRF*). Of note, while none of these genes have been previously associated with the occurrence of diLQT, *CAMKV* is coding for a kinase-like protein that, in the presence of calcium, interacts with calmodulin (*CALM1*), a critical regulator of ion channels involved in congenital long QT syndrome 14 (Crotti et al., 2013) and in loperamide-induced long QT (Berger et al., 2010). Additionally, mutations in *PTRF* (Polymerase I and transcript release factor, or cavin-1) cause a particular form of congenital generalized lipodystrophy (type 4, CGL4) that is associated with features of long QT syndrome and high rate of sudden cardiac death (Rajab et al., 2010). *PTRF* is involved in the formation of caveolae (Nabi, 2009), that are critical in cardiac ion channels trafficking to the plasma membrane (Maguy et al., 2006). In addition to the involvement of *DLG2* and *KCNE4* genes in the direct regulation of scaffolding, trafficking and gating kinetics of some cardiac potassium channels (Leonoudakis et al., 2004; Levy et al., 2010), our study suggest for the first time that diLQT might be related to changes in downstream regulation of the cardiac repolarization machinery. Further experiments will be required to understand the exact contribution of each of these candidates and whether they might act in combination to confer susceptibility to develop diLQT. Lastly, we identified an up-regulation in *HTR2C* (5-hydroxytryptamine receptor 2C), a G-protein coupled receptor for serotonin that is expressed in the heart. Upon activation HTR2C activates down-stream signaling cascades to promote the release of Ca2+ from internal stores. Interestingly, serotonin receptor agonists have been associated with higher risk for diLQT (Keller and Di Girolamo, 2010; Sarganas et al., 2014).

Many studies have reported a higher susceptibility to diLQT in premenopausal women as compared to men including in response to sotalol (Darpo et al., 2014; Makkar et al., 1993), an observation that is in line with the results of our prospective clinical investigation. It has been suggested that sex hormones can influence cardiac repolarization by modulating expression and function of cardiac ion channels but their effect is complex to appreciate as levels fluctuate with time and age and the different sex hormones can have counterbalancing effects (Hulot et al., 2003; Odening and Koren, 2014). Here, we were able to reproduce susceptibility to develop

CONFIDENTIEL

diLQT *in vitro* in a hormone-free environment. We performed specific analyses that did not support an important role of gender to explain our results, including the lack of a gender-specific gene expression signature and the lack of significant sex hormone-related transcription factors. Importantly, our data suggest that the identified genes should work as predisposing genes in both genders thus arguing for the existence of an intrinsic predisposing background that is carried by iPS cells but do not depend on gender. Of note, it has recently been shown that women have in mean a greater intrinsic sensitivity to sotalol as compared to men, an effect that however remains widely variable at the individual level (Darpo et al., 2014). Therefore, we propose that diLQT requires the combination of three factors: the administration of a QT-prolonging drug in a subject that is preferentially a premenopausal woman (where a favoring hormonal environment acts as an extrinsic factor) but also presents with a predisposing genomic pattern (intrinsic factor) as identified in our study.

We now anticipate that this approach will allow the development of a new generation of screening assays for toxic drug reactions, including cardiac safety (Sager et al., 2014). Given the high rates of safety-related drug attrition (Fermini and Fossa, 2003), the potential severity of adverse drug reactions and the relatively low incidence of susceptible individuals that develop adverse drug effect in the general patient population (Budnitz et al., 2006), the development of the proposed methodology would be critical to develop more predictive human-based drug screening assays (Inoue and Yamanaka, 2011; Mann, 2015). Further developments in differentiation protocols (Burridge et al., 2014), in functional maturation of iPSC-derived cells (Lundy et al., 2013) or in iPSC-based bioengineering (Schaaf et al., 2011; Turnbull et al., 2014) might also improve the overall predictability of the method.

Our data finally illustrate the potential of iPSCs technology for the prediction of individual risk and for its use in precision medicine. We found a limited number of lines with discrepant results *in vitro* as compared to the clinical phenotype, suggesting a good accuracy of the approach. However, as we only investigated patients with extreme responses to sotalol, our study was

CONFIDENTIEL

not designed to accurately assess the predictive value of the test. This should be adequately addressed in larger prospective studies.

In conclusion, this study underscores the power of developing a panel of iPSCs to model complex traits such as susceptibility to develop cardiotoxic drug response.

CONFIDENTIEL

Material and Methods

Subjects and clinical investigations

To participate to the study, male or female volunteers had to fulfill the following inclusion criteria: aged 18 to 40 years, body mass index from 19 to 29 kg/m^2, no previous history of cardiac disease, no major disorders, no medications known to affect cardiac repolarization (as defined by https://www.crediblemeds.org/everyone/composite-list-all-qtdrugs). All volunteers had normal laboratory evaluations and a normal clinical examination with a resting heart rate ≥ 50 beats min^{-1} and a systolic blood pressure ≥ 100 mmHg. Cardiac conduction and repolarization was assessed on a 12-lead resting electrocardiogram and participants were excluded in case of atrio-ventricular conduction disorder (PR interval > 200ms), QRS > 100ms and in case of prolonged QTcF > 450 ms. Other exclusion criteria were familial or personal history of sudden death or unexplained syncope, concomitant use of illicit drugs, asthma.

The protocol was approved by local institutional ethics committee and all subjects gave their written informed consent for participation to the study.

All investigations were performed prospectively at a single clinical center (Biotrial Paris, Rueil Malmaison, France). In a first phase, eligible subjects were admitted at 7:30am at the clinical investigation center after an overnight fast. Subjects were placed in a quiet room and rested for 30 min in the supine position. Cardiac rhythm and non-invasive blood pressure monitoring were started. The quality of ECG recordings was assessed and baseline recordings were performed during the 5 minutes preceding sotalol oral administration (80 mg tablet). ECG recordings were then performed 3 hours after sotalol intake, i.e. around peak plasma concentration. Blood samples for determination of sotalol concentration were obtained at baseline and 3 hours after sotalol administration. Volunteers were allowed to leave the clinical investigation center 5 hours after sotalol intake after cardiac repolarization had normalized.

In a second phase (7 to 35 days after phase 1), 20 subjects with the most extreme responses to sotalol (10 with smallest QTcF changes and 10 with the largest QTcF changes from baseline

CONFIDENTIEL

in response to sotalol) were asked to come to the clinical investigation center and had a skin biopsy under local anesthesia using a sterile 3mm skin punch.

ECG recording and analysis

Before and 3 hours following sotalol administration, 30-sec digital 12-lead electrocardiograms were recorded using a Cardioplug device (Cardionics Inc, Brussels, Belgium) connected to a personal computer. All electrocardiogram recordings were then read by the same investigator, blindly of drug administration. The same chest lead with the largest T-wave amplitude was selected for QT interval measurement in a given subject. QT interval was measured manually directly on the computer screen by changing position of cursors indicating the start and the end of the cardiac interval: RR (interval between two successive R waves) and QT. Baseline QTc was assessed as the mean of three electrocardiographic recordings obtained within 5 min before drug administration. QT was corrected by the Fridericia cubic root formula (QTcf), which minimizes the errors due to the square root Bazett formula. The clinical phenotype was defined by modifications in QTcf duration (ms) 3 hours after sotalol intake.

Human iPSCs derivation

Fibroblast derivation was performed immediately after biopsy arrival at Ectycell / Cellectis Stem Cell Company (Evry, France). Skin biopsy of a 3-mm diameter punch was cut into about 20 small explants with scalpels and placed in 6-well plates and cultured with fibroblast growth medium containing DMEM medium (Gibco), 10% of FBS (PAA Laboratories), 10ng/ml FGF-2 (Invitrogen) and 1% penicillin-streptomycin (Gibco). Cells were fed every 2–3 days. In this culture, fibroblasts appeared and became confluent on average 33 days after plating. The fibroblasts were then subcultured using 0.25% trypsin (Invitrogen) then re-suspended and cultured into T75 flasks using fibroblast growth medium without antibiotics. An average of 62 million fibroblasts per biopsy was obtained in 4-7 weeks at passage 1. The fibroblasts were

CONFIDENTIEL

tested for mycoplasma contamination and no contamination was detected (MycoAlert TM Mycoplasma Detection kit, Lonza).

Reprogramming of fibroblasts derived from patient's skin biopsies into iPSCs was carried out using polycistronic retroviral vectors. The fibroblasts were seeded in 6-well plates at a defined cell density (100,000 cells/well) and cultured with fibroblast growth medium (DMEM medium containing 10% of FBS and 10ng/ml FGF-2). For transduction, cells were incubated with polycistronic retroviral vectors (provided by Vectalys, Toulouse, France) carrying human Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc (OSKM) expression factors in fibroblast medium supplemented with 6 µg/ml polybrene (Sigma) overnight. The cells were transduced at a multiplicity of infection of 5. Four days post-infection, the cells were split by using 0.25% trypsin and plated at 100,000 cell/well in 0.1% gelatin-coated 6-well plates in fibroblast growth medium. After 24 hours, the medium was switched to the human pluripotent stem cell medium (DMEM/F12, 20% knockout serum replacement, 1× non-essential amino acid, 2 mM L-glutamine, 0.1 mM 2-mercaptoethanol, 20 ng/ml FGF-2 and 1% penicillin-streptomycin) with 0.5 mM Valproic acid (VPA). The media were changed every day. Around 20–25 days post-infection, the human ESC-like colonies appeared. The iPSCs colonies were picked and expanded in mTeSR1 (Stemcell technologies) on matrigel matrix (BD Biosciences) coated plates. The iPSCs were passaged with Accutase (10 ml pre 75 cm2 surface area, Millipore) and the culture medium was changed daily.

Colonies fulfilling established "stemness" criteria were selected and sent to the Cardiovascular Research Center at Mount Sinai School of Medicine, New York, USA for differentiation toward the cardiomyocyte lineage and pharmacological characterization.

Differentiation of iPSCs into Cardiomyocytes

The iPSCs were differentiated into cardiomyocytes using a directed differentiation method. Cardiomyocytes differentiation was initiated in suspension cultures on ultra-low attachment dishes (Corning) in mTESR1 medium supplemented with BMP4 10 ng ml-1) and Blebbistatin

CONFIDENTIEL

(5 μM) for 24h. The medium was then replaced with the basal differentiation medium (StemPro34, 50 μg ml-1 ascorbic acid, 2mM GlutaMAX-I) supplemented with BMP4 (10 ng ml-1) and Activin-A (25 ng ml-1) for 48h (days 1–3) and then switched to basal differentiation medium for another 36h (days 3-4.5). Finally, the cells were differentiated in basal differentiation medium supplemented with IWR-1 (2.5 μM) for 96h (Day 4.5-8.5). The differentiated cardiomyocytes were maintained in basal differentiation media for up to 4 weeks. All cytokines were purchased from R&D. The small molecules were purchased from Sigma. All differentiation cultures were maintained in 5% CO2/air environment.

Immunocytochemistry

iPSCs were cultured on matrigel-coated coverslips, fixed in paraformaldehyde and permeabilized in blocking/permeabilization buffer (2% BSA / 2% FBS / 0.05 % NP-40 in PBS) for 45 min and incubated with primary antibodies overnight at 4°C. Then the cells were washed in PBS and incubated with Alexa-conjugated secondary antibodies (Invitrogen) diluted in blocking/permeabilization buffer (1:750). Finally, after washing in PBS the cells were counterstained with DAPI. Immunofluorescence images were acquired using an Olympus X41 microscope. The following antibodies were used: mouse monoclonal anti-OCT4 (Santa Cruz), goat polyclonal anti-NANOG (R&D systems), mouse monoclonal anti-SOX2 (R&D systems), mouse monoclonal anti-SSEA-4 (R&D systems), mouse monoclonal anti-TRA-1-60 (R&D systems). Similarly, iPSC-derived cardiomyocytes were dissociated and cultured on matrigel-coated coverslips for 4-5 days, fixed in paraformaldehyde and permeabilized in blocking/permeabilization buffer for 45 min. The following primary antibodies were used: mouse monoclonal anti-cardiac troponin T (Thermo Fisher Scientific), mouse monoclonal anti-connexin 43, and mouse monoclonal anti-α-actinin. Confocal imaging was performed using a Leica SP5 confocal system.

CONFIDENTIEL

Quantitative PCR

Relative gene expression was determined using a two-steps quantitative real-time PCR method. Total RNA was isolated with the RNeasy Isolation kit with on-column DNase I treatment (Qiagen) and reverse-transcribed using the cDNA Synthesis Kit (Biorad). Quantitative RT-PCR was performed with the Quanta SYBR Green Supermix (Quanta biosciences) on the ABI Prism 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Fold changes in gene expression were determined using the comparative CT method ($\Delta\Delta$Ct) with normalization to the housekeeping gene B2M.

SNPs genotyping array

Single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping analysis was performed using the Illumina HumanOmni2.5-8 beadchip genotyping array, which comprise a comprehensive set of around 2.6 million SNPs (with MAF>2.5%) across the genome. The list of mapped SNPs can be found at http://support.illumina.com/downloads/infinium-omni2-5-8-v1-3-support-files.html. All genomic DNA was isolated from iPSC clones using Quick-gDNA Mini Prep kit (Zymo Research). Input genomic DNA (200 ng) was processed, hybridized to the array and scanned on an Illumina HiScan at the Mount Sinai Genomic Core Facility. Based on chromosome coordinates, we extracted SNPs in *AKAP9, ANK2, CACNA1C, CALM1, CALM2, CAV3, KCNH2, KCNE1, KCNE2, KCNJ2, KCNJ5, KCNQ1, SCN4B, SCN5A, SNTA1* using Genome Studio (Illumina). Genotypes were estimated and compared between low-S and high-S groups. We used HapMap-CEU data to estimate the anticipated minor allelic frequency in European population.

RNA-Sequencing

Total RNA was extracted using Zymo columns and 2 μg were used to generate a RNA-seq sequencing library. Poly-A selection and mRNA-SEQ library preparation were performed at

CONFIDENTIEL

the Mount Sinai Genomics Core Facility. Sequencing (50 bases, paired ends) was performed using an Illumina HiSeq2500. Annotated reads were obtained using STAR and HTSeq and normalized to full library size.

Sequencing reads were aligned to the human reference genome 'hg19' using Tophat 2.0.8 (Trapnell et al., 2009), samtools-0.1.7 and bowtie 2.1.0 (Langmead and Salzberg, 2012) and differentially expressed genes were identified with cufflinks 1.3.0 (Trapnell et al., 2010).

The total number of sequenced reads in a sample influences the likelihood to detect a lowly to moderately expressed gene, especially in case of lower reads counts (McIntyre et al., 2011). In consequence, it could happen that fewer genes are detected in a sample with a lower read count than in a sample with a higher read count. Such an experimental artifact might distort normalization including total reads as well as upper quartile normalization, the two normalization options that are offered by cufflinks. Both normalization approaches only change the number of reads that are associated with a gene, but not the number of identified genes. Consequently, the same number of normalized reads might be distributed over a different number of genes in two different samples, causing the detection of an equally expressed gene in both samples as differentially expressed. To prevent such an experimental artifact we randomly removed reads from the sequenced samples until every sample had the same number of read counts. Reads were aligned to the human reference genome hg19 with Tophat using the ensemble GTF file as a gene annotation reference and the option 'no-novel-juncs'. Output BAM files were directly subjected to Cufflinks to identify differentially expressed genes, using the options 'multi-read-correct', 'upper-quartile-norm' and 'frag-bias-correct' against the hg19 genome. Differentially expressed genes were identified based on a FDR of 5% and a minimum fold change ($\log_2((FPKM_{condition1}+1)/(FPKM_{condition2}+1)) >= +/-\log_2(1.3)$).

We determined differentially expressed genes between the high-S (P11008, P11013, P11015, P11018, P11019, P11021, P11023, P11024, P11029) and the low-S (P11007, P11009, P11014, P11020, P11026, P11028, P11030, P11031) cell lines. To compare gene expression values of the identified candidates across individual samples, we subjected all samples as

CONFIDENTIEL

individual conditions to the cufflinks analysis pipeline in the same way as described above. We used the FPKM values of the cufflinks results file as a measure for normalized gene expression.

To analyze, if differentially expressed genes between the high-S and low-S group are caused by gender differences between the two groups, we generated all possible combinations of one high-S female and one low-S female (16 groups) and one high-S male and one low-S male (6 groups). We determined differentially expressed genes between all possible combinations of one female group versus one male group (16 x 6 sets of DEGs). For each gene we counted in how many sets of DEGs it was detected as significantly up-regulated or down-regulated, subtracted the counts for down-regulated detections from the counts for up-regulated detections and divided the resulting number by the counts for sets of DEGs (i.e. by 96).

Network analysis and direct neighbors identification

To search for differentially expressed direct neighbors of LQTS disease genes, we generate a human interactome by merging all protein-protein interaction databases of the Expression2 kinases suite (Chen et al., 2012), except the 'Predicted PPI' database, and a recently published protein-protein interaction network (Rolland et al., 2014). Small letter symbols of the merged interactome were replaced by their human homologues, using the Mouse Genome Informatics mouse-human orthology database and the NCBI mouse-human homologene database. Finally, we removed all network nodes that were not official human gene symbols as reported in the NCBI geneInfo database. Differentially expressed genes in the direct neighborhood of LQTS disease genes ("AKAP9", "ANK2", "CACNA1C", "CALM1", "CALM2", "CAV3", "KCNE1", "KCNE2", "KCNH2", "KCNJ2", "KCNJ5", "KCNQ1", "SCN4B", "SCN5A", "SNTA1") were identified (path length = 1).

CONFIDENTIEL

Prediction of upstream regulatory transcription factors

All differentially expressed genes were subjected to transcription factor target enrichment analysis using the Chea-background and Transfac database (downloaded from EnrichR (Chen et al., 2013)), as described previously (Karakikes et al., 2014).

Extracellular field potential recordings (MEA assay)

For MEA recordings, we used 6well-MEA arrays, which contain six independent culture chambers, separated by a macrolon ring (60-6 well MEA 200/30 iR-Ti-rcr, Multichannel Systems, Germany). Inside each well, there is a field of nine electrodes with an internal reference electrode (figure S4). The 6well-MEA arrays were prepared by pipetting 5µl fibronectin solution (100 µg/mL, BD Biosciences) and incubated at 37°C for at least 1 hour. iPSC-CMs were dissociated using 0.025% trypsin for 5 min at 37°C and seeded onto prepared MEA plates using 5µl of cell suspension in StemPro34 medium and then incubated at 37°C/5% CO2. The day after the cells were covered with 200µL of StemPro34 media. MEA recordings were performed once the cells started to beat again (5-7 days). Field potentials of spontaneously beating cardiomyocytes were recorded using a high-resolution Micro Electrode Array (MEA) recording system (MEA60 system, Multi Channel Systems, Reutlingen, Germany, http://www.multichannelsystems.com) at 37°C. The baseline steady state was achieved following an equilibration period of about 15 min in vehicle medium (StemPro34 media). The tested drugs (E4031 and Sotalol, Sigma) were then added directly to each well. Dose-response experiments were performed with the following sequence: drugs were diluted in 200µL of StemPro34 media; increasing concentrations of drug were added to a well of the MEA array in a cumulative manner; the FPD recordings were started 3 minutes after application of a given concentration of a drug, a timing that was found optimal to achieve steady-state changes; FPD recordings were then performed for 2 additional minutes. Each drug was tested in at least 3 different wells. Raw MEA data were acquired using QT-Screen Lite and MC-Rack softwares

CONFIDENTIEL

(Multi Channel Systems, Reutlingen, Germany). The data were then exported on QT-Analyzer Software to analyze the field potential duration and the inter-beat interval (Multi Channel Systems, Reutlingen, Germany). Parameters were averaged on the 2-min recordings. Inter-beat interval (in ms) was used to calculate the instantaneous beat rate. To account for the dependency between repolarization rate and the beating rate, FPD was firstly adjusted using the popular Bazett's formula (adjustedFPD = rawFPD / RR1/2). We however found that, as expected, this formula was associated with an important over-correction thus supporting the need for an alternative adjustment formula according to Funck-Brentano et al. (Funck-Brentano and Jaillon, 1993)(Figure S4A). We thus plotted the FPD / inter-beat-interval pairs recorded at various beating rates under baseline conditions. The following equation with the same dimension as Bazett's formula: adjustedFPD = rawFPD / RRα, where alpha is a regression parameter, was applied to raw data in order to have new estimate of the correction factor and results in appropriate corrections of FPD (Figure S4B).

Cells were considered as developing arrhythmias in response to sotalol as they presented ectopic beats or spontaneous beating rates became irregular.

Patch clamp recordings

hiPSC-derived embryoid bodies were enzymatically dissociated into single cardiomyocytes and plated on matrigel-coated glass coverslips. Action potential of cardiomyocytes was assessed in the current-clamp mode using whole-cell patch-clamp technique with a HEKA EPC10 amplifier and Pulse/PulseFit software (HEKA, Germany). Pipette solution consisted of: 110 mM potassium aspartate, 20 mM KCl, 10 mM HEPES, 1 mM MgCl2, 0.1 mM ATP (disodium salt), 5 mM ATP (magnesium salt), 5 mM phosphocreatine (disodium salt) and 1 mM EGTA (pH 7.2). The external bath solution contained 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl2, 10 mM D-glucose, 1 mM CaCl2 and 10 mM HEPES (pH 7.4). Measurements were performed at 37°C.

CONFIDENTIEL

Statistical Analysis

All analyses were performed using Prism 6.0 (GraphPad). Continuous data are presented as Mean±SEM. A P-value ≤ 0.05 was considered significant. Continuous variables were compared using non-parametric Mann-Whitney test and binary variables were tested using Chi-square or exact Fisher's test as appropriate. Responses to drugs were normalized to baseline values and expressed as changes to baseline. A two-way analysis of variance with repeated measures was performed to analyze response to sotalol. Sotalol concentrations define the first factor and the sensitivity group the second factor. Individual comparisons were performed when the overall analysis was significant. Dose response curves were built to estimate EC50 using the Hill equation.

Acknowledgments We thank the Biotrial core lab. This work was funded by the Cellectis Company. J.H. and R.I. are supported by NIH P50 GM071558 and GM54508 and U54 HG008098.

Author Contributions J.S.H and R.J.H designed the study. F.S., I.K, and D.J. performed iPSC characterization and recordings. C.K. and R.L. performed patch-clamp recordings. C.F.B and J.E.S reviewed ECG recordings, patient selection and QT adjustment with the help of J.S.H. S.R. and C.D. monitored the clinical investigations. E.L, Y.V. and A.P. generated the iPSC under the supervision of W.M. N.Z. performed sotalol blood concentration measurements. J.H. and R.I. analyzed transcriptomic data and generated the networks. J.S.H, R.J.H, R.L. wrote the manuscript with comments from all authors.

CONFIDENTIEL

References:

Behr, E.R., and Roden, D. (2013). Drug-induced arrhythmia: pharmacogenomic prescribing? Eur Heart J *34*, 89-95.

Berger, S.I., Ma'ayan, A., and Iyengar, R. (2010). Systems pharmacology of arrhythmias. Sci Signal *3*, ra30.

Budnitz, D.S., Pollock, D.A., Weidenbach, K.N., Mendelsohn, A.B., Schroeder, T.J., and Annest, J.L. (2006). National surveillance of emergency department visits for outpatient adverse drug events. JAMA *296*, 1858-1866.

Burridge, P.W., Matsa, E., Shukla, P., Lin, Z.C., Churko, J.M., Ebert, A.D., Lan, F., Diecke, S., Huber, B., Mordwinkin, N.M.*, et al.* (2014). Chemically defined generation of human cardiomyocytes. Nat Methods *11*, 855-860.

Cerrone, M., and Priori, S.G. (2011). Genetics of sudden death: focus on inherited channelopathies. Eur Heart J *32*, 2109-2118.

Chen, E.Y., Tan, C.M., Kou, Y., Duan, Q., Wang, Z., Meirelles, G.V., Clark, N.R., and Ma'ayan, A. (2013). Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. BMC Bioinformatics *14*, 128.

Chen, E.Y., Xu, H., Gordonov, S., Lim, M.P., Perkins, M.H., and Ma'ayan, A. (2012). Expression2Kinases: mRNA profiling linked to multiple upstream regulatory layers. Bioinformatics *28*, 105-111.

Cirulli, E.T., and Goldstein, D.B. (2010). Uncovering the roles of rare variants in common disease through whole-genome sequencing. Nat Rev Genet *11*, 415-425.

Crotti, L., Johnson, C.N., Graf, E., De Ferrari, G.M., Cuneo, B.F., Ovadia, M., Papagiannis, J., Feldkamp, M.D., Rathi, S.G., Kunic, J.D.*, et al.* (2013). Calmodulin mutations associated with recurrent cardiac arrest in infants. Circulation *127*, 1009-1017.

Darpo, B., Karnad, D.R., Badilini, F., Florian, J., Garnett, C.E., Kothari, S., Panicker, G.K., and Sarapa, N. (2014). Are women more susceptible than men to drug-induced QT prolongation?

CONFIDENTIEL

Concentration-QTc modelling in a phase 1 study with oral rac-sotalol. Br J Clin Pharmacol *77*, 522-531.

Fermini, B., and Fossa, A.A. (2003). The impact of drug-induced QT interval prolongation on drug discovery and development. Nat Rev Drug Discov *2*, 439-447.

Funck-Brentano, C., and Jaillon, P. (1993). Rate-corrected QT interval: techniques and limitations. Am J Cardiol *72*, 17B-22B.

Gintant, G. (2011). An evaluation of hERG current assay performance: Translating preclinical safety studies to clinical QT prolongation. Pharmacol Ther *129*, 109-119.

Giorgi, M.A., Bolanos, R., Gonzalez, C.D., and Di Girolamo, G. (2010). QT interval prolongation: preclinical and clinical testing arrhythmogenesis in drugs and regulatory implications. Curr Drug Saf *5*, 54-57.

Hulot, J.S., Demolis, J.L., Riviere, R., Strabach, S., Christin-Maitre, S., and Funck-Brentano, C. (2003). Influence of endogenous oestrogens on QT interval duration. Eur Heart J *24*, 1663-1667.

Inoue, H., and Yamanaka, S. (2011). The use of induced pluripotent stem cells in drug development. Clin Pharmacol Ther *89*, 655-661.

Itzhaki, I., Maizels, L., Huber, I., Zwi-Dantsis, L., Caspi, O., Winterstern, A., Feldman, O., Gepstein, A., Arbel, G., Hammerman, H.*, et al.* (2011). Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. Nature *471*, 225-229.

Kannankeril, P., Roden, D.M., and Darbar, D. (2010). Drug-induced long QT syndrome. Pharmacol Rev *62*, 760-781.

Kannankeril, P.J., Roden, D.M., Norris, K.J., Whalen, S.P., George, A.L., Jr., and Murray, K.T. (2005). Genetic susceptibility to acquired long QT syndrome: pharmacologic challenge in first-degree relatives. Heart Rhythm *2*, 134-140.

Karakikes, I., Senyei, G.D., Hansen, J., Kong, C.W., Azeloglu, E.U., Stillitano, F., Lieu, D.K., Wang, J., Ren, L., Hulot, J.S.*, et al.* (2014). Small molecule-mediated directed differentiation

CONFIDENTIEL

of human embryonic stem cells toward ventricular cardiomyocytes. Stem Cells Transl Med *3*, 18-31.

Keller, G.A., and Di Girolamo, G. (2010). Prokinetic agents and QT prolongation: a familiar scene with new actors. Curr Drug Saf *5*, 73-78.

Langmead, B., and Salzberg, S.L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. Nat Methods *9*, 357-359.

Leonoudakis, D., Conti, L.R., Anderson, S., Radeke, C.M., McGuire, L.M., Adams, M.E., Froehner, S.C., Yates, J.R., 3rd, and Vandenberg, C.A. (2004). Protein trafficking and anchoring complexes revealed by proteomic analysis of inward rectifier potassium channel (Kir2.x)-associated proteins. J Biol Chem *279*, 22331-22346.

Levy, D.I., Cepaitis, E., Wanderling, S., Toth, P.T., Archer, S.L., and Goldstein, S.A. (2010). The membrane protein MiRP3 regulates Kv4.2 channels in a KChIP-dependent manner. J Physiol *588*, 2657-2668.

Liang, P., Lan, F., Lee, A.S., Gong, T., Sanchez-Freire, V., Wang, Y., Diecke, S., Sallam, K., Knowles, J.W., Wang, P.J.*, et al.* (2013). Drug screening using a library of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes reveals disease-specific patterns of cardiotoxicity. Circulation *127*, 1677-1691.

Liu, Z., Liu, X., Yu, H., Pei, J., Zhang, Y., Gong, J., and Pu, J. (2015). Common Variants in TRDN and CALM1 Are Associated with Risk of Sudden Cardiac Death in Chronic Heart Failure Patients in Chinese Han Population. PLoS One *10*, e0132459.

Lundy, S.D., Zhu, W.Z., Regnier, M., and Laflamme, M.A. (2013). Structural and functional maturation of cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. Stem Cells Dev *22*, 1991-2002.

Maguy, A., Hebert, T.E., and Nattel, S. (2006). Involvement of lipid rafts and caveolae in cardiac ion channel function. Cardiovasc Res *69*, 798-807.

CONFIDENTIEL

Makkar, R.R., Fromm, B.S., Steinman, R.T., Meissner, M.D., and Lehmann, M.H. (1993). Female gender as a risk factor for torsades de pointes associated with cardiovascular drugs. JAMA *270*, 2590-2597.

Mann, D.A. (2015). Human induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes for toxicology testing. Expert Opin Drug Metab Toxicol *11*, 1-5.

McIntyre, L.M., Lopiano, K.K., Morse, A.M., Amin, V., Oberg, A.L., Young, L.J., and Nuzhdin, S.V. (2011). RNA-seq: technical variability and sampling. BMC Genomics *12*, 293.

Moretti, A., Bellin, M., Welling, A., Jung, C.B., Lam, J.T., Bott-Flugel, L., Dorn, T., Goedel, A., Hohnke, C., Hofmann, F.*, et al.* (2010). Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome. N Engl J Med *363*, 1397-1409.

Moss, A.J., and Robinson, J. (1992). Clinical features of the idiopathic long QT syndrome. Circulation *85*, I140-144.

Nabi, I.R. (2009). Cavin fever: regulating caveolae. Nat Cell Biol *11*, 789-791.

Navarrete, E.G., Liang, P., Lan, F., Sanchez-Freire, V., Simmons, C., Gong, T., Sharma, A., Burridge, P.W., Patlolla, B., Lee, A.S.*, et al.* (2013). Screening drug-induced arrhythmia [corrected] using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes and low-impedance microelectrode arrays. Circulation *128*, S3-13.

Nozaki, Y., Honda, Y., Tsujimoto, S., Watanabe, H., Kunimatsu, T., and Funabashi, H. (2014). Availability of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in assessment of drug potential for QT prolongation. Toxicol Appl Pharmacol *278*, 72-77.

Odening, K.E., and Koren, G. (2014). How do sex hormones modify arrhythmogenesis in long QT syndrome? Sex hormone effects on arrhythmogenic substrate and triggered activity. Heart Rhythm *11*, 2107-2115.

Paulussen, A.D., Gilissen, R.A., Armstrong, M., Doevendans, P.A., Verhasselt, P., Smeets, H.J., Schulze-Bahr, E., Haverkamp, W., Breithardt, G., Cohen, N.*, et al.* (2004). Genetic variations of KCNQ1, KCNH2, SCN5A, KCNE1, and KCNE2 in drug-induced long QT syndrome patients. J Mol Med (Berl) *82*, 182-188.

CONFIDENTIEL

Petropoulou, E., Jamshidi, Y., and Behr, E.R. (2014). The genetics of pro-arrhythmic adverse drug reactions. Br J Clin Pharmacol *77*, 618-625.

Pfeufer, A., Sanna, S., Arking, D.E., Muller, M., Gateva, V., Fuchsberger, C., Ehret, G.B., Orru, M., Pattaro, C., Kottgen, A.*, et al.* (2009). Common variants at ten loci modulate the QT interval duration in the QTSCD Study. Nat Genet *41*, 407-414.

Rajab, A., Straub, V., McCann, L.J., Seelow, D., Varon, R., Barresi, R., Schulze, A., Lucke, B., Lutzkendorf, S., Karbasiyan, M.*, et al.* (2010). Fatal cardiac arrhythmia and long-QT syndrome in a new form of congenital generalized lipodystrophy with muscle rippling (CGL4) due to PTRF-CAVIN mutations. PLoS Genet *6*, e1000874.

Roden, D.M. (2006). Long QT syndrome: reduced repolarization reserve and the genetic link. J Intern Med *259*, 59-69.

Roden, D.M. (2008a). Cellular basis of drug-induced torsades de pointes. Br J Pharmacol *154*, 1502-1507.

Roden, D.M. (2008b). Repolarization reserve: a moving target. Circulation *118*, 981-982.

Rolland, T., Tasan, M., Charloteaux, B., Pevzner, S.J., Zhong, Q., Sahni, N., Yi, S., Lemmens, I., Fontanillo, C., Mosca, R.*, et al.* (2014). A proteome-scale map of the human interactome network. Cell *159*, 1212-1226.

Sager, P.T., Gintant, G., Turner, J.R., Pettit, S., and Stockbridge, N. (2014). Rechanneling the cardiac proarrhythmia safety paradigm: a meeting report from the Cardiac Safety Research Consortium. Am Heart J *167*, 292-300.

Sarganas, G., Garbe, E., Klimpel, A., Hering, R.C., Bronder, E., and Haverkamp, W. (2014). Epidemiology of symptomatic drug-induced long QT syndrome and Torsade de Pointes in Germany. Europace *16*, 101-108.

Schaaf, S., Shibamiya, A., Mewe, M., Eder, A., Stohr, A., Hirt, M.N., Rau, T., Zimmermann, W.H., Conradi, L., Eschenhagen, T.*, et al.* (2011). Human engineered heart tissue as a versatile tool in basic research and preclinical toxicology. PLoS One *6*, e26397.

CONFIDENTIEL

Sinnecker, D., Goedel, A., Dorn, T., Dirschinger, R.J., Moretti, A., and Laugwitz, K.L. (2013). Modeling long-QT syndromes with iPS cells. J Cardiovasc Transl Res *6*, 31-36.

Sinnecker, D., Laugwitz, K.L., and Moretti, A. (2014). Induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes for drug development and toxicity testing. Pharmacol Ther *143*, 246-252.

Soyka, L.F., Wirtz, C., and Spangenberg, R.B. (1990). Clinical safety profile of sotalol in patients with arrhythmias. Am J Cardiol *65*, 74A-81A; discussion 82A-83A.

Terrenoire, C., Wang, K., Tung, K.W., Chung, W.K., Pass, R.H., Lu, J.T., Jean, J.C., Omari, A., Sampson, K.J., Kotton, D.N.*, et al.* (2013). Induced pluripotent stem cells used to reveal drug actions in a long QT syndrome family with complex genetics. J Gen Physiol *141*, 61-72.

Trapnell, C., Pachter, L., and Salzberg, S.L. (2009). TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. Bioinformatics *25*, 1105-1111.

Trapnell, C., Williams, B.A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., van Baren, M.J., Salzberg, S.L., Wold, B.J., and Pachter, L. (2010). Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. Nat Biotechnol *28*, 511-515.

Turnbull, I.C., Karakikes, I., Serrao, G.W., Backeris, P., Lee, J.J., Xie, C., Senyei, G., Gordon, R.E., Li, R.A., Akar, F.G.*, et al.* (2014). Advancing functional engineered cardiac tissues toward a preclinical model of human myocardium. FASEB J *28*, 644-654.

Wang, Y., Liang, P., Lan, F., Wu, H., Lisowski, L., Gu, M., Hu, S., Kay, M.A., Urnov, F.D., Shinnawi, R.*, et al.* (2014). Genome editing of isogenic human induced pluripotent stem cells recapitulates long QT phenotype for drug testing. J Am Coll Cardiol *64*, 451-459.

Yang, P., Kanki, H., Drolet, B., Yang, T., Wei, J., Viswanathan, P.C., Hohnloser, S.H., Shimizu, W., Schwartz, P.J., Stanton, M.*, et al.* (2002). Allelic variants in long-QT disease genes in patients with drug-associated torsades de pointes. Circulation *105*, 1943-1948.

Zanetti, L.A. (1993). Sotalol: a new class III antiarrhythmic agent. Clin Pharm *12*, 883-891.

CONFIDENTIEL

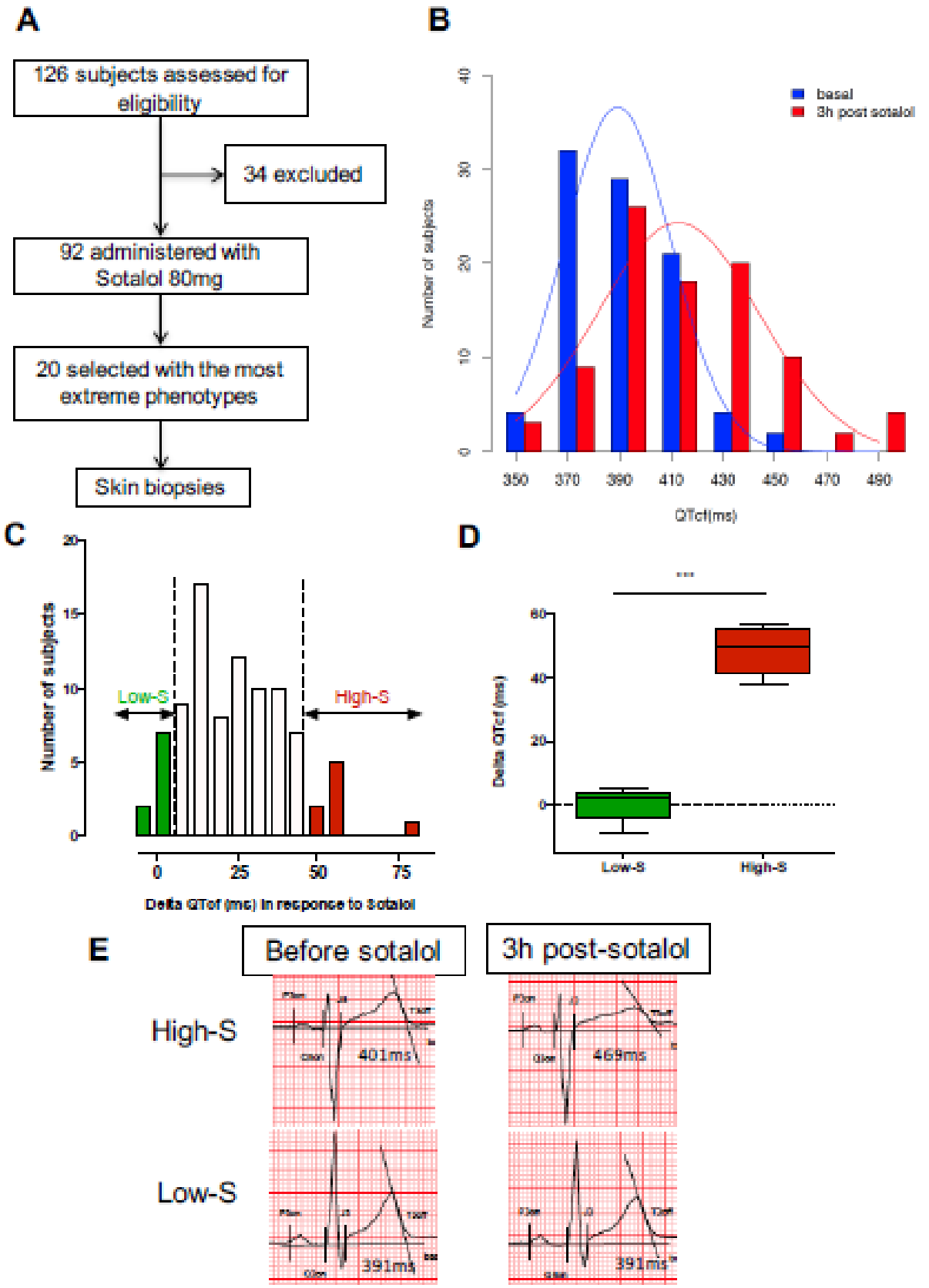


Figure 1: QTcf changes following Sotalol administration in healthy volunteers. A, Flow chart of the clinical study. **B,** Distribution of QTcf duration before (blue) and 3 hours after sotalol

intake (red). **C,** Distribution of delta change in QTcf showing the wide inter-individual variability in response to the same pharmacological stimulation. Subjects with the most extreme responses were selected as low sensitive (low-S) or high- sensitive (high-S) as indicated in green and red respectively. **D,** Average delta change in QTcf in the two groups of selected subjects. *** $p<0.001$ **E,** Typical ECG recordings before and after sotalol intake in a high-S subject (upper panels) and in a low-S subject (lower panels).

CONFIDENTIEL

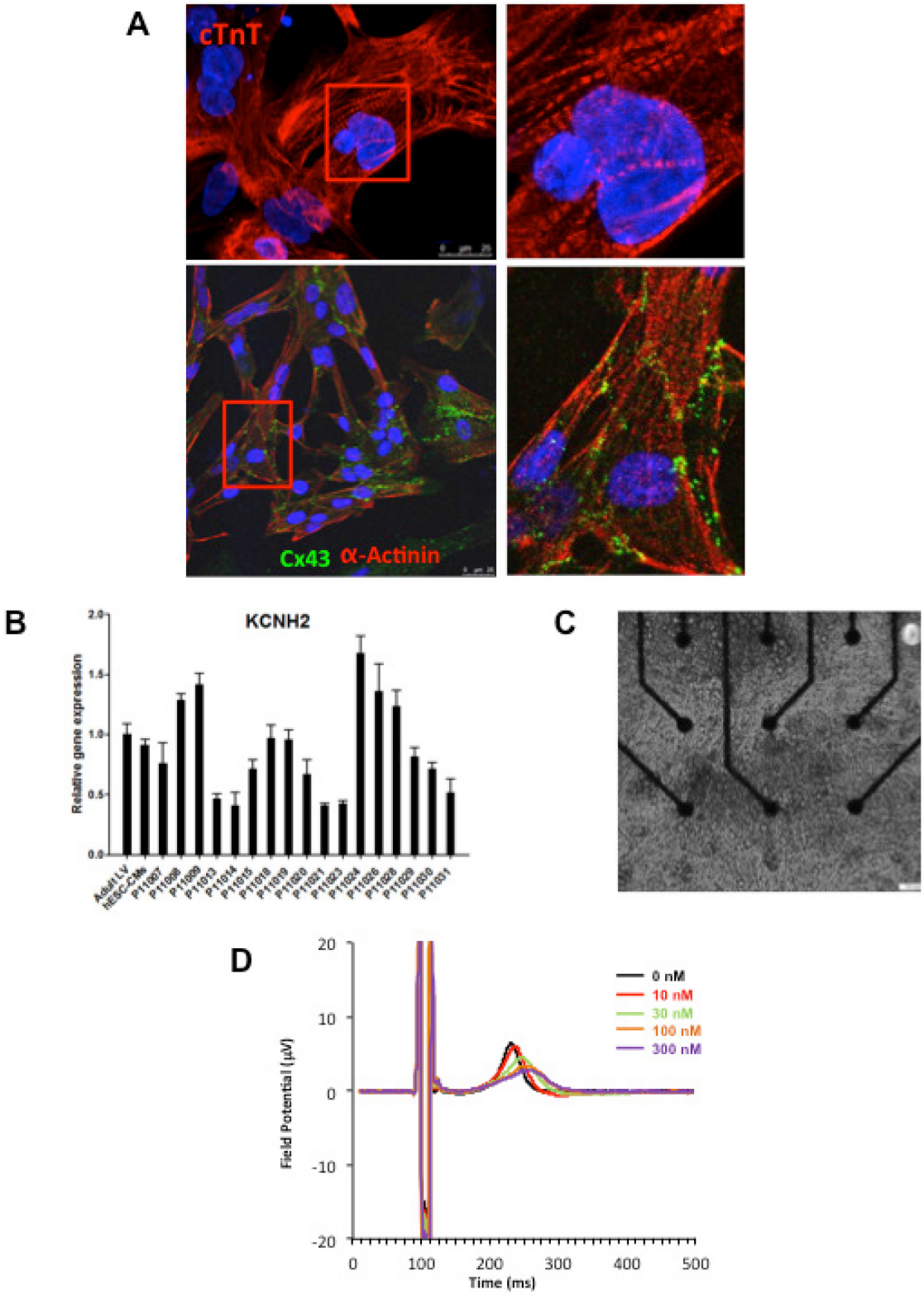


Figure 2: Expression of sarcomeric proteins and ion channels in human iPSC-CMs. A, Confocal microscopy imaging of Troponin T (top), alpha-actinin and connexin 43 (bottom) in single generated iPSC-CMs (from line P11015). Nuclei are stained with DAPI (Blue). **B,** Gene expression of cardiac ion channel *KCNH2* (encoding hERG) by quantitative PCR; Adult LV

tissue is used as a positive control and level of expression in human ESC-derived cardiomyocytes as a comparator. **C,** Example of monolayer of iPSC-CMs seeded and attached on a 6-well MEA chip, each well containing 9 microelectrodes (black). See also movie S1. **D,** Representative field potential duration (FPD) recorded before and after application of the hERG blocker E4031 (from line P11007).

CONFIDENTIEL

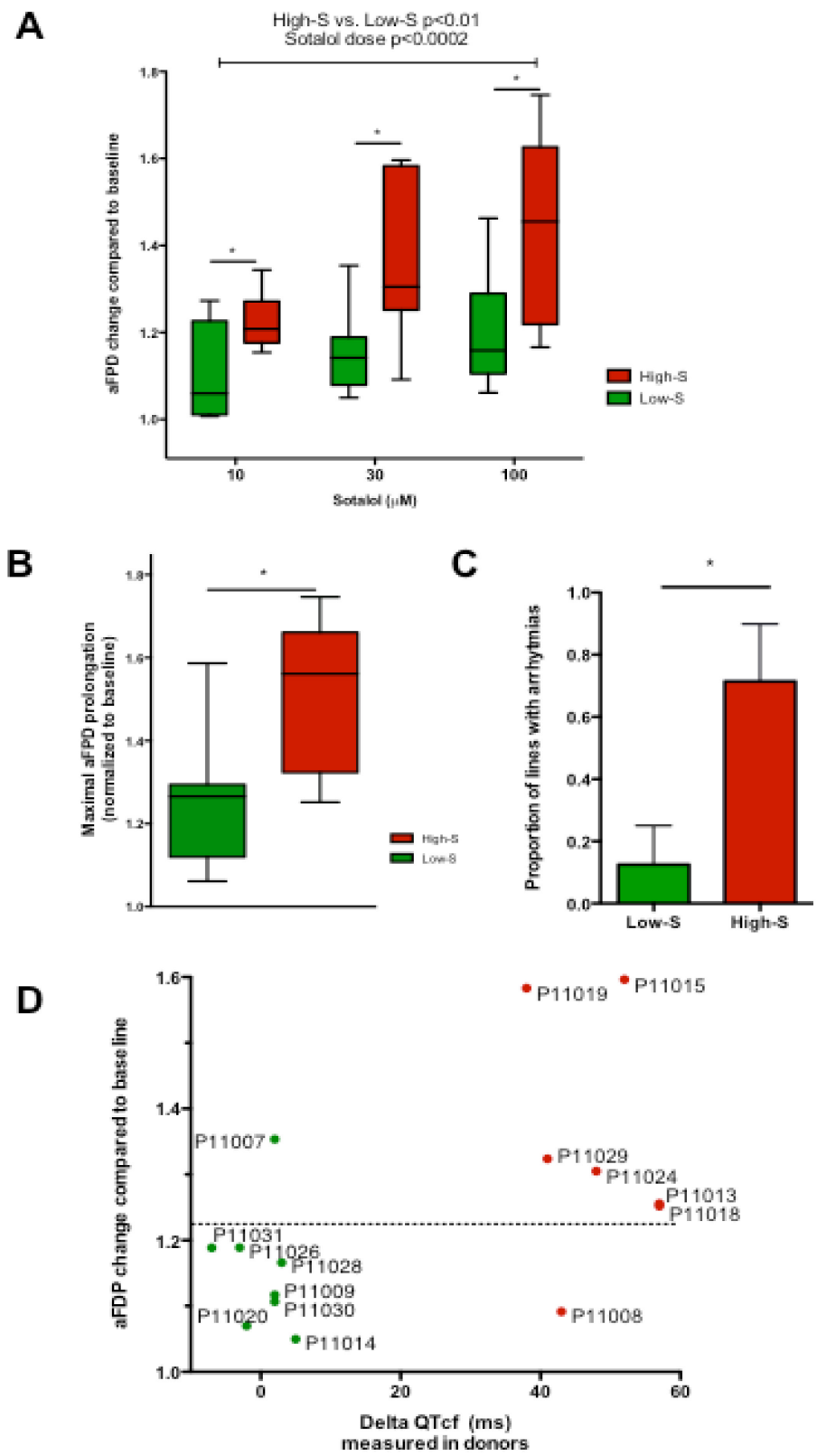


Figure 3. Differences in iPSC-CMs responses to Sotalol stimulation according to clinical sensitivity to Sotalol. A, Adjusted FPD (aFPD) measured in iPSC-CMs derived from subjects with low-sensitivity (green) vs. high-sensitivity (red) in response to increasing concentrations

of sotalol. aFPD are normalized to baseline values to account for inter-lines variability in aFPD values. Two-way analysis of variance demonstrates a significant influence of sotalol concentrations ($p<0.0002$) and of the sensitivity group ($p<0.01$). * $p<0.05$ for post-hoc comparison between groups; high-S vs. low-S. N=2-5 recordings per cell lines per concentrations. **B,** Maximal change in aFPD observed during sotalol stimulation. **C,** Proportion of observed arrhythmias after sotalol application. **D,** Data plot graph showing the correlation between aFPD observed in iPSC-CMs and the DeltaQTcf observed in donors. The aFPD data are reported for sotalol 30 µM concentration. Data points are clustered in two distinct groups. With the exception of two lines (one line in each group), a threshold a 25% in aFPD change (dashed line) correctly discriminates cells from both groups.

CONFIDENTIEL

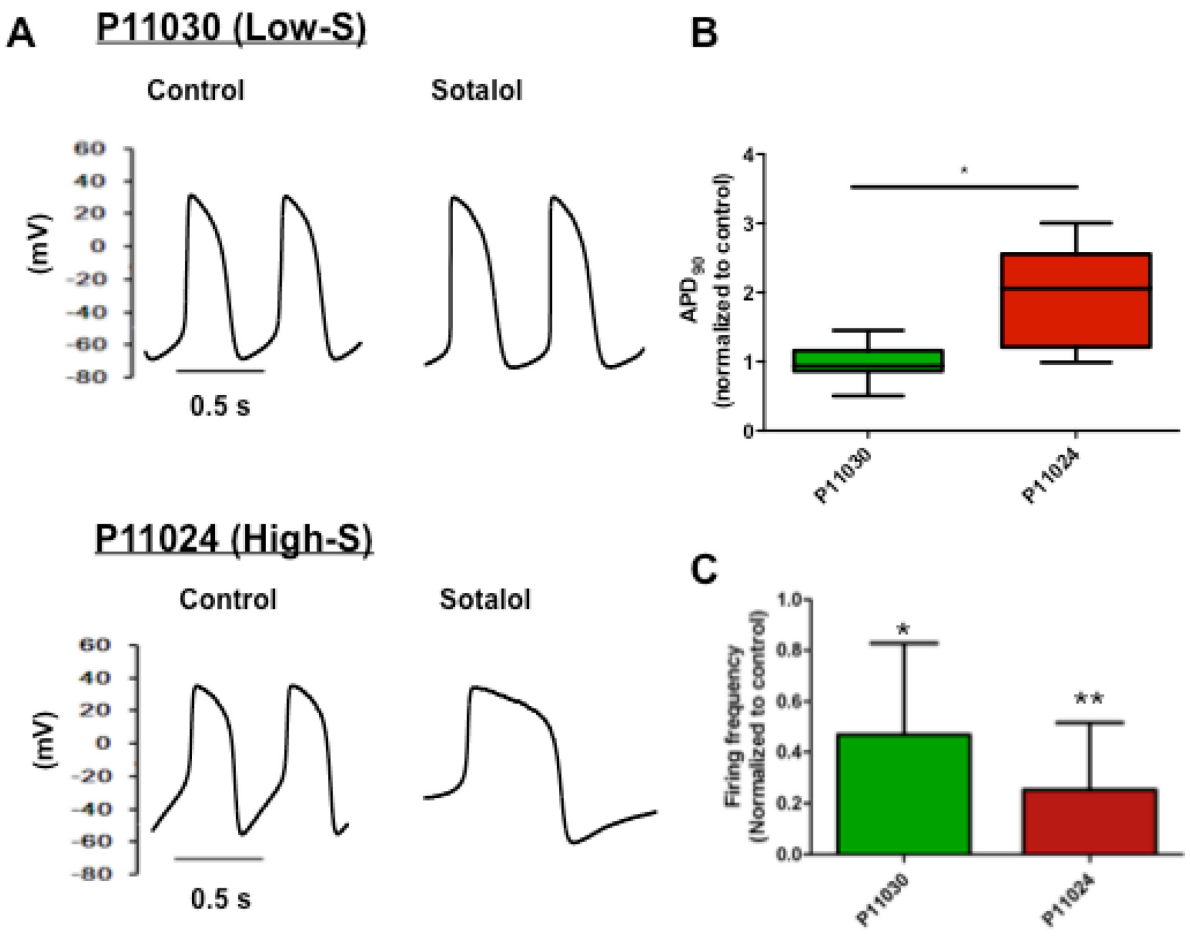


Figure 4: Patch-clamp analysis of action potential (AP) in representative iPSC-CMs. A, Representative AP tracings of the iPSC-CMs generated from the low-S (P11030) and high-S (P11024) lines before and after sotalol application. **B,** APD_{90} in sotalol-treated condition (100 µM, 2 min) normalized to the corresponding drug-free controls. *p<0.05, high-S vs. low-S. **C,** Normalized AP firing frequency *p<0.05; **p<0.01, Student's paired t-test, sotalol-treated vs control in each group.

CONFIL

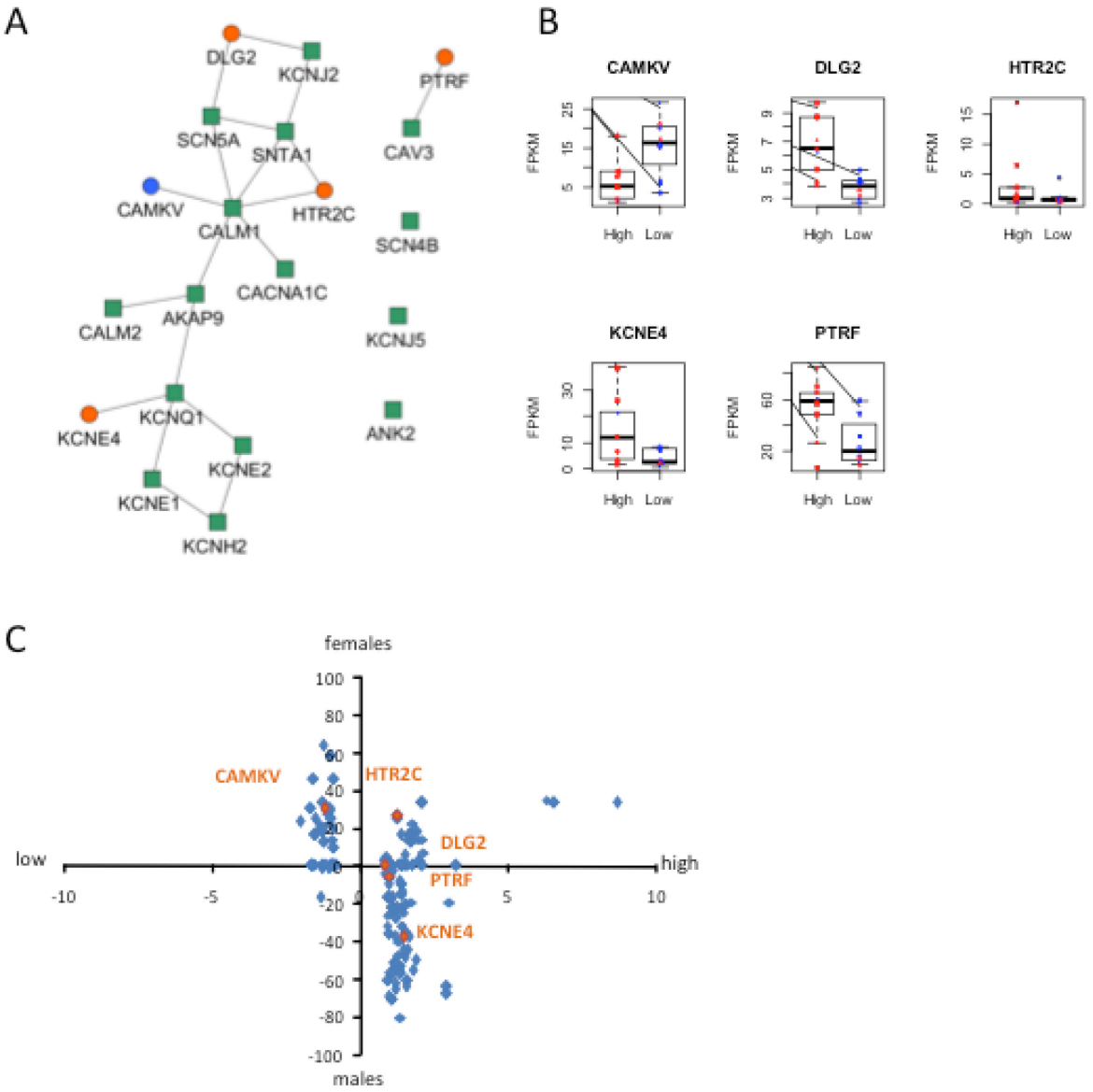


Figure 5: Identification of dysregulated genes as direct neighbors of QT-associated network in high-S iPSC-CMs. A. Known LQTS genes were used as seed nodes (green squares) in the human interactome and 5 differentially expressed direct neighbors were identified (circles) (path length 1). Up-regulated genes are colored orange, down-regulated genes are in blue. **B**. Relative expression of identified genes in each group. Males are represented in blue and females in red. Individual samples are represented by the same symbols in all diagrams. **C**. Comparison of the log2-fold changes between the high-S and the low-S groups with the normalized counts of how often a gene (blue or orange dots) was found to be up- or down-regulated between the male and female groups. As there are more females

in the high-S group and more males in the low-S groups, report of genes in the lower left or upper right quadrants indicate a gender-specific effect while the lower right and upper left quadrants argue for the lack of gender-specific effect. With the exception of *HTR2C*, dysregulation of all other candidate genes was suspected to occur independently of gender.

CONFIDENTIEL

Troisième partie : La génération de cellules souches pluripotentes induites issues de patients pour le traitement de maladies cardiaques.

CONFIDENTIEL

Dorota Jeziorowska, Agathe Korniat, Joe-Elie Salem, Kenneth Fish, Jean-Sébastien Hulot

Introduction : Les cellules souches pluripotentes induites (iPSC) représentent une source cellulaire attractive pour la modélisation de maladies, des essais cliniques de médicaments et des thérapies cellulaires en particulier pour des maladies cardiovasculaires.

Domaines couverts : Le développement de protocoles efficaces pour générer des populations pures de cardiomyocytes est une condition préalable pour fournir des essais reproductibles, fiables et valides. Différentes techniques ont été récemment proposées qui permettent une production de cardiomyocytes de haute qualité et avec un grand rendement. En outre, de nouvelles techniques d'édition génomique offrent de multiples possibilités pour manipuler le génome d'IPSC issues de patients générant ainsi des lignées iPSC isogéniques. Les techniques d'édition génomique permettront également l'ingénierie d'iPSC pour les rendre adaptées afin d'être utilisées en thérapie cellulaire.

Avis d'expert : Depuis leur découverte, les iPSC sont considérées comme un outil qui va révolutionner la façon dont les maladies humaines sont étudiées. Au cours des dernières années, différents protocoles ont été développés pour assurer une différentiation reproductible et efficace des iPSC, y compris dans les cellules cardiaques et vasculaires. L'introduction récente des techniques d'édition génomique permet désormais la manipulation ciblée du génome d'iPSC issues de patients et de lignées contrôle. Cette approche permettrait de répondre à quelques limites actuelles, y compris la génération de lignées isogéniques pour la modélisation de maladies et des lignées de qualité clinique pour des thérapies de remplacement.

CONFIDENTIEL

CONFIDENTIEL

EXPERT OPINION

1. Introduction
2. Differentiating iPSCs into cardiomyocytes
3. Patient-specific iPSC for disease modeling and drug testing
4. Editing patient-specific iPSC
5. Replacement therapy with pluripotent stem cells: current lessons and perspectives for iPSCs
6. Clinical-grade iPSCs for replacement therapy
7. Conclusion
8. Expert opinion

informa healthcare

Expert Opin. Biol. Ther. Downloaded from informahealthcare.com by INSERM on 07/07/15
For personal use only.

Generating patient-specific induced pluripotent stem cells-derived cardiomyocytes for the treatment of cardiac diseases

Dorota Jeziorowska, Agathe Korniat, Joe-Elie Salem, Kenneth Fish & Jean-Sébastien Hulot[†]
[†]*Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMRS 1166 ICAN, F-75013, Paris, France*

Introduction: Induced pluripotent stem cells (iPSC) represent an appealing cell source to develop disease-modeling assays, drug testing assays and cell-based replacement therapies especially for cardiac disorders.
Areas covered: The development of efficient protocols to generate pure populations of cardiac myocytes is a prerequisite to provide reproducible, robust and valid assays. Different techniques have been recently proposed that allow production of high-yield high-quality cardiomyocytes. In addition, the newly developed genome-editing techniques offer multiple opportunities to manipulate the genome of patient-specific iPSC thus generating syngeneic iPSC lines. Genome-editing techniques will also allow engineering of iPSC to make them suitable for replacement therapies.
Expert opinion: Since their discovery, iPSCs have shown promise to revolutionize the way human diseases are studied. During the last years, different protocols have been developed to achieve reproducible and efficient differentiation of iPSCs including in cardiac and vascular cells. The recent introduction of the genome-editing techniques now allow targeted manipulation of the genome of patient-specific and control iPSCs lines. This approach would help to address a couple of current limitations, including the generation of isogenic lines for disease modeling and of clinical-grade lines for replacement therapy.

Keywords: disease models, drug testing, genome editing, pluripotent stem cells

Expert Opin. Biol. Ther. [Early Online]

1. Introduction

Cardiovascular disease is a leading cause of morbidity and mortality worldwide. Different projections show the rapid rise of cardiovascular mortality that is anticipated to account for more than three-quarters of deaths worldwide in the upcoming decade. These epidemiological data urge for the development of better treatment options whose development is currently limited by the paucity of models in predictive pharmacology, toxicology and personalized medicine.

Since the breakthrough of cell reprogramming in 2006, induced pluripotent stem cells (iPSCs) have become powerful tools for research and drug discovery. iPSCs are generated by reprogramming somatic cells (such as dermal fibroblasts or white blood cells) into an embryonic pluripotent state by the forced expression of a defined set of transcription factors [1]. Like embryonic stem cells (ESCs), iPSCs are multipotent and clonogenic and have the ability to differentiate into cell types of all three germ layers, including cardiac and vascular cells [2-4]. iPSCs represent an alternative source of human stem cell that can address some of the ethical and technical limitations encountered with human ESCs. In addition, iPSC are

10.1517/14712598.2015.1064109 © 2015 Informa UK, Ltd. ISSN 1471-2598, e-ISSN 1744-7682

All rights reserved: reproduction in whole or in part not permitted
RIGHTSLINK

Article highlights.

- Induced pluripotent stem cells (iPSC) represent an appealing cell source to develop disease-modeling assays, drug testing assays and cell-based replacement therapies.
- Differentiation protocols are progressively refined to ensure the production of high-yield high-quality cardiomyocytes.
- iPSC differentiation into cardiomyocytes can be conducted in conventional 2D culture or in 3D structures.
- Multiple monogenic cardiac disorders are reproduced in patient-specific iPSC-derived cardiomyocytes.
- The emergence of genome-editing techniques offers novel opportunities to manipulate the genome of iPSC.

This box summarizes key points contained in the article.

inherently patient- and disease-specific thus making it possible to reproduce inherited cardiac disorders *in vitro* and test patient-specific pharmacological therapies for cardiovascular diseases. Finally, iPSCs may provide regenerative therapies for cardiovascular diseases.

This article will highlight the research progress toward the used of iPSCs in cardiac diseases modeling, drug discovery and cardiac regeneration.

2. Differentiating iPSCs into cardiomyocytes

Different studies have clearly established that iPSCs can differentiate into myocytes with the structural and functional properties of cardiomyocytes [4,5]. Applying knowledge in developmental biology has guided the development of most of these protocols. *In vitro* cardiomyocyte differentiation indeed mimics the process of cardiogenesis *in vivo* [6] with the initial induction of mesoderm and then of cardiac precursors. The main steps in differentiation and current protocols are reported in **Figure 1**. The generation of human iPSCs-derived cardiomyocytes has primarily been performed through embryoid body formation [7,8] but is highly increased when human iPSCs are exposed to activin A and bone morphogenic protein 4 [9]. More recently, differentiation protocols into 2D systems have been proposed but required the use of more specific media [10]. These media include CDM3 or RPMI supplemented with B27 minus insulin with the addition of a GSK3-beta inhibitor (CHIR99021) during the first days of differentiation. It is also important to note that different types of cardiomyocytes, including atrial-, ventricular, and nodal-like cells are generated from the differentiation protocols. This heterogeneity might not be optimal for cellular assays or replacement therapies where highly homogenous populations of each cardiac subtype are more desirable. In a recent study, the 2D and 3D systems for deriving cardiomyocytes were compared [11]. It appeared that 3D cells are highly enriched in non-cardiac regulators (homeobox genes) as well as genes involved into non-cardiac differentiation. Therefore the 2D formats express higher levels of pan-cardiac markers, which led to a higher yield of cardiomyocytes [11].

In addition [11], the temporal manipulation of key pathways is critical in driving cardiac differentiation. The inhibition of the Wnt pathway is pivotal to obtain cardiomyocytes but also to determine the type of generated cardiomyocytes. The inhibition of the Wnt signaling pathway by IWR1 in later stages of the differentiation process has recently been associated with a marked increase in the production of ventricular-like cardiomyocytes [12-15]. IWR-1 stabilizes the β-catenin destruction complex but other Wnt inhibitors can be used. For example, IWP-2 and Wnt-C59 inhibit the palmitoyltransferase PORCN involved in the Wnt production. Using these compounds however resulted in the production of mixed populations of cardiomyocytes with ventricular-like cells being predominant but associated with a significant proportion of atrial- and nodal-like cells [10].

Different cell-sorting strategies based on surface markers or differences in glucose and lactate metabolism have also been proposed to generate highly purified populations of PSCs-derived cardiomyocytes (up to 99% purity) [16,17].

Finally, using the current techniques of differentiation, hPSCs-derived cardiomyocytes appear to be less mature than adult cardiomyocytes. Maturation of hPSCs-derived cardiomyocytes is however improved on the long term (> 80 days of *in vitro* differentiation and culture) [18] or by inducing adult-like metabolism with specific medium [19]. In addition, newly developed 2D protocols might promote higher maturation of iPSC-derived cardiomyocytes as compared to 3D methods [11].

3. Patient-specific iPSC for disease modeling and drug testing

The discovery of iPSC technology has opened new avenues into *in vitro* modeling of human cardiovascular diseases and drug testing. On one hand, iPSC-derived cardiomyocytes represent a unique alternative to primary human cardiac tissue. iPSCs can virtually be cultured and differentiated indefinitely thus offering a unique opportunity to develop a human-based cellular testing platform. On the other hand, iPSCs can be patient-specific, meaning that iPSCs will carry the patient's genetic background and will exhibit patient in a dish disease phenotypes. For these reasons, iPSCs have revealed extremely powerful to model inherited cardiac disease. The most extensively studied models are those of arrhythmic disorders caused by mutations in cardiac ion channels (or channelopathies). iPSC-derived cardiomyocytes from patients with long-QT syndrome type 1 and 2 (i.e., carrying mutations in potassium ion channels) display prolonged action potentials and a higher risk to develop arrhythmias thus mimicking the clinical phenotype observed in those patients [20-22]. Similarly, long QT syndrome type 3 caused by gain of function mutations in the sodium ion

Expert Opin. Biol. Ther. Downloaded from informahealthcare.com by INSERM on 07/07/15
For personal use only.

RIGHTSLINK

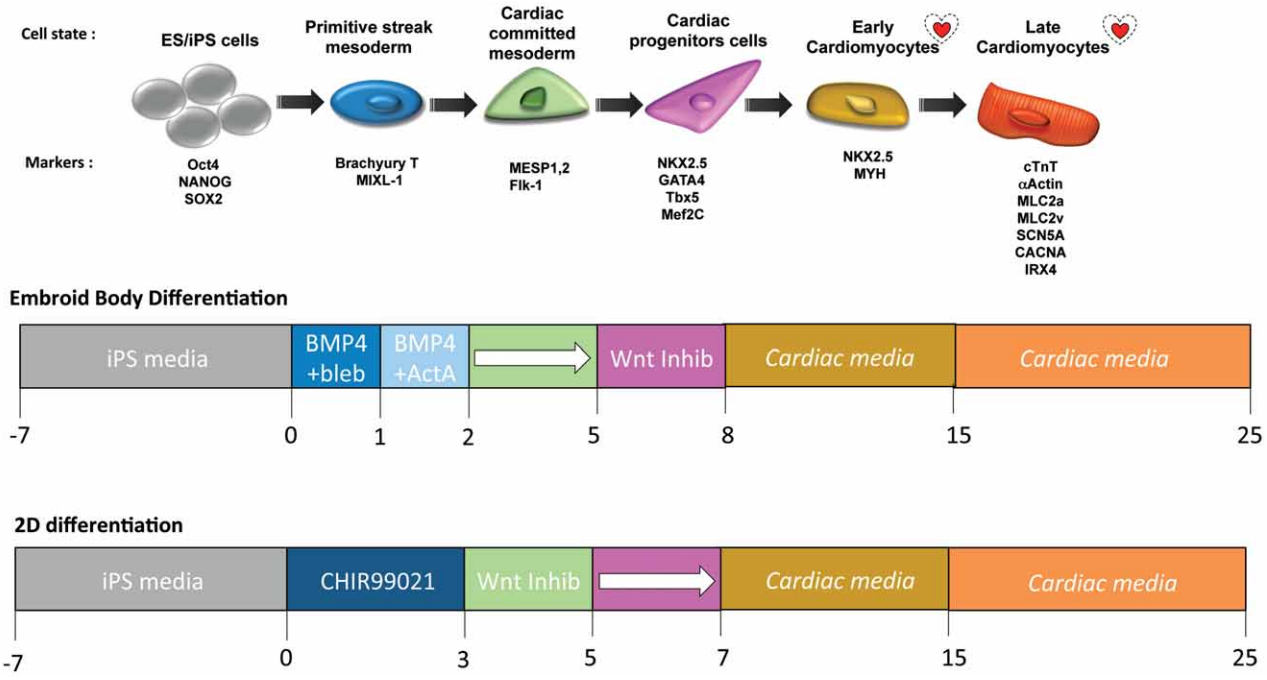


Figure 1. Schematic representation of cardiac differentiation from induced pluripotent stem cells. The progressive induction of mesoderm and mesoderm-committed cells to cardiomyocytes is represented with corresponding molecular markers. Beating cells are indicated by a red heart symbol. The key media and agents used in currents 3D and 2D protocols are reported.

ES: Embryonic stem; iPS: Induced pluripotent stem.

channel-encoding gene SCN5A and type 8 caused by mutations in the L-type calcium channel Ca(v)1.2 have been modeled by iPSC-derived cardiomyocytes [23,24].

Another class of cardiac disorders that have been reproduced using iPSC are sarcomeric cardiomyopathies caused by mutations in contractile proteins. The first example is hypertrophic cardiomyopathy that is characterized by asymmetric thickening of the left cardiac wall. In a first study focusing on the LEOPARD syndrome [25], a multi-organ condition frequently associated with hypertrophic cardiomyopathy, it was shown that iPSC-derived cardiomyocytes have increased median surface and a higher degree of sarcomeric organization, features that correlate with a hypertrophic state. In another study, iPSC were derived from patients carrying a hereditary HCM missense mutation in the MYH7 gene [26]. Diseased iPSC-derived cardiomyocytes display numerous aspects of the HCM phenotype including cellular enlargement and contractile arrhythmias. Similar examples can be reported for dilated cardiomyopathy characterized by ventricular dilation and systolic dysfunction [27-30]. iPSC derived from patients with familial dilated cardiomyopathy carrying a cardiac troponin T mutation exhibit irregular organization of sarcomeres and reduction in contractility [31].

Interestingly, these studies were not only helpful to reproduce cardiac disorders in a dish but also to identify molecular mechanisms underlying the disease and test new-targeted therapies. In the case of chanelopathies, different drug combinations were able to eliminate iPSC-CM arrhythmias *in vitro* [22]. In another study on a long QT syndrome patient with complex genetics (i.e., a combination of *SCN5A* and *KCNH2* mutations), the pharmacological management of arrhythmias *in vivo* was first guided by *in vitro* testing in the patient-derived iPSC-cardiomyocytes [23]. From a more general viewpoint, iPSC-derived cardiomyocytes have been proposed as a surrogate for cardiotoxicity assessment, especially in the assessment of arrhythmias. QT prolonging drugs can indeed trigger changes in the electrical potential developed by iPSC-derived cardiomyocytes [32-34]. The optimal cell source for developing such a predictive drug testing assay however remains to be further determined. In a recent study, control iPSC were engineered to stably integrate dominant negative mutations in ion channel genes *KCNQ1* and *KCNH2*. The edited iPSC-derived cardiomyocytes then displayed characteristic long QT syndrome phenotype demonstrating the strong influence of key genetic determinants [35,36]. In the general population, the risk of developing cardiac side effects markedly varies between subjects. It is likely that some rare individuals present with a predisposing genetic makeup but whether this predisposition can be modeled using iPSCs remain to be determined.

Finally, beyond pharmacological testing, iPSC-derived cardiomyocytes have also proved useful for testing gene

Expert Opin. Biol. Ther. Downloaded from informahealthcare.com by INSERM on 07/07/15
For personal use only.

RIGHTSLINK

transfer [37]. The effectiveness of different viral gene transfer systems is influenced by the differentiation state. Interestingly, adeno-associated vectors (AAV) severely diminished the viability of undifferentiated pluripotent stem cells by induction of cell cycle arrest and apoptosis. On the other hand, AAVs revealed as vector of choices to perform gene transfer in iPSC-derived cardiomyocytes. The transduction efficiency was also increasing with differentiation, in line with the progressive expression of AAV receptors.

4. Editing patient-specific iPSC

In the context of human genetic cardiac diseases, the use of cardiomyocytes derived from patient-specific iPSCs appears clearly to be a valuable and powerful study model. However it requires the correction of disease-causing mutations in order to obtain 'diseased' versus 'control' model cell lines. Indeed, when working with patient-specific cells, there is always a dilemma to set the correct control. New advances in the field of genome engineering provide a variety of molecular tools to specifically target and edit the genome. They act as molecular scissors that are able to bind specifically a targeted position and to cut along the sequence to be modified, causing double-strand DNA breaks. This technology harnesses the cell endogenous mechanisms to repair the induced break by natural processes of homologous recombination (HR) or non-homologous end joining (NHEJ). Based on their features, engineered nucleases were chosen as potent tools for genome editing. The first attempt of gene targeting in iPSC was realized with Zinc-finger nucleases (ZFNs). It gave a 60% transfection rate and 3% of cells were eventually genetically modified [38]. Transcription activator-like effector nucleases quickly replace ZFN because of their higher efficiency and precision [39]. Fused to the Fok1 nuclease, a synthetic protein with DNA-binding domains can be designed and easily assembled to recognize any desired genomic sequence [40].

Most recently a new generation of tools has emerged: the CRISPR/Cas9 System (clustered regulatory interspaced short palindromic repeat/Cas9-based RNA-guided endonuclease). This system uses a short guide RNA, which drives a CRISPR-associated endonuclease (Cas9) to the targeted locus [41]. They are more efficient, easy to use and less tricky to generate than earlier technologies that require to make custom proteins for each DNA target [42]. The CRISPR technology is now widely used to edit the genome of multiple cells, including iPSCs. However, the off-target effects of engineered nucleases across the human genome are an ongoing problem [43]. To face this issue, a modified version of Cas9 enzyme called 'nickase' has been obtained with only one active nuclease domain [44]. Two different guide RNAs are co-expressed with Cas9 nickase to generate opposite strand nicks. Double nickase induce causing double-strand DNA breaks but reduce off-target effects and therefore increase specificity. The CRISPR/Cas9 System is a very flexible technology with potential unlimited applications consisting for example to activate or repress gene expression [45,46].

All of these molecular tools are now widely used to target the gene of interest and edit it. The approach allows the generation of syngeneic clones thus limiting inter-samples variability in iPSC-based modeling. Shunting the endogenous repair mechanism allows us to knock-out genes using the NHEJ or to correct the damaged site via the homologous recombination, using an undamaged template. This template is an exogenous donor plasmid that will carry the new sequence to be integrated in the genome. These tools can thus be used to generate large-scale deletions, gene disruption, DNA addition or single-nucleotide changes. Interestingly, these tools were primarily used to correct mutations in iPSC derived from patients with a given disease thus given a perfect control cell line that only differentiate at the corrected mutation level [30,47]. However, the genome-editing techniques allow the development of another research strategy where mutations of interest are introduced in a control iPSC line (**Figure 2**). This approach is appealing as genes of interest can be faster targeted in a given control iPSC thus providing fast-track information on their potential influence on a given phenotype. When compared with patient-specific iPSC, this approach also provides valuable information on the influence of the mutation of interest in different genetic backgrounds.

5. Replacement therapy with pluripotent stem cells: current lessons and perspectives for iPSCs

Different disorders, mainly through myocardial ischemia but also through idiopathic, congenital, drug-induced or infectious processes, can cause the loss of critical amount of cardiomyocytes. This loss initiates a cascade of detrimental events including the development of cardiac fibrosis, formation of a non-contractile scar tissue and promotion of ventricular remodeling. All these mechanisms can then lead to the development of heart failure and eventually death. Replacement of dead or dysfunctional cardiac myocytes through cell-based therapies has thus become an emerging and exciting strategy for the treatment of heart failure. However, human donor hearts and cardiomyocytes are in extremely limited supply, motivating a demand for alternative cardiomyocyte sources.

For successful replacement of cardiomyocytes, regardless of administration route, or anatomical source, pluripotent cells must have a number of key characteristics [48]. These include survival in the changing environment of the infarcted heart, proliferation and engraftment without taking on a tumorigenic phenotype and differentiation into cardiomyocytes that electrically couple to the remaining host cardiomyocytes. To date, stem cells administration has been tested mainly in patients with post-ischemic heart failure and marginally in patients with non-ischemic and congenital heart failure [49-54].

Expert Opin. Biol. Ther. Downloaded from informahealthcare.com by INSERM on 07/07/15
For personal use only.

RIGHTSLINK

Expert Opin. Biol. Ther. Downloaded from informahealthcare.com by INSERM on 07/07/15
For personal use only.

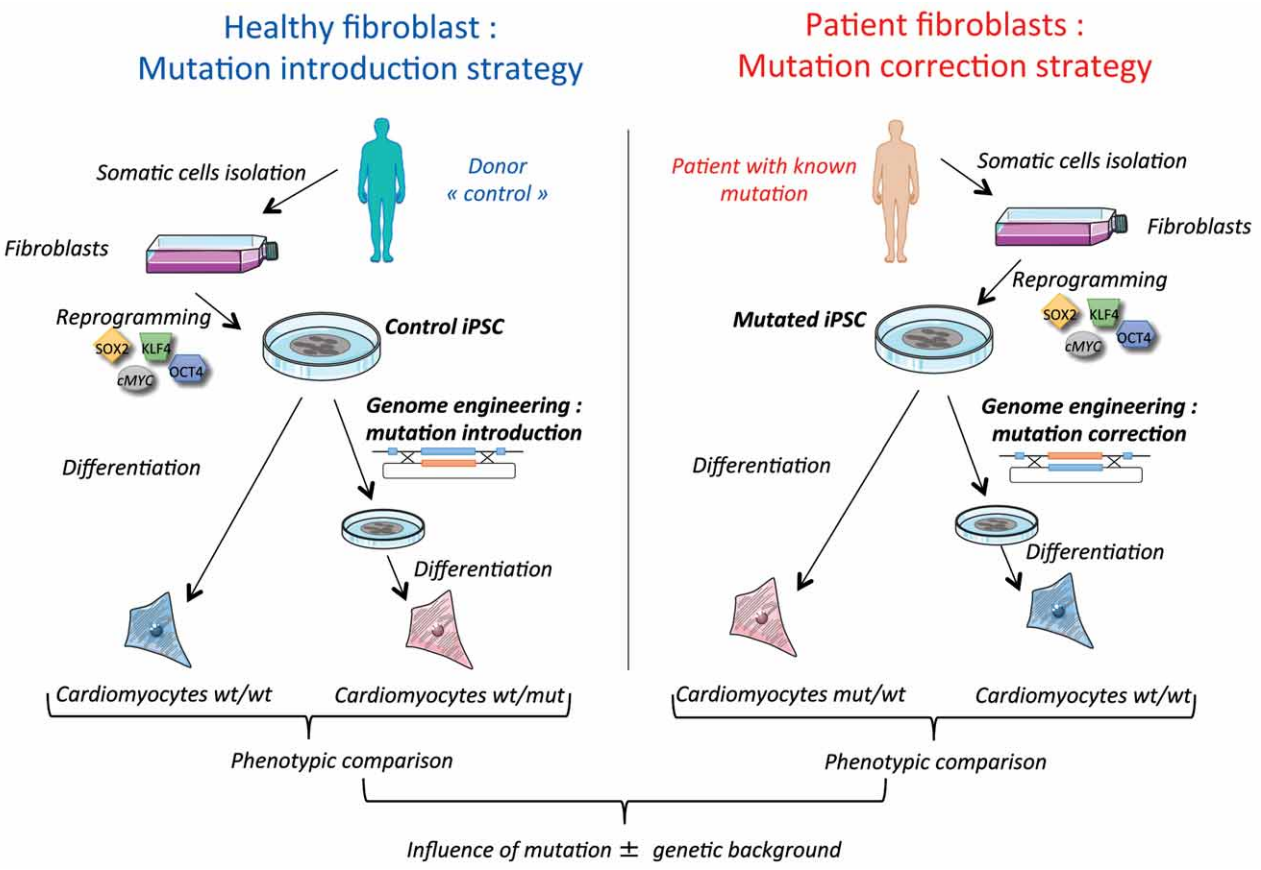


Figure 2. Experimental strategies for genome-editing in iPSC. In a patient-specific approach, iPSCs are generated from a patient with a known mutation; genome-editing techniques are then used to correct the mutation thus providing a syngeneic control iPSC clone. In a second strategy, a generic iPSC is used to introduce mutations of interest. Both approaches provide complementary information on the influence of the studied mutation and interactions with the genetic background.
iPSC: Induced pluripotent stem cells.

These early trials have provided important information for further developments in stem cell therapy including with iPSCs.

5.1 Preclinical studies using adult pluripotent stem cells

There have been numerous pre-clinical studies evaluating the potential use of adult pluripotent stem cells in the treatment of heart failure (recently reviewed elsewhere [49]). The sources of adult pluripotent stem cells include skeletal myoblasts, unfractionated bone marrow mononuclear cells, mesenchymal stem cells, CD34+ and CD133+ cells, adipose-derived cells and cardiac-derived progenitors [54]. Pre-clinical studies have the advantage over clinical trials because the animal model can be highly controlled in comparison to clinical trials where patients present with a broad spectrum of pathologies and co-morbidities. In the case of myocardial infarction models, preclinical protocols can now control the infarct size and the timing of therapeutic intervention. These studies allow for the longitudinal evaluation of regenerative mechanisms at tissue, cellular and molecular levels. There are reports translating *in-vivo* results from the mouse and rat to large animal models including swine, dog, sheep and non-human primates with diverse promising results [49,55]. Notably, these studies report various combinations of reduced mortality, decreased infarct size, increased left ventricular ejection fraction, decreased left ventricular remodeling, improved hemodynamic parameters, reduced fibrosis, increased vasculogenesis and cardiomyogenesis. These studies cover a large range of cell sources, cell doses, route and timing of delivery [56]. Similarly, the transplantation of iPSCs has recently been investigated in mouse and pig myocardial infarction models with some positive results [57-60]. However, whereas it is clear that there are moderate improvements in survival and cardiac function, the specific endpoints remain relatively quite disparate, partly due to the broad range of models, methods, cell sources, timing of cell delivery and understanding of key mechanisms responsible for the improvements.

RIGHTSLINK

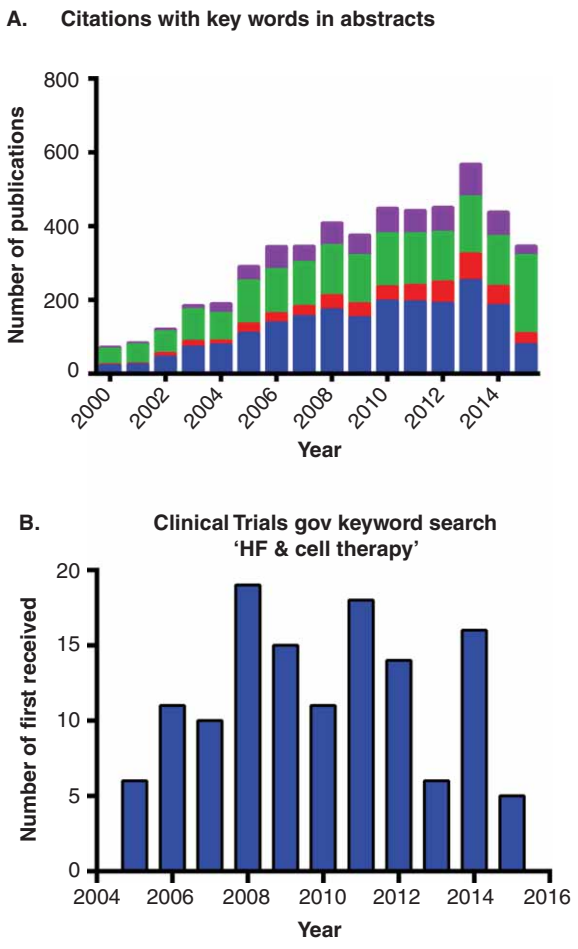


Figure 3. Results from searches showing the history of pluripotent cell therapy reports for the treatment of heart failure. (A) PubMed reports using the keywords heart failure and blue: stem cell, red: mesenchymal, green mesenchymal or bone marrow, violet : cardiac progenitor, yellow: cardiosphere. **(B)** Search results from ClinicalTrials.gov with heart failure and cell therapy keywords.
HF: Heart failure.

5.2 Main results from clinical studies using adult pluripotent cells

There are also many clinical trials that have been conducted with various outcomes [54,61]. In these studies, there appears to be general improvement in many quality of life parameters, some cardiac functional parameters including left ventricular ejection fraction, contractility and decreased remodeling. However, there are also reports of ventricular arrhythmias and death due to adverse events in a significant number of patients [62]. In both pre-clinical and clinical studies, paracrine effects are believed to play a major role in the improvements [63-66] but the exact paracrine factors and mechanisms responsible for these events are still unclear. In addition, the improvements are generally modest. These modest results may be due to our inability to completely control for confounding factors in clinical trials including the patient diversity, infarct size, co-morbidities, and standardization of pharmacotherapy [54].

It remains extremely challenging to conclude that cardiomyogenesis is a common mechanism leading to the pre-clinical and clinical available results. Despite these factors and the diversity of results, cell therapy has remained very promising over the last decade, and the rate of reporting continues to increase as shown in **Figure 3**. At the current rate, new reports in the scientific literature are projected to continue to show growth in 2015 and the future whereas clinical trials may stabilize as more knowledge can be harnessed to standardize and focus protocols, thus resulting in more consistent outcomes.

Therefore, it can be concluded that whereas many sources of cells have been tested for safety and efficacy for the treatment of heart failure [61], a consistent, robust demonstration of pluripotent cell delivery resulting in correlated improvements in quality of life, cardiac performance, and cardiomyogenesis has remained elusive and in some instances controversial [67]. Whereas many strategies have been promising, thus far adult stem cells engraft poorly in clinical trials [68-71]. Without engraftment, the potential for *in-vivo* proliferation, differentiation to replace cardiomyocytes is extremely limiting.

5.3 The unmet need and potential for iPSCs-based cell therapy

There is a need to bring disruptive cell and molecular technologies to restoring cardiac function and survivability in the failing heart. These technologies include ability to prepare versatile pluripotent cells that engraft in the harsh environment of the failing heart, proliferate and differentiate into cardiomycytes and electrically couple to surviving host heart muscle without taking on a tumorigenic phenotype. The remarkable proliferative and differentiation capacity of iPS cells represent an appealing source as they can provide an unlimited supply of specific cell types including viable functioning cardiac cells. Partially or fully differentiated cardiomyocytes from iPSCs could be considered for delivery to the failing heart. However, the optimal requirements for iPSC transplantation remain to be determined. In addition, from the above discussion, the unique ability to manipulate genome in iPSCs and direct them towards a cardiomyocyte lineage either just prior to delivery, or once differentiated will be an important goal to achieve.

6. Clinical-grade iPSCs for replacement therapy

The clinical application of iPSCs has recently started in patients with two different form of macular degeneration (Stargardt's macular dystrophy and age-related macular degeneration). In this trial, iPSCs are turned into retinal

Expert Opin. Biol. Ther. Downloaded from informahealthcare.com by INSERM on 07/07/15
For personal use only.

RIGHTSLINK

Expert Opin. Biol. Ther. Downloaded from informahealthcare.com by INSERM on 07/07/15
For personal use only.

pigment epithelial cells before re-implantation [72]. It is noteworthy that no clinical trials using iPSCs-derived cardiomyocytes for the treatment of heart failure have been approved so far but different research programs have been launched with the objective to treat patients within the next 5 years. This will however require addressing a number of issues that are simply summarized here [73].

6.1 Determine the proper level of differentiation

Because of their pluripotent nature, iPSCs can differentiate into cell types of all three germ layers. After transplantation, different groups have reported on the ability of undifferentiated iPSCs to form teratomas, an encapsulated tumor that contains tissue components resembling normal derivatives of all three germ layers. As a consequence, iPSCs will require some degree of predifferentiation to restrict their differentiation repertoire and prevent tumor growth. Different strategies are currently proposed to remove undifferentiated iPSCs from the differentiated cell population and limit teratoma formation including monoclonal antibodies, small molecules, pharmacological agents or genome engineering of iPSC to introduce suicide gene into the pluripotency locus [17,74].

6.2 Avoid the rejection of transplanted cells

Transplant rejections are mainly driven by allelic differences in the surface antigens, especially the major histocompatibility complex molecules, expressed by the donor and the recipient. The transplantation of immature iPSCs induced a T-cell-dependent immune response even in a syngeneic mouse, likely due to the abnormal gene expression [75]. One strategy to address this issue and avoid the use of intensive immunosupressive agents is to create a collection of PSCs with distinct major histocompatibility complex that will match the majority of the general population. The generation of a limited number of iPS cell lines would be sufficient to cover the immunological diversity of a patient population.

6.3 Determine the best delivery method

The survival and integration of the transplanted cells into the host anatomical structure is a critical challenge. In a recent study [60], Xiong *et al.* have reported the direct myocardial administration of iPSC-derived vascular cells in a swine model of MI. The transplanted cells were engineered to express a fluorescent reporter and the engraftment rate was thus estimated to be ~ 7% after 1 week and ~ 2% after 4 weeks. Therefore, other methods are developed including tissue engineering of cardiac muscle from human iPSCs. In this approach, iPSC can be mixed with polymeric scaffolds thus allowing the generation of tissue-engineered muscle constructs [76] that can further be transplanted onto the epicardium [77].

6.4 Concur with the Good Manufacturing Practice (GMP)

Good manufacturing practice (GMP) quality has been defined by both the European Medicines Agency and the Food and Drug Administration to offer optimal defined quality and safety in cell transplantation studies including iPSCs [78]. GMP is a requirement for the translation of cell products into clinical practice. It requires the development of standardized operating procedures and quality control methodology for the entire process from cell generation to storage of the cell therapy products [79]. These requirements are particularly critical for iPSC as reprogramming, cultures and differentiation protocols frequently use xeno-components that should be replaced by GMP-quality human derivatives. In addition to safety considerations, one of the major objectives is also to create robust and consistent high-quality iPSCs that will display high levels of comparability across the multiple lines. The development of GMP-grade library of iPSCs will however require significant effort and resources that might be supported by a limited number of laboratories [80].

7. Conclusion

iPSCs represent an appealing cell source to develop disease-modeling assays, drug testing assays and cell-based replacement therapies notably for cardiac disorders. The development of efficient protocols to generate pure populations of cardiac myocytes is first prerequisite to provide reproducible, robust and valid assays. The newly developed genome-editing techniques offer multiple opportunities to manipulate the genome of iPSC thus generating syngeneic iPS lines. This approach is primarily helpful in limiting inter-clones variability that result in phenotypic differences. In addition, genome-editing techniques will allow engineering of iPSC to make them suitable for replacement therapies.

8. Expert opinion

Since their discovery by Dr Yamanaka in 2006, iPSCs promise to revolutionize the way human diseases are studied. iPSCs are generated by forcing the expression of a defined set of pluripotency transcription factors in somatic cells, including human cells. The resulting iPSCs share similarities with ESCs, as they are clonogenic and pluripotent with the ability to differentiate into almost all cell types. Over the past years, an increasingly refined capacity to differentiate these iPSCs into disease-relevant cell types, such as cardiomyocytes or vascular cells (iPSC-CVs), offers new opportunities to model diseases, to test effects of drugs or to develop cell-based therapies. The use of this technology for cardiovascular and cardiometabolic disorders is particularly appealing as therapeutic development has been limited by the difficulty of acquiring primary human tissues (e.g., heart). Unlike existing animal and other *in vitro* cell expression models, human iPSC-CVs

RIGHTSLINK

could represent a more physiologically relevant system with ultimately similar biochemical, electrophysiological, and mechanical properties to those of primary human cardiovascular cells. During the last years, different groups have reported on protocols to achieve reproducible and efficient differentiation of iPSCs including in cardiac and vascular cells. The definition of such a protocol is challenging, as the resulting iPSC-CVs usually appear functionally immature as compared to their adult mature counterparts. A couple of recent options have however been proposed to address this issue, including newly developed 2D differentiation protocols, cell-sorting strategies or genome-editing approaches to insert cell-specific resistance genes or reporters. In addition, the achieved level of cell maturation appears as a limited concern as compared to the heterogeneity in the cell differentiation when interpreting phenotypic differences between different cell populations.

In contrast to ESCs, iPSC can be patient-specific, meaning that iPSC will carry the patient's genetic make-up and will exhibit patient in a dish disease phenotypes. For these reasons, iPSC have revealed extremely powerful to model inherited heart disease especially in the cardiovascular area. Different groups have extensively reported on the ability of using iPSC-derived cardiomyocytes to model arrhythmic disorders caused by mutations in cardiac ion channels (as seen in the long-QT syndrome) or sarcomeric cardiomyopathies caused by mutations in contractile proteins (as seen in hypertrophic cardiomyopathy). These human-based cellular models help identifying molecular mechanisms underlying the disease but also testing new-targeted therapies. However, there is always a dilemma to define the correct control cell line. New advances in the field of genome engineering provide a variety of molecular tools to specifically target and edit the genome. The use of genome-editing approaches in iPSCs is particularly appealing and will help to address a couple of current limitations. First, these tools can be used to correct mutations in patient-specific iPSC thus generating a perfect control cell line (so-called isogenic) that will only differ at the corrected mutation level. Second, the genome-editing techniques can be used to introduce mutations of interest in a control iPSC line (i.e., coming from a healthy donor). This approach is appealing as genes of interest can be faster targeted in a given control iPSC thus providing fasttrack information on their potential influence on a given phenotype. In addition, when compared with patient-specific iPSC, this approach also provides valuable information on the influence of the mutation of interest in different genetic backgrounds. Third, genome-editing techniques can reveal useful in the generation of clinical-grade pluripotent stem cells for replacement therapy. With this objective, the yield and the purity of the final iPSC-derived cells are of particularly high importance. The ability to manipulate the genome of iPSCs in some so-called safe harbors offers the opportunity to safely introduce transgenes into these cells. The applications are numerous including, but not limited to, the use of luminescent markers to track the localization of the transplanted cells or the introduction of a suicide gene to eliminate residual undifferentiated iPSC.

Declaration of interests

Funding was received from the Fondation Leducq (grant 13CVD01, CardioStemNet project). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending or royalties.

Bibliography

Papers of special note have been highlighted as either of interest (•) or of considerable interest (••) to readers

1. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell 2007;131(5):861-72

•• **First description of the induction of pluripotent stem cells using human somatic cells.**

2. Schenke-Layland K, Rhodes KE, Angelis E, et al. Reprogrammed mouse fibroblasts differentiate into cells of the cardiovascular and hematopoietic lineages. Stem Cells 2008;26(6):1537-46
3. Narazaki G, Uosaki H, Teranishi M, et al. Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. Circulation 2008;118(5):498-506
4. Zhang J, Wilson GF, Soerens AG, et al. Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. Circ Res 2009;104(4):e30-41
5. Laflamme MA, Chen KY, Naumova AV, et al. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. Nat Biotechnol 2007;25(9):1015-24
6. Yang L, Soonpaa MH, Adler ED, et al. Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population. Nature 2008;453(7194):524-8
7. Kehat I, Khimovich L, Caspi O, et al. Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. Nat Biotechnol 2004;22(10):1282-9
8. Xu C, Police S, Rao N, Carpenter MK. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. Circ Res 2002;91(6):501-8
9. Zhu WZ, Van Biber B, Laflamme MA. Methods for the derivation and use of cardiomyocytes from human pluripotent stem cells. Methods Mol Biol 2011;767:419-31
10. Burridge PW, Matsa E, Shukla P, et al. Chemically defined generation of human

Expert Opin. Biol. Ther. Downloaded from informahealthcare.com by INSERM on 07/07/15
For personal use only.

RIGHTSLINK

Expert Opin. Biol. Ther. Downloaded from informahealthcare.com by INSERM on 07/07/15
For personal use only.

cardiomyocytes. Nat Methods 2014;11(8):855-60

- **Description of a robust and chemically defined protocol to differentiate cardiomyocytes.**

11. Zhang M, Schulte JS, Heinick A, et al. Universal cardiac induction of human pluripotent stem cells in 2D and 3D formats - implications for in-vitro maturation. Stem Cells 2015;33(5):1456-69
12. Ren Y, Lee MY, Schliffke S, et al. Small molecule Wnt inhibitors enhance the efficiency of BMP-4-directed cardiac differentiation of human pluripotent stem cells. J Mol Cell Cardiol 2011;51(3):280-7
13. Lian X, Hsiao C, Wilson G, et al. Robust cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells via temporal modulation of canonical Wnt signaling. Proc Natl Acad Sci USA 2012;109(27):E1848-57
14. Karakikes I, Senyei GD, Hansen J, et al. Small molecule-mediated directed differentiation of human embryonic stem cells toward ventricular cardiomyocytes. Stem Cells Transl Med 2014;3(1):18-31
15. Weng Z, Kong CW, Ren L, et al. A simple, cost-effective but highly efficient system for deriving ventricular cardiomyocytes from human pluripotent stem cells. Stem Cells Dev 2014;23(14):1704-16
16. Dubois NC, Craft AM, Sharma P, et al. SIRPA is a specific cell-surface marker for isolating cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. Nat Biotechnol 2011;29(11):1011-18

- **Report on a specific cell-surface marker that can be used for cell sorting thus allowing enrichment in cardiac precursors and cardiomyocytes.**

17. Tohyama S, Hattori F, Sano M, et al. Distinct metabolic flow enables large-scale purification of mouse and human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. Cell Stem Cell 2013;12(1):127-37
18. Lundy SD, Zhu WZ, Regnier M, Laflamme MA. Structural and functional maturation of cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. Stem Cells Dev 2013;22(14):1991-2002
19. Kim C, Wong J, Wen J, et al. Studying arrhythmogenic right ventricular dysplasia with patient-specific iPSCs. Nature 2013;494(7435):105-10
20. Sinnecker D, Goedel A, Dorn T, et al. Modeling long-QT syndromes with iPS cells. J Cardiovasc Transl Res 2013;6(1):31-6
21. Moretti A, Bellin M, Welling A, et al. Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome. N Engl J Med 2010;363(15):1397-409
22. Itzhaki I, Maizels L, Huber I, et al. Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. Nature 2011;471(7337):225-9
23. Terrenoire C, Wang K, Tung KW, et al. Induced pluripotent stem cells used to reveal drug actions in a long QT syndrome family with complex genetics. J Gen Physiol 2013;141(1):61-72
24. Yazawa M, Hsueh B, Jia X, et al. Using induced pluripotent stem cells to investigate cardiac phenotypes in Timothy syndrome. Nature 2011;471(7337):230-4
25. Carvajal-Vergara X, Sevilla A, D'Souza SL, et al. Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome. Nature 2010;465(7299):808-12

- **One of the first study reporting on the modeling of a genetic cardiomyopathy using patient-specific iPSC.**

26. Lan F, Lee AS, Liang P, et al. Abnormal calcium handling properties underlie familial hypertrophic cardiomyopathy pathology in patient-specific induced pluripotent stem cells. Cell Stem Cell 2013;12(1):101-13
27. Lin B, Li Y, Han L, et al. Modeling and studying mechanism of dilated cardiomyopathy using induced pluripotent stem cells derived from Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) patients. Dis Model Mech 2015;8(5):457-66
28. Gramlich M, Pane LS, Zhou Q, et al. Antisense-mediated exon skipping: a therapeutic strategy for titin-based dilated cardiomyopathy. EMBO Mol Med 2015;7(5):562-76
29. Wang G, McCain ML, Yang L, et al. Modeling the mitochondrial cardiomyopathy of Barth syndrome with induced pluripotent stem cell and heart-on-chip technologies. Nat Med 2014;20(6):616-23
30. Karakikes I, Stillitano F, Nonnenmacher M, et al. Correction of human phospholamban R14del mutation associated with cardiomyopathy using targeted nucleases and combination therapy. Nat Commun 2015;6:6955
31. Sun N, Yazawa M, Liu J, et al. Patient-specific induced pluripotent stem cells as a model for familial dilated cardiomyopathy. Sci Transl Med 2012;4(130):130ra47
32. Liang P, Lan F, Lee AS, et al. Drug screening using a library of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes reveals disease-specific patterns of cardiotoxicity. Circulation 2013;127(16):1677-91
33. Navarrete EG, Liang P, Lan F, et al. Screening drug-induced arrhythmia [corrected] using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes and low-impedance microelectrode arrays. Circulation 2013;128(11 Suppl 1):S3-13
34. Nozaki Y, Honda Y, Tsujimoto S, et al. Availability of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in assessment of drug potential for QT prolongation. Toxicol Appl Pharmacol 2014;278(1):72-7
35. Wang Y, Liang P, Lan F, et al. Genome editing of isogenic human induced pluripotent stem cells recapitulates long QT phenotype for drug testing. J Am Coll Cardiol 2014;64(5):451-9
36. Hajjar RJ, Hulot JS. Modeling CVD in human pluripotent cells by genome editing. J Am Coll Cardiol 2014;64(5):460-2
37. Rapti K, Stillitano F, Karakikes I, et al. Effectiveness of gene delivery systems for pluripotent and differentiated cells. Mol Ther Methods Clin Dev 2015;2:14067
38. Merkert S, Khan K, Haase A, et al. Efficient ZFN-based gene inactivation in transgenic human iPS cells as a model for gene editing in patient-specific cells. J Stem Cells Regen Med 2010;6(2):118
39. Hockemeyer D, Wang H, Kiani S, et al. Genetic engineering of human pluripotent cells using TALE nucleases. Nat Biotechnol 2011;29(8):731-4
40. Miller JC, Tan S, Qiao G, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. Nat Biotechnol 2011;29(2):143-8
41. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided

RIGHTSLINK

DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science 2012;337(6096):816-21

42. Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science 2014;346(6213):1258096

•• **Review on the development and applications of CRISPR-Cas9 technology including in stem cells.**

43. Frock RL, Hu J, Meyers RM, et al. Genome-wide detection of DNA double-stranded breaks induced by engineered nucleases. Nat Biotechnol 2015;33(2):179-86

44. Tan EP, Li Y, Del Castillo Velasco-Herrera M, et al. Off-target assessment of CRISPR-Cas9 guiding RNAs in human iPS and mouse ES cells. Genesis 2015;53(2):225-36

45. Maeder ML, Linder SJ, Cascio VM, et al. CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. Nat Methods 2013;10(10):977-9

46. Gilbert LA, Horlbeck MA, Adamson B, et al. Genome-Scale CRISPR-Mediated Control of Gene Repression and Activation. Cell 2014;159(3):647-61

47. Li M, Suzuki K, Kim NY, et al. A cut above the rest: targeted genome editing technologies in human pluripotent stem cells. J Biol Chem 2014;289(8):4594-9

48. Garbern JC, Lee RT. Cardiac stem cell therapy and the promise of heart regeneration. Cell Stem Cell 2013;12(6):689-98

49. Kim J, Shapiro L, Flynn A. The clinical application of mesenchymal stem cells and cardiac stem cells as a therapy for cardiovascular disease. Pharmacol Ther 2015;151:8-15

50. Karantalis V, Hare JM. Use of mesenchymal stem cells for therapy of cardiac disease. Circ Res 2015;116(8):1413-30

51. Wehman B, Kaushal S. The emergence of stem cell therapy for patients with congenital heart disease. Circ Res 2015;116(4):566-9

52. Ishigami S, Ohtsuki S, Tarui S, et al. Intracoronary autologous cardiac progenitor cell transfer in patients with hypoplastic left heart syndrome: the TICAP prospective phase 1 controlled trial. Circ Res 2015;116(4):653-64

53. Vrtovec B, Poglajen G, Sever M, et al. CD34+ stem cell therapy in nonischemic dilated cardiomyopathy patients. Clin Pharmacol Ther 2013;94(4):452-8

54. Madonna R, Ferdinandy P, De Caterina R, et al. Recent developments in cardiovascular stem cells. Circ Res 2014;115(12):e71-8

55. Chong JJ, Yang X, Don CW, et al. Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. Nature 2014;510(7504):273-7

56. Hastings CL, Roche ET, Ruiz-Hernandez E, et al. Drug and cell delivery for cardiac regeneration. Adv Drug Deliv Rev 2015;84:85-106

57. Song G, Li X, Shen Y, et al. Transplantation of iPSc restores cardiac function by promoting angiogenesis and ameliorating cardiac remodeling in a post-infarcted swine model. Cell Biochem Biophys 2014. [Epub ahead of print]

58. Mauritz C, Martens A, Rojas SV, et al. Induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived Flk-1 progenitor cells engraft, differentiate, and improve heart function in a mouse model of acute myocardial infarction. Eur Heart J 2011;32(21):2634-41

59. Yan B, Abdelli LS, Singla DK. Transplanted induced pluripotent stem cells improve cardiac function and induce neovascularization in the infarcted hearts of db/db mice. Mol Pharm 2011;8(5):1602-10

60. Xiong Q, Ye L, Zhang P, et al. Functional consequences of human induced pluripotent stem cell therapy: myocardial ATP turnover rate in the in vivo swine heart with postinfarction remodeling. Circulation 2013;127(9):997-1008

61. Sanganalmath SK, Bolli R. Cell therapy for heart failure: a comprehensive overview of experimental and clinical studies, current challenges, and future directions. Circ Res 2013;113(6):810-34

62. Almeida SO, Skelton RJ, Adigopula S, Ardehali R. Arrhythmia in stem cell transplantation. Card Electrophysiol Clin 2015;7(2):357-70

63. Kurazumi H, Kubo M, Ohshima M, et al. The effects of mechanical stress on the growth, differentiation, and paracrine factor production of cardiac stem cells. PLoS One 2011;6(12):e28890

64. Lionetti V, Bianchi G, Recchia FA, Ventura C. Control of autocrine and paracrine myocardial signals: an emerging therapeutic strategy in heart failure. Heart Fail Rev 2010;15(6):531-42

65. Shintani Y, Fukushima S, Varela-Carver A, et al. Donor cell-type specific paracrine effects of cell transplantation for post-infarction heart failure. J Mol Cell Cardiol 2009;47(2):288-95

66. Burchfield JS, Dimmeler S. Role of paracrine factors in stem and progenitor cell mediated cardiac repair and tissue fibrosis. Fibrogenesis Tissue Repair 2008;1(1):4

67. van Berlo JH, Molkentin JD. An emerging consensus on cardiac regeneration. Nat Med 2014;20(12):1386-93

68. Chou SH, Lin SZ, Kuo WW, et al. Mesenchymal stem cell insights: prospects in cardiovascular therapy. Cell Transplant 2014;23(4-5):513-29

69. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, et al. Intracoronary bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. N Engl J Med 2006;355(12):1210-21

70. Schachinger V, Erbs S, Elsasser A, et al. Improved clinical outcome after intracoronary administration of bone-marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction: final 1-year results of the REPAIR-AMI trial. Eur Heart J 2006;27(23):2775-83

71. Tendera M, Wojakowski W, Ruzyllo W, et al. Intracoronary infusion of bone marrow-derived selected CD34+CXCR4+ cells and non-selected mononuclear cells in patients with acute STEMI and reduced left ventricular ejection fraction: results of randomized, multicentre Myocardial Regeneration by Intracoronary Infusion of Selected Population of Stem Cells in Acute Myocardial Infarction (REGENT) Trial. Eur Heart J 2009;30(11):1313-21

72. Schwartz SD, Hubschman JP, Heilwell G, et al. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. Lancet 2012;379(9817):713-20

73. Hulot JS, Stillitano F, Salem JE, et al. Considerations for pre-clinical models and clinical trials of pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. Stem Cell Res Ther 2014;5(1):1

Expert Opin. Biol. Ther. Downloaded from informahealthcare.com by INSERM on 07/07/15
For personal use only.

RIGHTSLINK

74. Hattori F, Chen H, Yamashita H, et al. Nongenetic method for purifying stem cell-derived cardiomyocytes. Nat Methods 2010;7(1):61-6

75. Zhao T, Zhang ZN, Rong Z, Xu Y. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. Nature 2011;474(7350):212-15

76. Turnbull IC, Karakikes I, Serrao GW, et al. Advancing functional engineered cardiac tissues toward a preclinical model of human myocardium. FASEB J 2014;28(2):644-54

77. Hirt MN, Hansen A, Eschenhagen T. Cardiac tissue engineering: state of the art. Circ Res 2014;114(2):354-67

78. Agency EM. Reflection paper on stem cell-based medicinal products. 2011

79. Unger C, Skottman H, Blomberg P, et al. Good manufacturing practice and clinical-grade human embryonic stem cell lines. Hum Mol Genet 2008;17(R1):R48-53

80. Silva M, Daheron L, Hurley H, et al. Generating iPSCs: translating cell reprogramming science into scalable and robust biomanufacturing strategies. Cell Stem Cell 2015;16(1):13-17

Affiliation

Dorota Jeziorowska[1], Agathe Korniat[1], Joe-Elie Salem[1], Kenneth Fish[2] & Jean-Sébastien Hulot[†2]
[†]Author for correspondence
[1]UMRS_1166, ICAN, Paris, France
[2]Icahn School of Medicine at Mount Sinai, Cardiovascular Research Center, New York, NY, USA
E-mail: jean.hulot@mssm.edu

Expert Opin. Biol. Ther. Downloaded from informahealthcare.com by INSERM on 07/07/15
For personal use only.

RIGHTSLINK

CONFIDENTIEL

Quatrième partie : Méthode d'enrichissement de la différenciation cardiaque des cellules souches pluripotentes par l'activation de la transcription de gènes cardiogéniques à l'aide de la dCas9.

CONFIDENTIEL

Brevet déposé

Article en cours de rédaction

Introduction.

Comme précisé dans les chapitres précédents, la différenciation en cardiomyocytes des iPSC est basée sur la stimulation successive des voies majeures de la cardiogénèse par l'utilisation de cytokines et de petites molécules ciblant des facteurs clés de ces voies de signalisation. Celles-ci comprennent notamment les voies Wnt ou du TGF-bea/BMP. Toutefois ces méthodes peuvent encore être améliorées car elles activent ou inhibent de manière imparfaite ces voies via l'utilisation de molécules pas toujours spécifiques. De plus, les principaux inconvénients des méthodes actuelles sont une efficacité limitée, les problèmes liés à la nécessité d'une modulation séquentielle de certaines voies, l'hétérogénéité de réponse à ces stimuli entre les clones et la durée totale de la différenciation qui est la résultante de toutes ces étapes. La différenciation dure ainsi généralement 4 semaines pour obtenir des cellules cardiaques considérées comme matures et comparables avec des cardiomyocytes adultes. (Jeziorowska et al, en soumission).

A ce jour, aucune approche moléculaire n'a été développée pour permettre la différenciation cardiomyocytaire. L'avantage d'une approche de ce type serait de pouvoir cibler spécifiquement des gènes clés de la différenciation et de s'assurer de leur activation ou inhibition directe.

Nous nous sommes ainsi intéressés à l'activation des gènes jouant un rôle dans la cardiogenèse en utilisant le système CRISPRa et nous nous sommes demandé si nous pouvions créer une nouvelle approche pour améliorer la différenciation, augmenter sa spécificité et surtout l'accélérer.

Comme décrit précédemment, le système Cas9 est une endonucléase guidée par un ARN guide qui est spécifique d'une séquence d'ADN cible par complémentarité (Jinek et al. 2012). La Cas9 (pour CRISPR associated system) est dirigée par un ARN guide qui va reconnaître une séquence cible contenant un motif PAM (protospacer-adjacent motif). C'est une courte séquence hautement conservée de la forme : 5'-NGG-3' ou N est n'importe quel nucléotide suivi par deux guanines (Anders et al. 2014). Des variants de la Cas9 ont été créés par mutagenèse dirigée notamment pour supprimer l'activité nucléase de celle-ci (Mali et al. 2013).Ces variants que l'on appelle dCas9 pour « Deficient Cas9 » sont exempts d'activité endonucléase mais conservent la capacité d'interagir avec l'ADN. Ainsi, la dCas9 va servir de véhicule pour amener avec elle une nouvelle fonction à un endroit ciblé de l'ADN. L'une de ces fonctions est l'activation des zones promotrices de gènes. Les variants dCas9 ont été fusionnés avec des domaines d'activation de la transcription (ADs), permettant à la dCas9 d'agir comme un outil

CONFIDENTIEL

d'activation génique et donc de programmation cellulaire au niveau transcriptionnel. Perez-Pinera et al, ont construit un premier vecteur transactivateur la dCas9-VP64. Le transactivateur VP64 est constitué de 4 copies en tandem de VP16 (herpes simplex viral protein 16) connectés entre eux par des liaisons glycine serine. (Beerli et al. 1998) Par la suite, Chavez et al, ont testé différents transactivateurs sous contrôle de la dCas9 : dCas9-VP64, dCas9-p65 et dCas9-Rta. Less trois transactivateurs permettaient une activation transcriptionnelle similaire. Ils ont alors fusionné la protéine dCas9-VP64 en C-terminal avec les domaines p65 et Rta. Cette fusion de trois activateurs de la transcription augmente de façon spectaculaire l'effet de transactivation. Ils ont appelé cette forme hybride : dCas9-VPR (VP64-p65-Rta). Chaque domaine activateur a été testé séquentiellement afin de déterminer son efficacité, il s'avère que lorsqu'un domaine est inactivé, l'activité du système est fortement diminuée (Chavez et al. 2015)

Enfin, ce système de dCas9 activatrice est basé sur l'expression d'un transactivateur commun à l'ensemble des gènes qui seront ciblés. Ce sont les ARN guides délivrés à une cellule qui permettent de cibler un ou plusieurs gènes donnés à partir de la même dCas9. Ainsi, pour la première fois, ce système pourrait permettre la co-activation de plusieurs gènes d'un même programme génique sans devoir délivrer l'ensemble du matériel génétique nécessaire à la surexpression des facteurs ciblés.

Pour tester ces hypothèses, nous avons décidé de tester ce système en activant trois gènes connus pour jouer un rôle majeur dans la cardiogenèse. Des études récentes ont démontré la faisabilité de la conversion des fibroblastes en cellules cardiomyocytes-like sans passer par un stade de cellules souches. (Ieda et al. 2010; Nam et al. 2013; Qian et al. 2012; Song et al. 2012; Fu et al. 2013). Ceci a été obtenu par l'expression forcée de facteurs de transcription clés de la cardiogenèse (Gata4, Mef2c et Tbx5) conduisant à la dédifférenciation partielle du phénotype cellulaire existant et à l'introduction d'un phénotype cardiomyocytes-like. Pour la première conversion directe de fibroblastes en cellules cardiomyocytes–like *in vitro,* les facteurs de transcription GMT (Gata4, Mef2c et Tbx5) ont été délivrés par rétrovirus dans des fibroblastes de queue de souris. (Ieda et al. 2010) Malheureusement le taux d'efficacité de la reprogrammation directe était assez faible : environ 5,7%. Les cellules obtenues avaient un phénotype de cellules néonatales. Cependant, ces facteurs de transcription sont exprimés très tôt dans le développement cardiaque et contrôlent en cascade l'expression d'autres gènes majeurs de la conversion en cardiomyocytes. Leurs effets dans la différenciation des iPSC en cardiomyocytes n'ont cependant jamais été testés, probablement par la difficulté technique de pouvoir délivrer un signal permettant l'activation synchrone de ces facteurs.

CONFIDENTIEL

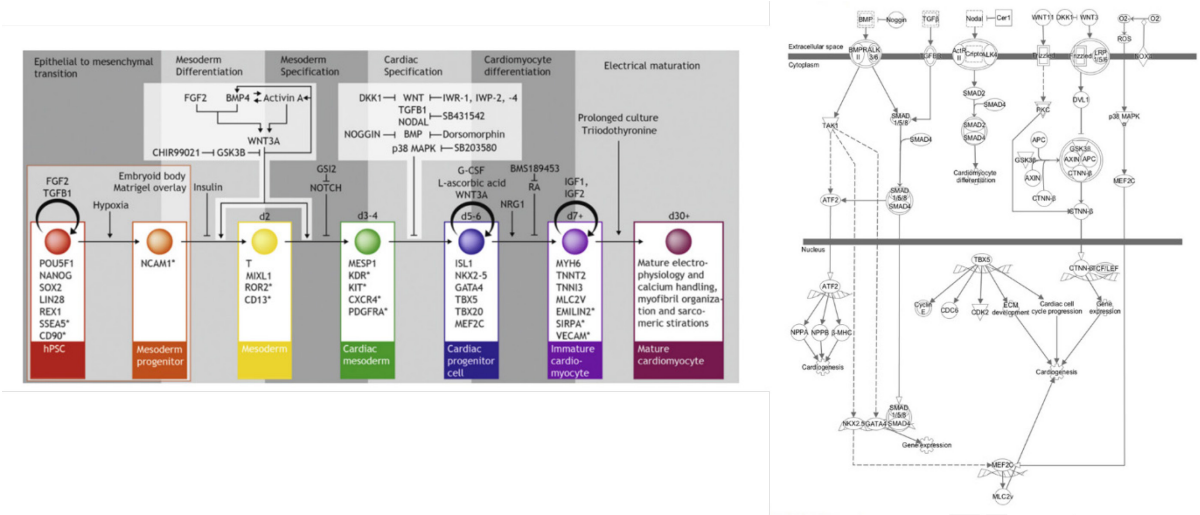


Figure 24 : A. Schéma de la connaissance actuelle des facteurs impliqués dans la différenciation cardiaque de l'IPSC (Burridge et al. 2012) B. Voies qui contrôlent la transcription de GATA4, Mef2c et Tbx5(Qiagen Ingenuity pathway analysis)

Dans ce travail nous avons voulu induire la différenciation cardiaque en activant directement les facteurs de transcription Gata4, Mef2c et Tbx5 (appelés GMT par la suite) par le système CrispR activateur délivré dans des cellules souches pluripotentes induites.

Matériels et méthodes

Construction des plasmides :

1. Plasmides transactivateurs

Deux différentes versions de dCas9 transactivateurs ont été utilisées : pcDNA-dCas9-VP64: (Addgene #47107 ;(Perez-pinera et al. 2013). et : SP-dCas9-VPR, qui contient plusieurs transactivateurs fusionnés :VP64, P65 et RTA (Addgene #63798 ; (Chavez et al. 2015)

2. ARN guides indépendants

Plusieurs gARNs ont été utilisés. Pour les premiers tests permettant de comparer les deux système de transactivation dCas9-VP64 et dCas9-VPR, nous avons utilisés les ARN guides déjà publiés et valdiés contre deux gènes : MYOD et ASCL1 (Perez-pinera et al. 2013)

Le dessin des ARN guides codant pour les trois gènes de la cardiogenèse a été réalisé *in silico* en utilisant un site de prédiction des ARN guides pour le système CRISPR/Cas9 conventionnel : http://crispr-era.stanford.edu. Les gARN ont été dessinés et localisés sur le génome en se basant sur

CONFIDENTIEL

les bases de données rapportant les régions promotrices et activatrices des gènes (UCSC genome browser). Les amorces dessinées se situent dans les mille paires de bases en amont du site de démarrage de la transcription du gène. Elles sont réparties dans des zones prédites pour être promotrices ou activatrices de la transcription des gènes ciblés.

Pour les premières expériences les guides sont clonés dans des vecteurs d'expression indépendants. pSPgRNA ((Perez-pinera et al. 2013)Addgene #47108). Les séquences ont été synthètisées chez Eurogentec (24pb) contenant de surcroît la séquence CACC en 5' de l'amorce sens et CAAA en 5' de l'amorce anti-sens. Après hybridation les amorces sont clonées dans le plasmide pSPgRNA linéarisé par BbsI.

3. Multiplexage d'ARNg

Pour éviter des transfections multiples et augmenter l'efficacité de la nucléofection nous avons multiplexé plusieurs gARN dans un même vecteur. Pour ce faire la technique du Golden Gate a été utilisée. Cette technique est basée sur la capacité des enzymes de restriction de type II à reconnaître un motif nucléotidique et à cliver à l'extérieur de ce motif. Le dessin des amorces qui ont permis la construction du vecteur GoldenGate a été réalisé *in silico* avec le site : https://goldengate.neb.com/editor. Les différents inserts ainsi que le vecteur de base pSPgRNA ont été amplifiés par PCR puis la digestion et la ligation ont été faite en une seule étape.

Nucleofection des iPSC

Les iPSC sont cultivées et mises en expansion dans le milieu mTesR1 sur matrigel (Corning) pendant 7 jours. Pour réaliser la nucléofection, les cellules iPS sont détachées en utilisant un kit contenant 0.025% trypsin-EDTA (Promocell) et resuspendues dans 100µl de Human Stem Cell Nucleofector® Kit 1 auquel est rajouté 20µg de chaque plasmide. La nucléofection est effectuée à l'aide du Nucleofector™ 2b Device, Lonza, programme A-013.

Par la suite, les cellules nucléofectées sont ensemencées de nouveau sur des plaques avec du matrigel et maintenues pendant 48h en milieu mTesR1 avec addition d'inhibiteur Rock (Y-27632, Tocris) et Penicillin-Streptomycin (Life technologies). A J2, le milieu est changé et remplacé par du Essential E6 (Life technologies) avec ou non une supplémentation en CHIR90021 (6µM) et IWP2 (5µM). A J4, les cellules sont remises en milieu Essential E6 sans molécules pharmacologiques.

CONFIDENTIEL

PCR quantitative

L'expression génique relative a été déterminée en utilisant une PCR quantitative en temps réel en deux étapes. L'ARN total a été isolé 4, 7 et 14 jours après l'électroporation avec le kit RNA Mini PureLink® (Life Technologies, #12183018A) et une reverse transcription a été réalisée en utilisant le kit Maxima First Strand cDNA Synthesis for RT-PCR quantitative (Life Technologies, # K1642). La RT-PCRq a été effectuée avec le SYBR Select Master Mix (Life Technologies, # 4472919) sur le LightCycler® 480 II (Roche). La différence d'expression des gènes a été déterminée selon la méthode de comparasion des Ct (ddCT) et normalisé avec le gène de ménage RPL32.

FACS

La cytométrie est réalisée 7 jours après la nucléofection. Les cellules sont détachées et dissociées en utilisant un kit contenant 0.025% trypsine-EDTA (Promocell) puis centrifugées 5 min à 200G. Les cellules sont ensuite fixées avec du paraformaldéhyde (Sigma-Aldrich, #HT5012-1CS) pendant 10min à TA puis perméabilisées avec un mélange méthanol-eau 90/10 (v :v) froid pendant 15min à +4°C. Les cellules sont lavées 3 fois avec du PBS puis incubées pendant 45min dans l'obscurité avec l'anticorps anti-Troponine T cardiaque (Anti-Cardiac Troponin T-APC, recombinant human IgG1 mouse rat, clone REA400 MiltenyiBiotec, #130-106-689) ou l'isotype contrôle interne (CTL-I APC, Monoclonal REA Control (I) antibody human, clone REA293 MiltenyiBiotec, #130-104-615). Les cellules sont lavées et resuspendues dans du PBS contenant 0.5% BSA. Les cellules sont analysées par le MACSQuant® Analyzer 10 (MiltenyiBiotec, #130-096-343) et les résultats retraités à l'aide du logiciel FlowJo.

Immunofluorescence

Une immunofluorescence est réalisée en parallèle de la cytométrie. Les cellules sont fixées avec du paraformaldéhyde (Sigma-Aldrich, #HT5012-1CS) pendant 10min à TA puis perméabilisées et les sites antigéniques aspécifiques sont bloqués pendant 45 min dans un tampon de blocage (PBS contenant 2% BSA et 0.5% Triton-X-100). Les cellules sont ensuite incubées avec un anticorps anti-Troponine T cardiaque (rabbit polyclonal anti-Cardiac Troponin T antibody Abcam, #ab45932 ; dilution 1/500). Puis les cellules sont lavées 3 fois au PBS et incubées 45 min à TA avec l'anticorps secondaire couplé au fluorochrome Alexa Fluor 488 (dilution 1/1000) et du DAPI (dilution 1/1000). Les images sont acquises au microscope à épifluorescence (Nikon Epifluorescence Microscope).

CONFIDENTIEL

Résultats

Sélection du transactivateur dCas9

Dans un premier temps, deux versions de dCas9 ont été comparées afin de sélectionner une version optimale de transactivation dans un modèle cellulaire iPSC. Ces deux transactivateurs ont été comparés directement en utilisant des ARN guides contre deux gènes MYOD et ASCL1. (Perez –Pinera et al, 2013). Les guides ont été clonés dans des vecteurs d'expression indépendants pSPgRNA. Les quatre vecteurs d'expression pSPgRNA (500 ng chacun) ont été ainsi transférés en plus du vecteur d'expression (1 µg) dCas9-VP64 ou dCas-VPR dans des cellules iPS. L'expression des gènes d'intérêts a été quantifiée par qRT-PCR. En comparaison au vecteur pcDNA-dCas9-VP64 comportant un seul transactivateur, le vecteur SP-dCas9-VPR comportant 3 transactivateurs (VP64, Rta, p65) permet une expression équivalente du gène MyoD, cependant pour le gène Ascl1 il permet une expression 7 fois plus importante. Le système dCas9 associé au transactivateur permet une augmentation d'expression des gènes cibles d'un facteur 4 à 15.

CONFIDENTIEL

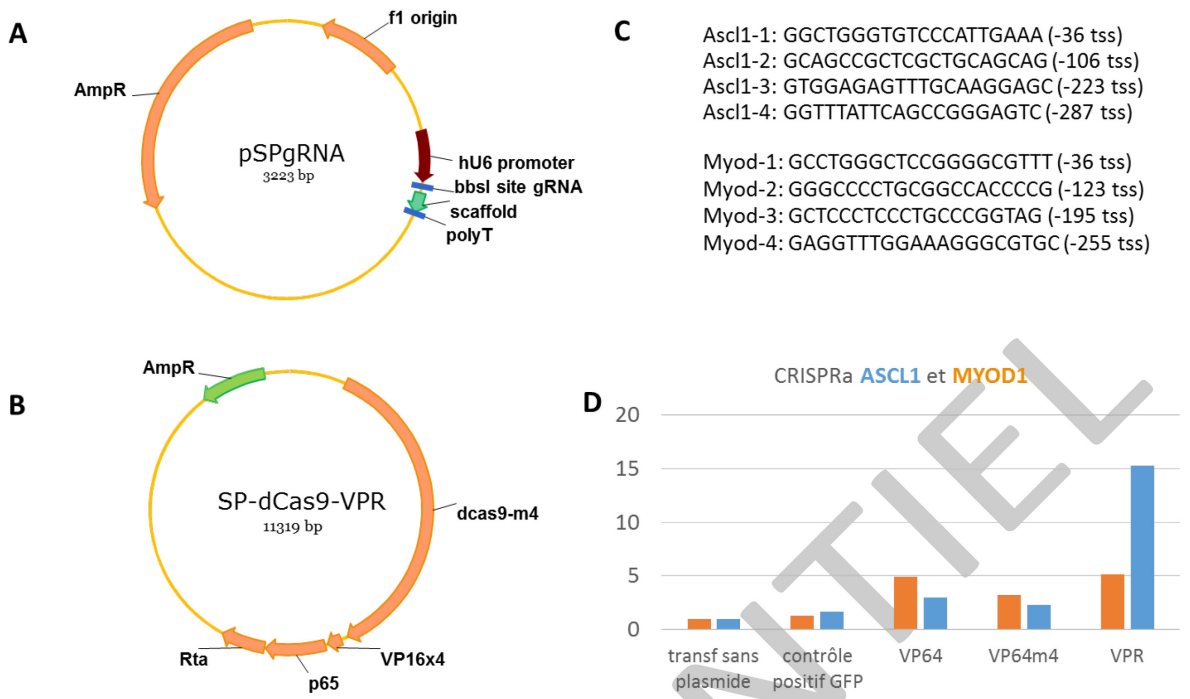


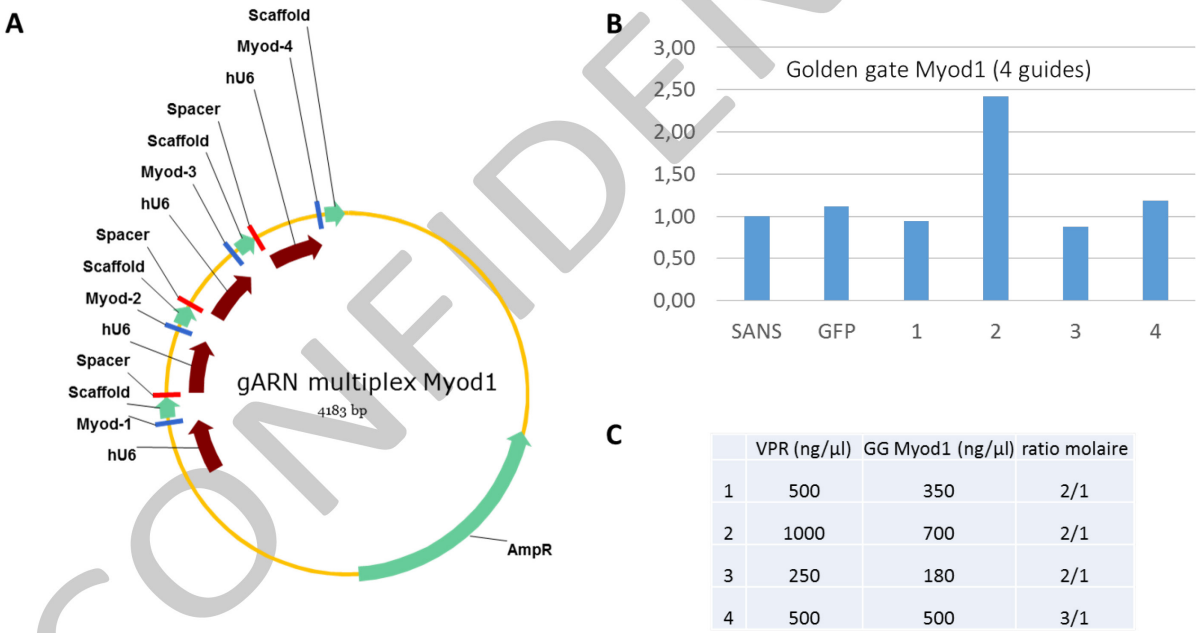
Figure 25 : Comparaison de l'efficacité de la version modifiée dCas9-VPR par rapport à la forme simple dCas9-Vp64.

A. Carte du plasmide dCas9-VPR : Le transactivateur VPR provient de la fusion de trois transactivateurs (VP65, p65 et Rta). **B.** Carte du vecteur d'expression des ARN guides. **C.** Dessin, séquence et position de 4 ARN guide ciblant les gènes Ascl1 et MyoD. Ces gARN ciblent la région promotrice des gènes respectifs. Chaque gRNA est ensuite inséré dans le vecteur d'expression. **D.** Transfection de cellules iPS avec le vecteur dCas9-VPR (1µg) et 500ng de chaque vecteur d'Expression des 4gARN. La qPCR montre qu'en comparaison à une dCas9 comportant une seul transactivateur VP64, dCas9-VPR permet une expression de MyoD équivalente et une expression d'Ascl1 #7 fois plus ; importante. Par rapport aux contrôles, le système permet l'augmentation d'expression des gènes ciblés d'un facteur 4 à 15.

CONFIDENTIEL

Multiplexage des gARN par la technique du Golden Gate

Dans l'expérience précédente nous avons observé que pour activer le système une nucléofection de 5 vecteurs d'expression est nécessaire : le vecteur comportant la dCas9-VPR et 4 vecteurs indépendants codant chacun pour un gARN. Le fait de multiplier les vecteurs ne facilite pas la reproductibilité des résultats, en effet il est fort probable que certaines cellules ne reçoivent pas la totalité des vecteurs lors des conditions de transfection multiples. Ainsi, la construction d'un plasmide qui permettrait d'exprimer l'ensemble des gARN en un temps permet de simplifier l'approche. Nous avons utilisé la technique du Golden Gate pour multiplexer le gRNA dans un seul vecteur. Dans un premier temps, afin de valider cette nouvelle approche, nous avons utilisé les 4 gARN préalablement utilisés pour transactiver MYOD (et utilisé en Figure 1). Afin de valider la nouvelle construction, plusieurs conditions de nucléofection ont été testées : trois concentrations différentes du vecteur dCas9-VPR (250, 500, 1000 ng) ainsi que quatre concentrations du nouveau vecteur multiplex gARN ciblant MyoD (180, 350, 500 et 700 ng) avec deux ratio molaires différents (2 :1 et 3 :1).



	VPR (ng/µl)	GG Myod1 (ng/µl)	ratio molaire
1	500	350	2/1
2	1000	700	2/1
3	250	180	2/1
4	500	500	3/1

Figure 26 : Création et validation d'un système unique d'expression multiplexée des gARN.

A. Carte du vecteur d'expression intégrant les 4 gARN ciblant MYOD précédemment validés. Ce système permet l'expression en un temps des 4 gARN, permettant ainsi de simplifier les étapes de transfection. **B.** Comparaison de différentes conditions de transfection montrant que la condition 2 (1µg dCAS9-VPR et 700 ng du plasmide gRNA multiplex MYOD) permet une activation de l'expression de MYOD similaire à celle obtenue avec la transfection individuelle des 4 vecteurs codant séparément pour un gARN. **C.** Dose et ratio molaire utilisés.

CONFIDENTIEL

Dessin de 4 nouveaux gARN de GATA4

A la suite de ces résultats, nous ciblons maintenant GATA4. Les amorces dessinées se situent dans les mille paires de bases en amont du site de démarrage de la transcription du gène GATA4. Quatre positions différentes ont été retenues dans les zones prédites comme étant des zones activatrices. Le clonage est identique à ce qui a été décrit précédemment pour les guides des gènes Ascl1 et MyoD (4 vecteurs séparés pour chaque gARN, nommés GATA-1 à GATA-4). Quatre conditions de nucléofections ont été testées comprenant 1 (Gata-2),2 (Gata-2 et Gata-1),3 (Gata2, Gata-1 et Gata-4) ou 4gARN (Gata2, Gata-1, Gata-4 et Gata-3) ciblant GATA4 avec pour chaque condition 500ng de vecteur et 1µg de chacun des quatre guides.

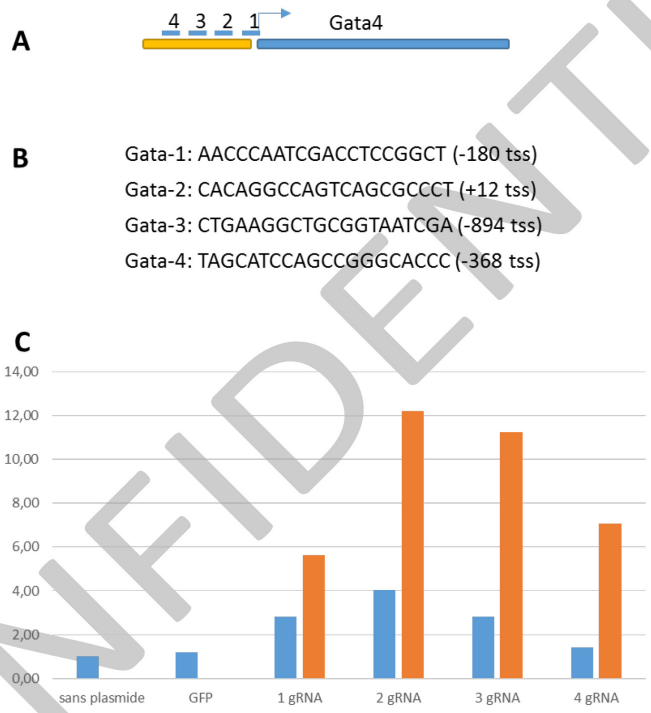


Figure 27 : Dessin et validation de 4 nouveaux gARN ciblant la région promotrice du gène GATA4 codant pour un facteur de transcription essentiel dans l'initiation de la formation du mésoderme pré-cardiaque.

A. Position des 4 gARN sur la région promotrice du gène. **B.** Séquence et position des 4 gARN. **C.** Transfert de dCas9-VPR et de 1, 2,3 ou 4 gARN contre GATA4. Les gARN sont insérés séparément dans un vecteur d'expression. Les résultats bruts (en bleu) montrent une augmentation d'expression par un facteur 4 obtenu au mieux après transfert de 2 gARN. Les barres rouges représentent un ajustement d'expression pour tenir compte des différences théoriques du niveau de transfection de l'ensemble des plasmides (d'une double transfection pour la condition 1gARN à une quintuple transfection pour la condition 4gARN). Après ajustement, le maximum d'activation semble être obtenu avec un minimum de 2gARN.

CONFIDENTIEL

Création du vecteur d'expression multiplexé GATA4, Mef2c et Tbx5

Afin d'activer un programme cardiogénique complet, nous ciblons maintenant 3 facteurs de transcription clés de la formation du mésoderme pré-cardiaque et de la génération des cardiomyocytes : GATA4, Mef2c, Tbx5. Selon les résultats précédents, il est décidé d'utiliser 2 gARN par gène ciblé afin de procéder à leur transactivation. De plus, l'objectif est de créer un vecteur multiplex contenant les 2gARN pour les 3 gènes cibles (total de 6 gARN). Ce nouveau vecteur permettrait ainsi d'obtenir en un temps, l'activation simultanée de 3 gènes différents.

Pour développer cette approche, la technique du Golden Gate est utilisée pour créer le vecteur multiplexé contenant chacun des gARN contre les trois gènes de la cardiogenèse Gata4, Mef2c et Tbx5. L'approche est identique à celle décrite précédemment pour le multiplexage des 4 gARN de MyoD. Nous nous sommes appuyés pour cela sur la figure 3C qui montre un effet correct par PCR quantitative de la surexpression de Gata4 avec seulement 2 guides.

L'activité du nouveau système est testée de manière similaire aux précédentes expérimentations. Trois conditions de nucléofection sont comparées : un vecteur d'expression de gARN vide (contrôle négatif), le nouveau vecteur multiplex GMT et les quatre guides ARN ciblant Gata 4.

Nous observons que le système GMT permet une augmentation forte de GATA4 et Mef2c. Cependant, l'utilisation de gARN contre GATA4 permet aussi d'augmenter un peu l'expression de Mef2c, un facteur de transcription activé secondairement par l'activation de GAT4. Ceci suggère que la sur-expression du gène cible GATA4 se traduit par une activation fonctionnelle d'un programme d'expression cardiogénique. De même, nous avons mesuré le niveau d'expression d'Isl1 et Nkx2.5, deux facteurs de transcription impliqués plus tardivement dans la formation des cardiomyocytes et non ciblés directement par nos systèmes. Nous observons une augmentation nette de leur niveau d'expression et ceci notamment avec le système GMT.

CONFIDENTIEL

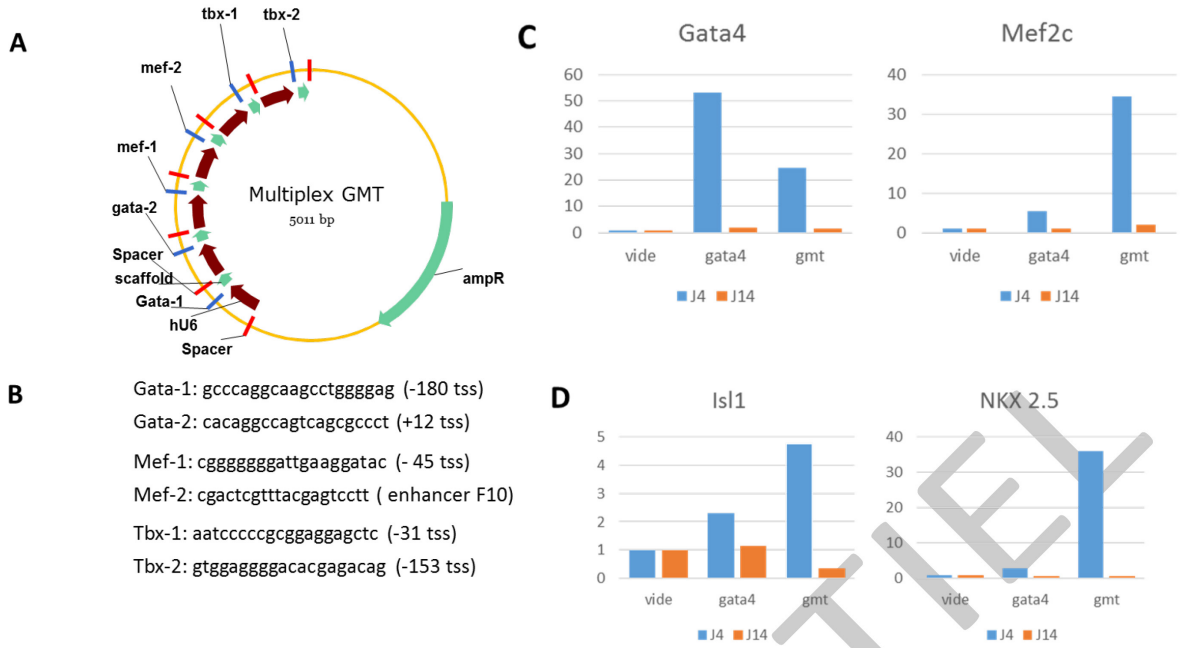


Figure 28 : Production d'une matrice permettant l'expression multiplexée de gARN contre trois gènes de la cardiogenèse : GATA4, Mef2c et Tbx5.

Couplé à dCas9-VPR, ce système permet ainsi d'activer simultanément l'expression des trois gènes. **A.** Carte du vecteur multiplex GMT (pour GATA4 / Mef2c / Tbx5). L'expression des 6 gARN est sous la dépendance d'un promoteur commun hU6. **B.** Séquence et position par rapport au codon d'initiation des gARN ciblant les régions promotrices de chaque gène. **C.** Validation de l'activation transitoire de l'expression de GATA4 et de Mef2c après transfert du système GMT. Les meilleurs résultats sont obtenus à J4 après transfection alors que la transactivation n'est plus observée 14 jours après transfection. Le système GMT permet de plus une augmentation homogène d'environ 30 fois de GATA4 et de Mef2c. Analyse de l'expression de Isl1 et de Nkx2.5, deux autres facteurs de transcription clés de la différenciation cardiomyocytaire et co-régulés par GATA4 et Mef2c. Le transfert de GMT permet indirectement d'allumer l'expression de ces deux facteurs dans des proportions importantes.

Mise au point d'un nouveau protocole de différenciation basée sur l'approche de transactivation spécifique d'un programme cardiogénique

a. Définition des milieux de culture

La première étape a consisté à comparer différentes conditions de nucléofection pour le transfert du matériel génique (plasmides d'expression dCas9-VPR et vecteur multiplex GMT ou vecteur contrôle correspondant à la structure multiplex mais sans les ARN guides). L'utilisation d'un plasmide codant pour la GFP a servi de témoin positif de la nucléofection (fourni par le kit).

Dans une première manipulation, les cellules iPS ont été maintenues en milieu mTesr1 pendant 7 jours après la nucléofection. L'observation des cultures montre une hyperprolifération des cellules souches

CONFIDENTIEL

pluripotentes induites dans ce milieu riche en facteurs de maintien de la pluripotence. Il est donc très probable que ce milieu induit une sélection privilégiée des cellules de types pluripotentes au dépend des cellules partant en différenciation.

Nous avons donc ensuite reproduit les mêmes conditions de nucléofection mais les cellules ont été maintenues en mTesr1 pendant 48 heures puis placées dans un milieu pauvre de type B27 sans insuline. Nous avons observé une mortalité très importante des cellules, ne permettant pas d'analyses complémentaires.

Nous avons donc modifié les conditions de milieu de culture en conservant une première phase de 48h de mTesr1 puis en changeant le milieu B27 sans insuline pour un milieu nourricier neutre proposé pour la différenciation des cardiomyocytes (milieu essential E6, thermo Fischer). Dans ces conditions, nous n'avons pas observé de sur-mortalité ou d'hyper-prolifération.

Ce protocole de 48h de mTesr1 après nucléofection puis passage en milieu essentiel E6 a donc été sélectionné pour la suite des expérimentations.

b. Définition des concentrations de vecteurs d'expression

Nous avons ensuite comparé 3 différentes concentrations du plasmide d'expression multiplex GMT afin d'établir les meilleures conditions de sur-expression des gènes d'intérêt dans les cellules de type iPS.

Dans cette première expérimentation, nous avons comparé les 4 groupes suivant :

Contrôle : 5µg VPR + 5µg vecteur vide SpgRNA

Gata : 5µg VPR + 3µg de chacun des 4 gRNA

GMT1 : 10µg VPR + 10µg GMT

GMT2 : 20µg VPR + 20 µg GMT

GMT3 : 30µg VPR + 30 µg GMT

L'expression des gènes GATA4 et Mef2c a été mesurée par qRTPCR 4 et 7 jours après la transfection (Figure 5). On observe un effet dose du multiplex GMT, la transfection de 20µg et 30µg des plasmides étant associée à une augmentation plus important d'expression des gènes cibles, de manière homogène, 8 à 10 fois plus importante que la condition contrôle (vide) et 3 fois plus importante qu'avec la plus petite dose de GMT. Par contre, la condition GMT3 est associée à l'augmentation la plus importante d'expression, mais la différence avec la condition GMT2 est limitée. Ainsi les conditions d'utilisation du multiplex GMT et de dCas9-VPR à la dose de 20 µg et en ratio 3 :1 (ratio molaire) est retenue par la suite.

CONFIDENTIEL

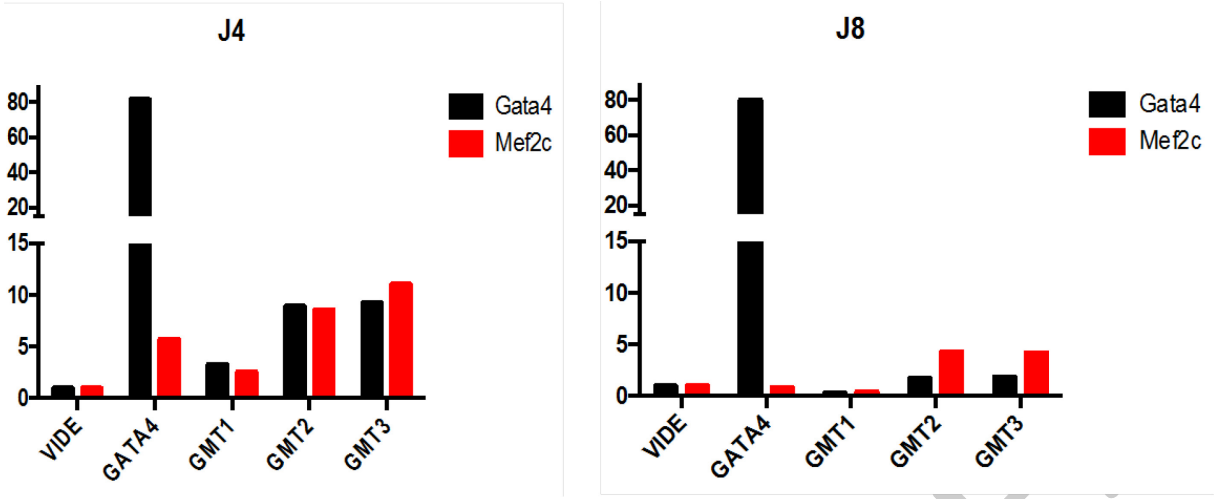


Figure 29 : Expression de GATA4 et Mef2c, 4 et 8 jours après transfection de sondes contre GATA4 ou de trois concentrations croissantes de GMT.

c. Effet de la surexpression GMT et optimisation de l'effet GMT par combinaison à une approche pharmacologique

Dans une première expérimentation, les cellules iPS ont été nucléofectées selon le protocole préalablement établi. Deux conditions ont été comparées :

- Vide : 5µg VPR + 5µg SpgRNA
- GMT : 20µg VPR + 20 µg GMT

Les cellules ont été conservées en milieu mTesr1 pendant 48h puis placées en milieu E6. Une partie des cellules a été lysée 48h plus tard (J4) pour vérifier l'augmentation d'expression des gènes cibles dans la manipulation. Une autre partie des cellules a été maintenue pendant 12 jours supplémentaires en milieu E6, afin d'observer l'apparition de cellules de type cardiomyocytes. A l'issue de ces 14 jours, les cellules ont été lysées et nous avons observé une augmentation faible (+33%) de l'expression de la troponine cardiaque (TNNT2) mesurée par qRT-PCR. Il est difficile dans ces expérimentations de distinguer l'effet de GMT car il est possible que les cellules transfectées (et qui seraient orientés vers une différenciation mésordermique) cohabitent avec des cellules non transfectées (et qui vont avoir une différenciation spontanée vers l'ensemble des feuillets mésoderme, ectoderme et endoderme). Ainsi, le signal propre à GMT peut être noyé dans ces conditions.

Pour remédier à ceci, nous avons eu l'idée d'appliquer une stimulation pharmacologique après la transfection du système GMT (ou contrôle). Ainsi, toutes les cellules (avec ou sans système) sont incitées à se différencier vers la voie mésodermique, mais l'hypothése était que les cellules transfectées avec le système GMT aient une différenciation facilitée et accélérée dans cette voie.

CONFIDENTIEL

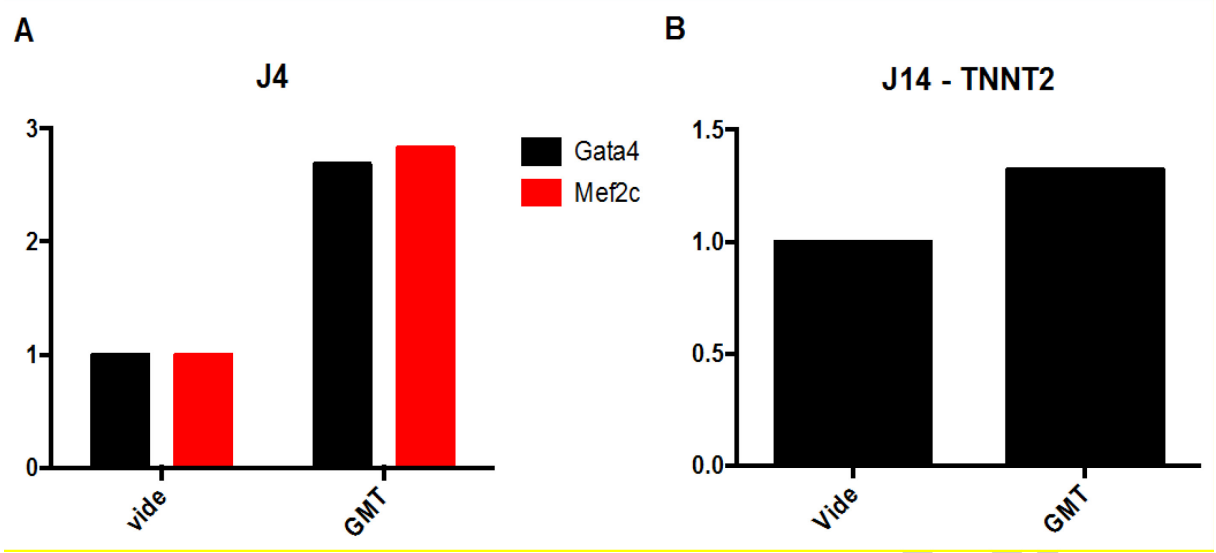


Figure 30 : A. Sur-expression de Gata4, Mef2c et Tbx5, 4 jours après la nucléofection B. expression de la cTNT (TNNT2) 14 jours après la transfection de dCas9-VPR et multiplex GMT par rapport à un contrôle

Nous avons utilisé deux molécules pharmacologiques utilisées dans la différenciation des cellules souches pluripotentes induites pour induire la transformation mésordermique. Le premier est un inhibiteur de GSK3 (CHIR90021) et la seconde est un inhibiteur de la voie Wnt (IWP-2), tel que décrit précédemment. Dans les protocoles de différenciation de cellules iPS en cardiomyocytes, ces molécules sont utilisées successivement afin de pouvoir manipuler des voies de signalisation clé de la cardiogénèse. Le CHIR90021 est appliqué dans les 3 premiers jours pour amorcer la différenciation des cellules pluripotentes puis la molécule IWP-2 est appliquée pendant 2 jours (J3 à J5) pour induire la différenciation vers les progéniteurs cardiaques.

Compte-tenu des différences liées à la nucléofection des cellules iPS et la nécessité de les réensemencer après cette nucléofection, nous avons décidé de respecter une fenêtre de 48h où les cellules sont remises en milieu mTesr1 sans stimulation pharmacologique (selon les conditions définies préalablement, point a).

CONFIDENTIEL

Par la suite, nous avons dessiné 4 protocoles de stimulation pharmacologique (tous les quatre sur milieu essentiel E6) :

- Protocole 1 « successif » (nommé ChirJ2 IWP2 J4) : CHIR90021 (6µM) est appliqué entre J2 et J4 puis IWP2 (5µM) entre J4 et J6
- Protocole 2 « accéléré » (nommé ChirJ2 IWP2 J2) : Les deux molécules CHIR90021 (6µM) et IWP2 (5µM) sont appliquées en même temps entre J2 et J4
- Protocole 3 « monothérapie précoce » (nommé IWP2 J2) : IWP2 (5µM) est appliqué seul entre J2 et J4
- Protocole 4 « monothérapie tardive » (nommé IWP2 J4) : IWP2 (5µM) est appliqué seul entre J4 et J6

Ces différents protocoles sont ensuite comparés après une transfection contrôle (vecteur VPR et vecteur gARN vide, ratio 1 :1) en comparaison avec le multiplex GMT (vecteur VPR et vecteur multiplex GMT, ratio 1 :1) selon les conditions préalablement définies.

Les cellules sont ensuite lysées 7 jours après la nucléofection et l'expression génique a été mesurée par qRTPCR. Enfin, quelques puits sont utilisés à J4 pour juger de l'efficacité de l'approche GMT (cellules iPS laissées en milieu mTesr1 pour 48h puis E6 pour 48h).

Les résultats montrent tout d'abord une très bonne efficacité de l'approche GMT avec une sur-expression de plus de 10 fois des 3 gènes cibles GATA4, Mef2c et Tbx5 (a). La comparaison de l'expression de la troponine cardiaque 7 jours après la nucléofection identifie l'effet synergique de la combinaison GMT et stimulation pharmacologique. Ces résultats sont confirmés par les analyses en cytométrie et en immunofluorescence. Dans les groupes contrôles, seul le protocole pharmacologique ChirJ2 IWP2 J4 est associé à une augmentation de l'expression de TNNT2, ce qui est rapport avec l'effet attendu de l'application successive des deux molécules. Cependant, cet effet est très nettement amplifié lorsque les cellules iPS ont reçu le multiplex GMT (multiplication par 6 du niveau d'expression). Surtout, alors qu'en condition contrôle, la stimulation pharmacologique simultanée par CHIR et IWP2 n'augmente pas l'expression de TNNT2, cette même stimulation combinée au multiplex GMT produit l'augmentation la plus importante de l'expression de TNNT2 (augmentation par un facteur 57). Il faut noter que l'administration d'IWP2 seul ne se traduit pas par une augmentation d'expression de TNNT2 et ceci quel que soit le temps d'administration (J2 vs J4) ou la présence ou non du système GMT.

CONFIDENTIEL

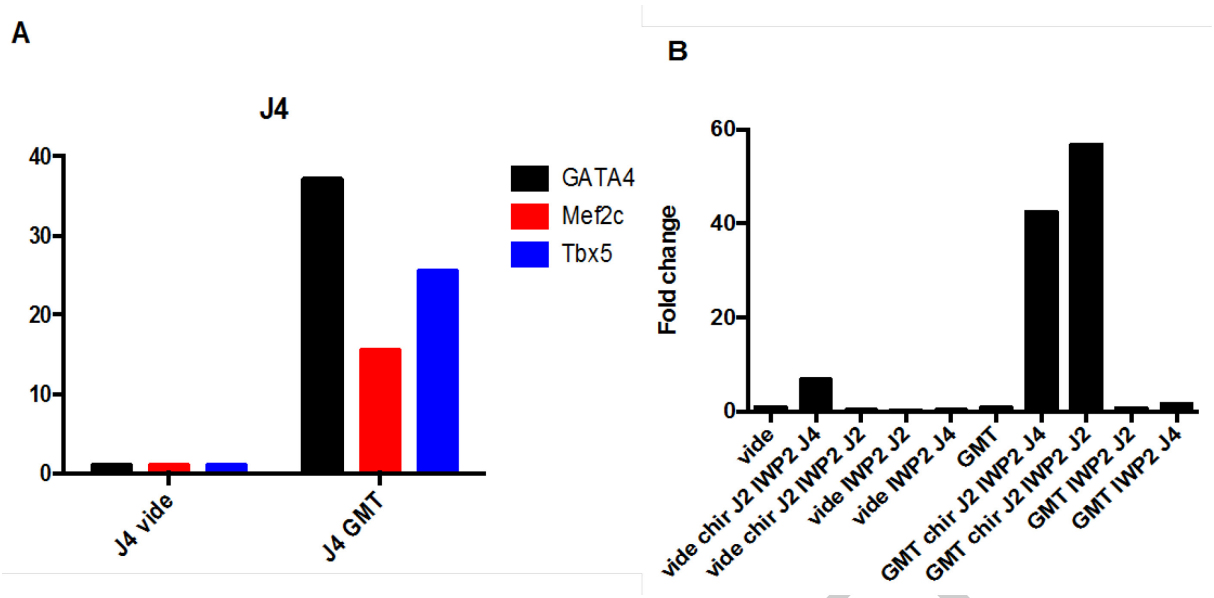


Figure 31 : Optimisation de l'effet GMT par combinaison à une approche pharmacologique.

A. Surexpression de Gata4, Mef2c et Tbx5, 4 jours après la nucléofection. B. Expression de TNNT2 7 jours après la transfection du vecteur contrôle (vide) ou du multiplex GMT

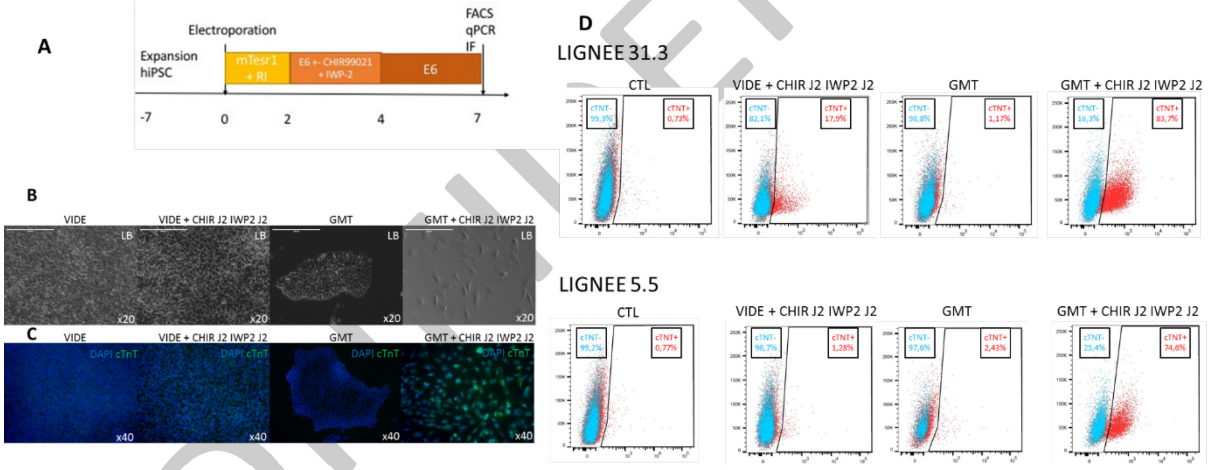


Figure 32 : Nouveau schéma expérimental de différenciation par approche GMT combinée à une stimulation pharmacologique.

A. Principe schématique de la différenciation cardiaque de cellules hiPSC avec le system GMT et stimulation pharmacologique. **B.** Aspect des cellules à J7 dans les 4 différentes conditions : contrôle seul, contrôle + stimulation pharmacologique, GMT seul et GMT + stimulation pharmacologique. **C.** Les cellules GMT+pharmaco expriment la troponine cardiaque à J7 **D.** Résultats de l'expression de cTNT par analyse en cytométrie sur deux lignées iPS différentes montrant dans les deux cas l'augmentation majeure de l'expression de cTNT dans les conditions GMT+pharmaco par rapport aux conditions contrôles (stimulation pharmacologique seule notamment).

Conclusions

Les résultats montrent une formation accélérée et massive de cellules exprimant la troponine cardiaque dans les conditions combinant les gènes GMT et l'addition pharmacologique de CHIR et IWP2 pendant 2 jours (entre J2 et J4 après nucléofection). Ces résultats sont observés dès le 7ème jour après nucléofection. Les résultats sont reproduits dans deux lignées iPS différentes, démontrant la reproductibilité entre lignées de l'approche. Nous avons ainsi développé une nouvelle méthode de différenciation cardiaque qui est basé sur l'activation moléculaire ciblée de facteurs impliqués dans la cardiogénèse. Cette méthode est plus rapide que les méthodes de différenciation rapportée jusqu'ici. Nous sommes en train de reproduire et de développer ces résultats préliminaires, obtenus durant les derniers mois de ma thèse. Une étude fonctionnelle des cardiomyocytes obtenu s'impose. Il faudrait vérifier la morphologie des cardiomyocytes obtenus et leus degré de maturité. Une autre perspective serait de tester d'autres guides ARN. Ceci pourrait induire un effet plus direct peut-être sans l'utilisation de molécules pharmacologiques.

CONFIDENTIEL

Discussion générale et perspectives

CONFIDENTIEL

Mon travail de doctorat a été centré sur le processus de différenciation cardiaque en cardiomyocytes de cellules souches pluripotentes induites et ceci afin d'optimiser leur capacité à modéliser différentes maladies cardiaques.

Dans ce travail nous avons démontré :

1. Que la quantité mais aussi la qualité finale des cardiomyocytes dérivés d'iPSC dépend des conditions spatiales et pharmacologiques utilisées durant les différentes étapes de différenciation.
2. Que l'utilisation d'un protocole de différentiation en monocouche avec blocage simultané et transitoire de l'ensemble des voies Wnt (canoniques et non canoniques) permet d'obtenir une maturation plus importante du sarcomère, étape essentielle pour la modélisation des sarcomèropathies
3. Que la différenciation des iPSC en cardiomyocytes peut aussi être obtenue par une approche moléculaire ciblée visant à activer spécifiquement un programme cardiogénique. Celle-ci est obtenue via l'utilisation d'une protéine Cas9 mutée et couplée à un système transactivateur (dit VPR) et permettant le ciblage simultané de 3 facteurs de transcription clés de la cardiogénèse (Gata4, Mef2c et Tbx5).
4. Que cette approche moléculaire est potentialisée par la combinaison avec une stimulation pharmacologique ciblant la voie Wnt
5. Qu'au-delà de la modélisation des pathologies cardiaques monogéniques, les cardiomyocytes dérivés d'iPSC permettent de reproduire des pathologies plus complexes et multigéniques

La découverte des IPSC en 2006 a été une grande avancée dans la recherche médicale. Comparé aux cellules souches embryonnaires humaines, les cellules iPSC sont plus faciles à obtenir et ne posent pas les mêmes enjeux éthiques pour leur génération et leur utilisation. Mais l'un des avantages majeurs réside dans le fait que les iPSC sont issues de patients et offrent donc la possibilité de reproduire *in vitro* des pathologies d'origine génétique propre d'un patient donné. La méthode d'origine d'obtention des iPSC se base sur la reprogrammation de cellules somatiques de type fibroblastes dermiques (Okita et al,). Les fibroblastes de patients sont généralement obtenus par une biopsie cutanée de taille très limitée. Cette biopsie est ensuite préparée afin de pouvoir en extraire des fibroblastes primaires qui sont ensuite cultivés et multipliés *in vitro*. L'ensemble des lignées iPSC utilisées dans ce travail de doctorat ont été obtenus à partir de fibroblastes dermiques. Si l'approche est assez peu invasive, elle présente certains inconvénients liés à la réticence des patients ou aux complications locales. Elle nécessite une anesthésie locale, qui doit être bien choisi considérant la profondeur du prélèvement. Ainsi, pour résoudre ces problèmes, de nouvelles méthodes d'obtention des iPSC ont été mise en place

CONFIDENTIEL

à partir de prélèvements moins invasifs. Récemment, l'obtention des iPSC à partir des cellules CD43+ sanguine a été rapporté. Dans cette approche, un simple prélèvement sanguin est suffisant pour l'obtention des iPSC. Une autre méthode encore moins invasive est la dérivation iPSC à partir de cellules urinaires. Dans cette méthode, des progéniteurs de cellules épithéliales sont reprogrammés (Chou et al, 2015). Cette méthode a un grand potentiel car l'urine est facile à collecter, sans intervention invasive ni stress pour le patient. Le coût de cette méthode est aussi limité. Compte-tenu des différences entre les cellules d'origine, il est possible qu'il n'existe pas d'équivalence parfaite entre les différents clones d'iPS obtenus à partir de ces différentes cellules somatiques. Dans ce travail, nous avons comparé les réponses de plusieurs clones iPSC, provenant de différents donneurs, mais qui provenaient tous de fibroblastes dermiques. Nous n'avons pas étudié de cellules iPSC dérivés à partir de prélèvements sanguins ou urinaires et il ne nous est donc pas possible d'affirmer que l'ensemble de nos résultats seraient reproduits sur des clones de ce type. Dans un travail récent, il a ainsi été démontré que la capacité de différenciations (en cellules hématopoiétiques) de différents clones de cellules iPS est influencée par des variations épigénétiques inter-clones (Nishizawa et al. 2016). Les sources diverses d'iPSC sont une des explications avancées pour expliquer ces variations épigénétiques. Il faut cependant noter que nous avons conduit notre travail sur plusieurs clones en parallèle afin de vérifier la reproductibilité de nos résultats sur différents clones d'iPSC.

Le modèle de cardiomyocytes dérivés d'iPSc est une approche relativement nouvelle. Différents protocoles de différenciation des iPSCs en CM ont été développés, même s'ils restent en nombre relativement limité. Beaucoup de critiques sur les CM dérivés d'iPSC sont tournés sur l'immaturité relative de ces cellules par rapport à des cardiomyocytes adultes humains. Ceci représente en effet une limite importante aux protocoles actuels. Cependant, il est moins souvent noté que l'un des problèmes majeurs des protocoles de différenciation est plus celui de l'hétérogénéité de différenciation et de maturité des cellules obtenues. Pour cette raison, nous avons mis en place plusieurs outils d'analyse de débit plus élevé que les techniques actuellement disponibles, nous permettant ainsi une appréciation plus globale de l'hétérogénéité de différenciation.
Dans mon premier travail (Jeziorowska et al, en soumission) nous avons mis en évidence l'importance d'une action combinée sur les voies canoniques mais aussi sur les voies non canoniques de la voie Wnt. L'utilisation d'IWP2 est associée à une augmentation du ratio d'expression cTni/ssTni qui est un marqueur reconnu de la maturation des cardiomyocytes au niveau de leur sarcomère. Il faut noter que cette différence est surtout liée à une diminution de l'expression de la forme ssTni suggérant un engagmenet plus fort des cellules stimulées par IWP2 vers la voie cardiomyocytaire (par opposition à d'autres types cellulaires musculaires). De plus, et de manière plus fine, les cardiomyocytes obtenus

CONFIDENTIEL

après stimuation par IWP2 présentent une distribution des tailles cellulaires plus concentrée, suggérant donc une meilleure homogénéité de différenciation par rapport aux autres protocoles.

Plusieurs études ont démontré que le temps d'activation et/ou d'inhibition d'une voie est d'une importance cruciale. La transformation des iPSC en cellules de mésoderme peut être obtenue en agissant pour la voie BMP/Activin A (voies TGFβ) mais aussi en inhibant la voie GSK3 qui va activer la voie Wnt β-catenine dépendant. Pour obtenir des progéniteurs cardiaques une inhibition de la Wnt est ensuite nécessaire. Il existe beaucoup d'inhibiteurs de cette voie mais qui possèdent différents mécanismes d'Action. Ainsi, ces inhibiteurs se différencient par leur cible. L'inhibiteur le plus ancien est le DKK1 qui réagit sur la voie Fz de la voie Wnt. D'autres petites molécules chimiques inhibant les différents acteurs de la voie Wnt ont été développées. Les inhibiteurs les plus connues sont les familles IWR et IWP. Les inhibiteur IWR sont spécifiques de la voie Wnt βcatenin dépendant et agissent sur la réponse de la voie Wnt canonique. Par contre les inhibiteur IWP agissent sur la production de la Wnt, donc ils interviennent sur toutes les voies Wnt comme la voie βcatenin dépendant, la voie Calmodulin dépendant ou la voie RhoA dépendant. La voie calmodulin/NFAT dépendant est connue pour réguler la croissance des cardiomyocytes et la cytoarchitecture des cardiomyocytes. De même, la voie JNK est essentielle pour la croissance hypertrophique des cardiomyocytes et dans la protection des cardiomyocytes à un stress notamment ischémique. Ainsi, ces deux voies semblent être de bonnes candidates pour expliquer nos résultats. A notre connaissance, le rôle de ces voies dans la formation du sarcomère, a fortiori dans les cardiomyocytes dérivés d'IPSC, n'a jamais été décrit. Nos résultats posent donc la question de leur rôle précis dans la formation du sarcomère. De plus, il faut noter que nos résultats montrent que l'inhibition précoce de ces voies (J4-J5 de la différenciation) se traduit par une modification retardée (trois semaines plus tard) de la qualité du sarcomère obtenu. Ceci pourrait être expliqué par un changement précoce dans la destinée cellulaire ou bien par un effet rebond après levée de l'inhibition dans ces cellules devenues progénitrices cardiaques. Ces hypothèses devront être vérifiées.

CONFIDENTIEL

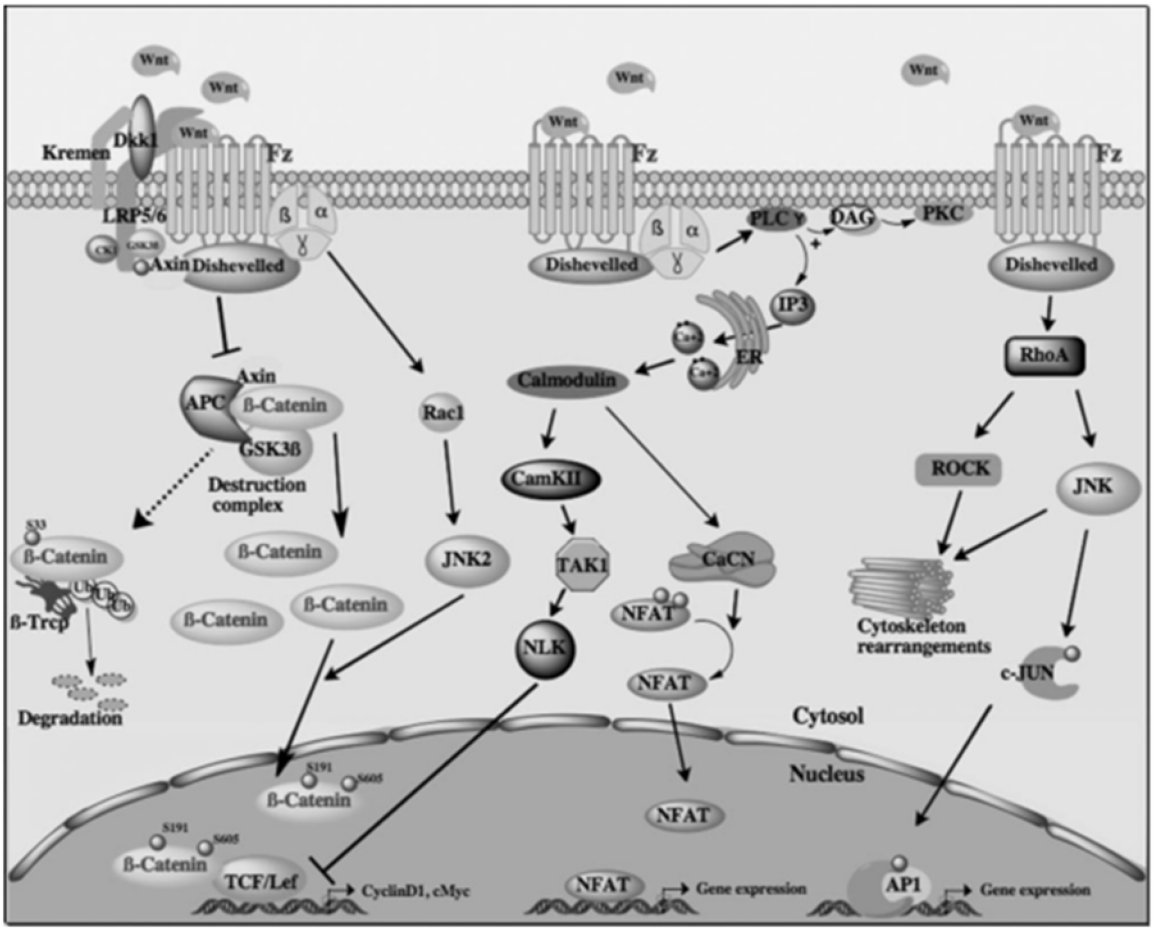


Figure 33: Vue d'ensemble des voies Wnt impliquées dans la maturation des cardiomyocytes.

Les cardiomyocytes dérivés des iPSC sont souvent considerés comme immatures pour plusieurs raisons. En comparaison à des cardiomyocytes adultes, ils présentent une forme souvent ronde ou triangulaire, plus proche de celle observée dans des cardiomyocytes néonataux. Ils possédent un seul noyau et leur alignement myofibillaire est chaotique. Leur sarcomère est court et desorganisé, ils ne possédent pas de T-tubules. Il n'y a que des bandes Z et I qui sont detectées en microscopie. Les différences d'expression des génes et de fonctionnalité des ces cellules sont aussi observées. Il a été rapporté que dans des cardiomyocytes derivés d'iPSc, les génes prédominant sont des gènes fœtaux comme l'αMHC et ssTNI et pas des génes présents dans des cardiomyocytes adultes comme βMHc et cTNI. Il a été aussi rapporté que ces cellules expriment trés peu la calsequestrin, le phospholambam, le récepteur de ryanodine et SERCA qui sont des acteurs majeurs des cardiomyocytes et de leurs transports des ions. Leur immaturité électrique a aussi été rapportée. Il est très difficile de pouvoir comparer ces résultats à ceux que nous avons obtenus car les conditions de différenciation étaient trés différentes et peuvent ainsi avoir influencé ces résultats. Dans notre travail, nous avons ainsi utilisé des cardiomyocytes humains isolés d'explants (au moment d'une transplantation ou d'une mise en place d'une assistance circulatoire ventriculaire) afin de pouvoir disposer d'un comparateur plus fiable.

Il faut noter que cette approche reste imparfaite car ces cardiomyocytes adultes humains proviennent de cœurs pathologiques mais nous ne pouvons accèder à des prélévements normaux. Nos résultats montrent que le protocole en monocouche et en agissant sur toutes les voies Wnt par l'inhibition de la production de Wnt permet d'obtenir des cellules plus matures que celles précédemment décrites dans la littérature et ceci sur plusieurs critères. Il faut cependant noter que l'expression des protéines clés du sarcomère ou du cycle calcique restent bien en decà de ceux observés dans les cardiomyocytes humains isolés à partir d'explants. Ceci démontre qu'il reste un chemin important à parcourir pour permettre d'obtenir une formation et une expression similaire à celle observée chez l'homme en ce qui concerne l'appareil contractile des cardiomyocytes. A l'inverse, on notera que l'expression des principaux canaux ioniques cardiaques était assez similaire à celle observée dans les cardiomyocytes humains isolés à partir d'explants. De même, il n'existe pas de différences notables entre les trois protocoles testés. Ceci suggère donc que les protocoles de différenciation cardiaque sont actuellement plus adaptés pour la formation de l'appareil électrophysiologique que pour l'appareil contractile, suggérant donc qu'ils sont actuellement plus adaptés pour la modélisation de canalopathies que de sarcoméropathies. Ceci explique potentiellement pourquoi de nombreuses équipes ont utilisées les cardiomyocytes dérivés d'IPS pour modéliser les pathologies cardiaques rythmiques (de type QT long par exemple) alors que très peu d'équipes ont utilisées ces modèles pour les sarcoméropathies (de type cardiomyopathie hypertrophique ou dilatée). Dans un de nos travaux, nous avons ainsi pu montré l'utilité de ce modèle pour reproduire le QT long induit par médicament, un syndrôme pharmacogénétique complexe, qui survient chez des patients présentant une prédisposition à développer une réponse extrême et inadaptée à un stimulus pharmacologique. Dans quelle mesure les cellules iPS pourraient aussi reproduire des pathologies multigéniques affectant d'autres composants cellulaires (comme les sarcomères) est aujourd'hui incertain et devra faire l'objet d'autres études.

Nous pouvons améliorer la maturité des cardiomyocytes dérivés d'iPSC en utilisant différentes strategies :

CONFIDENTIEL

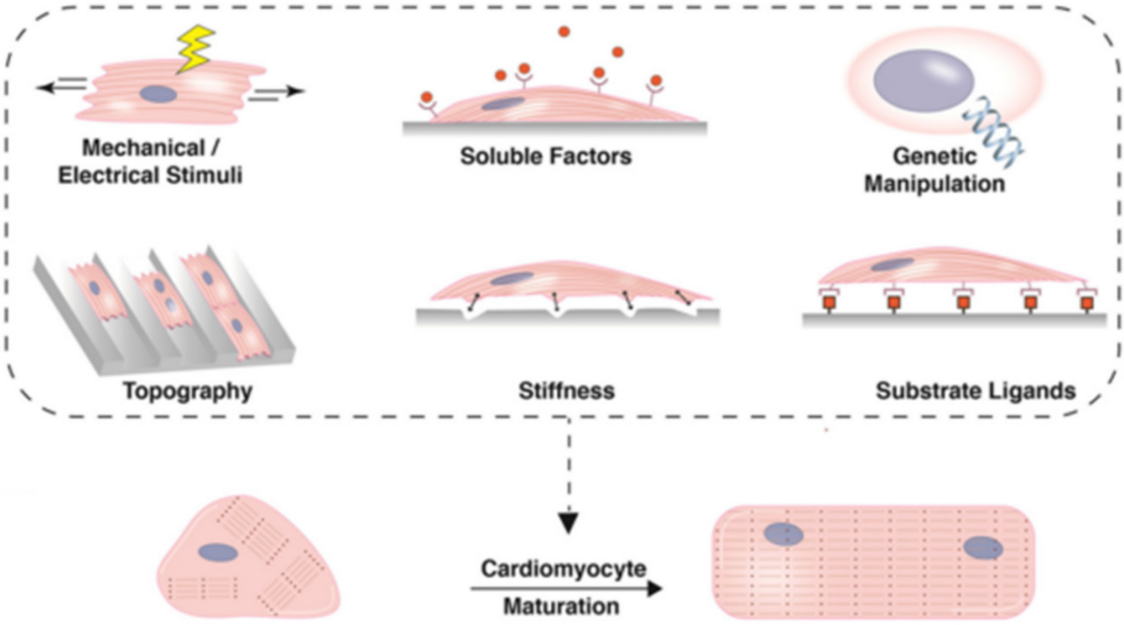


Figure 34 : Stratégies de maturation de CM dérivés des iPSC.

- L'addition de petites molécules solubles.

Il a été démontré que l'addition de le T3 (Triiodothyronine) (X. Yang, Pabon, and Murry 2014) pendant le processus de différenciation peut influencer le changement d'isoformes de plusieurs protéines du myocarde comme les MHC et la titine. La T3 est essentielle pour un développement cardiaque normal et pendant la période périnatale. L'addition de la T3 pendant une à deux semaines de la différenciation cardiaque conduit à des modifications conformes à la maturation comme une surexpression de βMHC et une réduction de la prolifération. Par contre les cellules restent mononuclées. Cette méthode de maturation n'est donc pas suffisante. Un autre groupe de recherche a essayé d'utiliser une combinaison d'insuline, un glucocorticoïde et l'IBMX (3-isobutyl-1-methil-xanthine) qui est un inhibiteur de phosphodiesterase. Cette combinaison est utilisée pour une maturation métabolique par une augmentation de synthèse des acides gras. Ceci est obtenu par une activation de PPARα qui améliore la phosphorylation oxydative mitochondriale. Si on continue à ajouter les activateurs de PPARγ comme la rosiglitazone et indométhacine, ceci cause des augmentations anormales de PPARγ. Cette expérience a été faite chez les CM dérivés des iPSc de patients présentant une DVDA (Wen et al, 2015). Ces conditions de culture ont permis de reproduire le phénotype pathologique de ces patients comme l'accumulation de gouttelettes lipidiques, l'apoptose, la sous-expression du canal sodique et une transitoire calcique altérée, mais ceci n'a pas conduit à une maturation augmentée des cardiomyocytes. La formule optimale pour obtenir des cardiomyocytes matures n'était donc pas encore trouvée.

CONFIDEN

- Stimulation mécanique et électrique

Pour mimer le couplage excitation-contraction une stimulation électrique est utilisée. Il a été démontré qu'en comparaison avec des cellules non stimulées, la stimulation induit l'élongation des cardiomyocytes, une augmentation du volume du sarcomère, le nombre de mitochondries, le nombre de jonctions et la contractilité. Pour des CM dérivés des iPSC une adaptation est nécessaire. En 2013, Nunes et al, ont construit une plateforme de maturation des cardiomyocytes en 3D en augmentant la fréquence de la stimulation électrique. Un autre groupe a ensemencé des CM dérivés de iPSC sur des moules en gélatine qui ont été soumis à un stress d'étirage. Ces cellules ont montré des signes de maturation comme l'élongation, l'expression de protéines de jonctions et canaux ioniques (Nunes et al, 2013). Ces méthodes de stimulation mécanique et électrique sont très difficiles à mettre au point et nécessitent des équipements adaptés aux incubateurs.

- Substrats et matrice extracellulaire

La composition chimique du substrat et sa structure peuvent avoir une influence significative sur la maturité de CM dérivées d'iPSC. Il a été démontré que différentes matrices extracellulaires influencent la structure et le comportement des cellules. En 2015, Chun et al, a identifié une combinaison de polymères contenant 4% de polyéthylène glycol et 96% de PCL carboxylé. Cette combinaison augmente le taux de contractilité des CM ainsi que leur fonction mitochondriale. Ceci a été confirmé par une augmentation de l'expression de MLC2v, l'integrin α7 et du changement d'isoforme de la Troponin I de sa forme fœtale ssTnI par sa forme adulte cTnI (Chun et al, 2015). Patel et ses collègues ont criblé près de 700 polymères pour leur utilité en tant que substrats de croissance pour CM dérives d'iPSC. Ceci a permis d'identifier l'isobornyle et tert-butylamino-éthyle sur lequel les CM dérivés d'iPSC ont présenté des sarcomères plus longs par rapport aux témoins sur gélatine (Patel et al, 2015). La découverte d'un polymère idéal n'a pas encore été faite mais les améliorations sont encourageantes.

- Topographie

Il a été démontré que les CM dérivées d'iPSC cultivés sur des « micropatterns » montrent un allongement cellulaire, une meilleure organisation sarcomérique, une amélioration des propriétés du calcium et de la réponse à la caféine (Rao et al, 2013). Les cultures en micropatterns peuvent aussi être incorporées dans des films (ou MTFs pour « muscular thin films ») qui avec leur raideur et flexibilité miment les conditions présentes dans le myocarde. Les MTF ont été utilisés pour la modélisation de myopathie mitochondriale, le syndrome de Barth, qui est causé par des mutations dans le gène lié à

CONFIDENTIEL

l'X, Tafazzin (TAZ) (Wang et al, 2014). Le développement de MTF avec des électrodes intégrées et des systèmes de perfusion peuvent améliorer les tests pharmacologiques et les rendre rentables et évolutifs. Feaster et al, ont mis au point une méthode de culture de CM dérivés des iPSC en cellules isolées contractiles. Ils ont construit des matelas en matrigel pour forcer les cellules à s'allonger. Les cellules ont pris une forme allongée et leur sarcomère était organisé en comparaison avec des cellules cultivées traditionnellement. Malheureusement cette technique nécessite une dissociation de la monocouche des cardiomyocytes obtenus en culture et peut avoir comme conséquence une perte de la majorité des cellules striées.

- Systèmes en tissu 3D

Parallèlement au développement de divers systèmes 2D et MTF disponibles, des approches 3D ont été proposées. Ces systèmes 3D comportent les EHTs (engineered heart tissues) ou des CMTs (cardiacs microtissues). Les EHTs ont été mis en place dans plusieurs laboratoires de recherche. L'une des premières expériences a été menée au Mount Sinai Hospital (Laboratoire Costa) qui a inventé des moules personnalisés en polydimethylsiloxane (PDMS) pour créer des EHT individuels. Ils ont mélangé un million de CM dérivés des ESC ou iPSC avec un mélange de matrigel et collagène pour obtenir un tissu. Le tissu a été posé sur deux plots qui peuvent bouger avec la force de contraction spontanée du tissu. Ces tissus ont été caractérisés pour leur fonction contractile et électrophysiologique. Leur structure a été vérifiée par une coloration en Hematoxilyn et eosin (H&E) et aussi par immunofluorescence en ciblant des protéines cardiaques. Ils se sont rendu compte que les cellules s'organisent dans le tissu. Les fibroblastes vont se mettre en périphérie et les cardiomyocytes forment une fibre à l'intérieur pour entrainer la contraction. (Turnbull et al. 2014). La pureté de la différenciation cardiaque a souvent été mise en cause. Pendant la différenciation cardiaque des iPSC nous obtenons en effet une population mixte qui peut contribuer aussi à la structuration tissulaire. Comme je l'ai rapporté dans ma première publication, nous obtenons environ 20% de cardiomyocytes issus d'une différenciation en corps embryoïde et jusqu'à 60% issus d'une différenciation en monocouche. Ceci a été souvent remis en cause et différentes méthodes de purification de CM dérivées d'iPSC ont été proposées. Dans le laboratoire de Gordon Keller un marqueur de surface spécifique pour de CM dérivés des iPSC a été découvert. Le marqueur de surface SIRPA apparait à J9 de la différenciation et son expression augmente avec le temps. Ce marqueur permet la purification de CM d'iPSC par FACS ou des billes magnétiques.(Dubois et al. 2011) . Un autre marqueur utilisé pour la purification de CM d'iPSC est VCAM. Ces deux marqueurs sont présents à environ 50% dans une différenciation cardiaque. Un autre groupe qui a travaillé sur les EHT est le groupe de Thomas Eschenhagen. L'équipe a mis en place un système de peignes qui permet de préparer plusieurs EHT

CONFIDENTIEL

simultanément. Ils ont utilisé un mélange de fibrine et CM d'iPSC pour obtenir les tissus. Ils ont mis en évidence que pour obtenir un tissu comparable au myocarde, il faut utiliser une population mixte et l'utilisation d'une population trop pure a pour conséquence l'obtention de tissus non fonctionnels. Ils ont mis en place une plateforme pour stimuler les tissus électriquement et tester les réponses à différentes drogues (Eder et al. 2016). Dans le groupe de Christine Seidman, un autre modèle 3D a été développé pour étudier des mutations du sarcomère. Pour modéliser une sarcoméropathies qui affecte la titine, ils ont utilisé les CMTs pour étudier l'influence de la mutation de titine à l'organisation du sarcomère.(Hinson et al. 2015) Cette équipe a supplémenté leur CM d'iPSC avec 7% de cellules stromales pour obtenir la rigidité souhaitée. Tous ces modèles sont très prometteurs pour la modélisation de maladies cardiaques. Un autre problème qui peut se poser est la quantité de cardiomyocytes obtenus, compte-tenu des volumes de plus en plus importants demandés par ces approches tissulaires. De multiples plateformes de production en grande échelle ont été proposées. (Kempf et al, 2015). Une amélioration dans ce sens est cependant nécessaire.

- Manipulations génétiques

L'édition génomique ouvre beaucoup de portes pour la modélisation de maladies mais aussi pour l'amélioration de la différenciation cardiaque comme nous le démontrons pour la première fois dans ce travail. Les systèmes des endonucléases permettent d'introduire ou de corriger une mutation donnée (et en fait de modifier une séquence génomique à volonté). Ceci permet d'étudier l'influence de ces mutations dans un environnement génétique donné d'un patient ou dans un environnement neutre pour voir l'influence exacte de la mutation causale dans un environnement génétique prédisposant ou non. Un problème qui se pose avec cette méthode est l'effet off-target. Les endonucléases peuvent couper dans ces endroits non spécifiques à la mutation. Pour s'affranchir de ceci les systèmes qui coupent un seul brin ont été établis comme les outils de type nickase (Mali et al. 2013). Pour vérifier des effets off-target le plus simple est de séquencer les zones prédites *in silico* mais la méthode la plus fiable reste le séquençage haut débit du gènome entier (NGS), ce qui pose des problèmes de coût et d'analyse de masse de données importantes.

Cependant, le système CRISPR/Cas9 offre de nombreuses autres perspectives. Dans la dernière partie de ma thèse, nous nous sommes ainsi intéressés à l'influence de l'activation de gènes impliqués dans la cardiogenèse (GMT) via un système dérivé de CRISPR/Cas9. Afin d'établir la preuve de concept de cette approche moléculaire cible, nous avons sélectionné empiriquement trois facteurs de transcription clés de la cardiogénèse tels que décrits dans l'embryogénèse. Il faut noter que ces facteurs ont aussi été proposés récemment pour forcer la transdifférenciation de fibroblastes en cardiomyocytes. Ceci est obtenu par la sur-expression forcée de chacun de ces trois gènes. Notre

CONFIDENTIEL

approche se base sur un concept totalement différent. Ici, un véhicule commun (dCas9/VPR) est guidé sur chacune des zones promotrices des gènes ciblés ce qui a pour effet de transactiver l'expression de ce gène. Ceci peut être mené de manière simultanée en ciblant plusieurs gènes, permettant donc l'activation d'un programme génique. Nous avons ainsi construit un plasmide multiplex qui code pour 2 guides ARN pour chacun des trois facteurs ciblés. Ces guides ARN se situent dans les mille paires de bases en amont du site de démarrage de la transcription du gène. Les guides retenus ont été choisis dans des zones prédites comme étant des zones activatrices. Ce travail de prédiction a été fait en utilisant les base de données actuellement disponibles puis les séquences ont été validées une à une *in vitro*. Il peut exister une amélioration qui permettrait de trouver plus précisément des zones activatrices *in vitro* spécifiques. Nous proposons ainsi, pour des lignées iPSC du laboratoire, d'utiliser une nouvelle technique l'ATAC-Seq (Assay for Transposase Accessible Chromatin). Cette technique permet de découvrir les zones ouvertes de chromatine (ciblées par Tagmentation puis amplifiées et lues) afin d'obtenir une cartographie épigénétique plus approfondie. Cette analyse est basée sur une transposase hyperactive qui va fragmenter ou simultanément marquer le génome avec des adaptateurs de séquençage (Buenrostro et al. 2013). Ainsi cette carte permettrait de connaître les zones ouvertes de la chromatine et donc directement accessible au complexe dCas9VPR/sgRNA.

L'effet que nous avons observé en nucléofectant des lignées iPSC est un effet transitoire. Pour s'affranchir de cet effet, l'établissement d'une lignée stable qui exprime la dCas9 de façon stable serait une solution(Chavez et al. 2015). Cette partie de mon projet est en cours. Nous avons infecté une lignée contrôle avec deux lentivirus exprimant la dCas9 sous la contrôle deux promoteurs différents (PGK et EF1). Nous avons vérifié le nombre d'intégration dans le génome et maintenant nous testons cette lignée. Pour l'instant nous utilisons des plasmides exprimant les guides ARN mais une méthode moins invasive est envisageable. Une transfection de guide ARN simple brin pourrait être simple à mettre en place sur un modèle cellulaire exprimant dCas9VPR à l'état stable.

Enfin, dans ce premier travail, nous avons ciblé trois gènes « Cardiogéniques » avec l'idée de créer un signal puissant permettant d'orienter directement des cellules pluripotentes vers la voie cardiomyocytaire. Nos résultats montrent que ceci est probable mais difficile à obtenir car la différenciation est le fruit d'un processus multifactoriel. Ainsi, les résultats les plus spectaculaires sont obtenus en combinant une approche moléculaire dCas9VPR et pharmacologique. Dans ce protocole, il semble que les cellules iPSC ayant reçu le signal moléculaire sont pré-sensibilisées pour former des cardiomyocytes. Le changement de milieu de culture et la stimulation ciblée de la voie Wnt, dont nous avons montré le rôle capital, permet de révéler cette capacité accrue à s'engager dans la différenciation cardiomyocytaire. Ceci représente une première grande avancée car le pourcentage de

CONFIDENTIEL

cellules exprimant la troponine cardiaque est particulièrement élevé à ce temps très précoce. Il reste à déterminer les effets à plus long terme de notre approche.

CONFIDENTIEL

Bibliographie

Adhikary, Sovana, and Martin Eilers. 2005. "Transcriptional Regulation and Transformation by Myc Proteins." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 6 (8): 635–45. doi:10.1038/nrm1703.

Anders, Carolin, Ole Niewoehner, Alessia Duerst, and Martin Jinek. 2014. "Structural Basis of PAM-Dependent Target DNA Recognition by the Cas9 Endonuclease." *Nature* 513 (7519). Nature Publishing Group: 569–73. doi:10.1038/nature13579.

Antzelevitch, Charles. 2007. "Genetic Basis of Brugada Syndrome." *Heart Rhythm : The Official Journal of the Heart Rhythm Society* 4 (6): 756–57. doi:10.1016/j.hrthm.2007.03.015.

Arbustini, Eloisa, Navneet Narula, G. William Dec, K. Srinath Reddy, Barry Greenberg, Sudhir Kushwaha, Thomas Marwick, et al. 2013. "The MOGE(S) Classification for a Phenotype-Genotype Nomenclature of Cardiomyopathy: Endorsed by the World Heart Federation." *Global Heart* 8 (4): 355–82. doi:10.1016/j.gheart.2013.11.001.

Arbustini, Eloisa, Navneet Narula, Luigi Tavazzi, Alessandra Serio, Maurizia Grasso, Valentina Favalli, Riccardo Bellazzi, et al. 2014. "The MOGE(S) Classification of Cardiomyopathy for Clinicians." *Journal of the American College of Cardiology* 64 (3): 304–18. doi:10.1016/j.jacc.2014.05.027.

Bardy, GH, KL Lee, DB Mark, JE Poole, DL Packer, R Boineau, M Domanski, et al. 2005. "Amiodarone or an Implantable Cardioverter–Defibrillator for Congestive Heart Failure Gust." *The New England Journal of Medicine* 352 (3): 225–38.

Bayart, Emilie, and Odile Cohen-Haguenauer. 2013. "Technological Overview of iPS Induction from Human Adult Somatic Cells." *Current Gene Therapy* 13: 73–92. doi:10.2174/1566523211313020002.

Bedada, Fikru B., Sunny S K Chan, Stefania K. Metzger, Liying Zhang, Jianyi Zhang, Daniel J. Garry, Timothy J. Kamp, Michael Kyba, and Joseph M. Metzger. 2014. "Acquisition of a Quantitative, Stoichiometrically Conserved Ratiometric Marker of Maturation Status in Stem Cell-Derived Cardiac Myocytes." *Stem Cell Reports* 3 (4): 594–605. doi:10.1016/j.stemcr.2014.07.012.

Beerli, R R, D J Segal, B Dreier, and C F Barbas. 1998. "Toward Controlling Gene Expression at Will: Specific Regulation of the erbB-2/HER-2 Promoter by Using Polydactyl Zinc Finger Proteins Constructed from Modular Building Blocks." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (25): 14628–33. doi:10.1073/pnas.95.25.14628.

Belardinelli, Romualdo, Andi Muçaj, Francesca Lacalaprice, Maridia Solenghi, Giovanna Seddaiu, Federica Principi, Luca Tiano, and Gian Paolo Littarru. 2006. "Coenzyme Q10 and Exercise Training in Chronic Heart Failure." *European Heart Journal* 27 (22): 2675–81. doi:10.1093/eurheartj/ehl158.

Biesiadecki, Brandon J., Tomoyoshi Kobayashi, John S. Walker, R. John Solaro, and Pieter P. De Tombe. 2007. "The Troponin C G159D Mutation Blunts Myofilament Desensitization Induced by Troponin I Ser23/24 Phosphorylation." *Circulation Research* 100 (10): 1486–93. doi:10.1161/01.RES.0000267744.92677.7f.

Bleumink, Gysèle S., Anneke M. Knetsch, Miriam C J M Sturkenboom, Sabine M J M Straus, Albert Hofman, Jaap W. Deckers, Jacqueline C M Witteman, and Bruno H Ch Stricker. 2004. "Quantifying the Heart Failure Epidemic: Prevalence, Incidence Rate, Lifetime Risk and Prognosis of Heart Failure - The Rotterdam Study." *European Heart Journal* 25 (18):

CONFIDENTIEL

1614–19. doi:10.1016/j.ehj.2004.06.038.
Bookwalter, Carol S., and Kathleen M. Trybus. 2006. "Functional Consequences of a Mutation in an Expressed Human α-Cardiac Actin at a Site Implicated in Familial Hypertrophic Cardiomyopathy." *Journal of Biological Chemistry* 281 (24): 16777–84. doi:10.1074/jbc.M512935200.
Boyer, Laurie a L.a., T.I. Tong Ihn Lee, M.F. Megan F Cole, S.E. Sarah E Johnstone, S Stuart, Jacob P J.P. Zucker, M.G. Matthew G Guenther, et al. 2005. "Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells." *Cell* 122 (6): 947–56. doi:10.1016/j.cell.2005.08.020.Core.
Briggs, R, and T J King. 1952. "Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 38 (5): 455–63. doi:10.1073/pnas.38.5.455.
Brons, I. Gabrielle M., Lucy E. Smithers, Matthew W. B. Trotter, Peter Rugg-Gunn, Bowen Sun, Susana M. Chuva de Sousa Lopes, Sarah K. Howlett, et al. 2007. "Derivation of Pluripotent Epiblast Stem Cells from Mammalian Embryos." *Nature* 448 (7150): 191–95. doi:10.1038/nature05950.
Brugada, Josep. 1992. "Le Syndrome de Brugada," 1–8.
Buenrostro, Jason D., Paul G Giresi, Lisa C Zaba, Howard Chang, and William J. Greenleaf. 2013. "Transposition of Native Chromatin for Multimodal Regulatory Analysis and Personal Epigenomics." *Nature Methods* 10 (12): 1213–18. doi:10.1016/j.pestbp.2011.02.012.Investigations.
Burridge, Paul W., Gordon Keller, Joseph D. Gold, and Joseph C. Wu. 2012. "Production of de Novo Cardiomyocytes: Human Pluripotent Stem Cell Differentiation and Direct Reprogramming." *Cell Stem Cell* 10 (1). Elsevier Inc.: 16–28. doi:10.1016/j.stem.2011.12.013.
Burridge, Paul W., Susan Thompson, Michal A. Millrod, Seth Weinberg, Xuan Yuan, Ann Peters, Vasiliki Mahairaki, Vassilis E. Koliatsos, Leslie Tung, and Elias T. Zambidis. 2011. "A Universal System for Highly Efficient Cardiac Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells That Eliminates Interline Variability." *PLoS ONE* 6 (4). doi:10.1371/journal.pone.0018293.
Burridge, Paul W, David Anderson, Helen Priddle, Maria D Barbadillo Muñoz, Sarah Chamberlain, Cinzia Allegrucci, Lorraine E Young, and Chris Denning. 2007. "Improved Human Embryonic Stem Cell Embryoid Body Homogeneity and Cardiomyocyte Differentiation from a Novel V-96 Plate Aggregation System Highlights Interline Variability." *Stem Cells* 25 (4): 929–38. doi:10.1634/stemcells.2006-0598.
Burridge, Paul W, Elena Matsa, Praveen Shukla, Ziliang C Lin, Jared M Churko, Antje D Ebert, Feng Lan, et al. 2014. "Chemically Defined Generation of Human Cardiomyocytes." *Nature Methods* 11 (8): 855–60. doi:10.1038/nmeth.2999.
Carrier, L, K R Boheler, C Chassagne, D de la Bastie, C Wisnewsky, E G Lakatta, and K Schwartz. 1992. "Expression of the Sarcomeric Actin Isogenes in the Rat Heart with Development and Senescence." *Circulation Research* 70 (5): 999–1005. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1568307.
Carvajal-vergara, Xonia, Ana Sevilla, Sunita L D Souza, Yen-sin Ang, Christoph Schaniel, Dung-fang Lee, Lei Yang, et al. 2010. "Patient-Specific Induced Pluripotent Stem-Cell-Derived Models of LEOPARD Syndrome." *Nature* 465 (7299). Nature Publishing Group: 808–12. doi:10.1038/nature09005.
Caspi, Oren, Irit Huber, Amira Gepstein, Gil Arbel, Leonid Maizels, Monther Boulos, and Lior Gepstein. 2013. "Modeling of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy with Human Induced Pluripotent Stem Cells." *Circulation: Cardiovascular Genetics* 6 (6): 557–68. doi:10.1161/CIRCGENETICS.113.000188.
CONFIDENTIEL

Chang, Audrey N., Keita Harada, Michael J. Ackerman, and James D. Potter. 2005. "Functional Consequences of Hypertrophic and Dilated Cardiomyopathy-Causing Mutations in ??-Tropomyosin." *Journal of Biological Chemistry* 280 (40): 34343–49. doi:10.1074/jbc.M505014200.

Chavez, Alejandro, Jonathan Scheiman, Suhani Vora, Benjamin W Pruitt, Marcelle Tuttle, Eswar P R Iyer, Shuailiang Lin, et al. 2015. "Highly Efficient Cas9-Mediated Transcriptional Programming." *Nature Methods* 12 (4): 326–28. doi:10.1038/nmeth.3312.

Chen, Q, G E Kirsch, D Zhang, R Brugada, J Brugada, P Brugada, D Potenza, et al. 1998. "Genetic Basis and Molecular Mechanism for Idiopathic Ventricular Fibrillation." *Nature* 392 (6673): 293–96. doi:10.1038/32675.

Cho, Hyun-jai, Choon-soo Lee, Yoo-wook Kwon, Jae Seung Paek, Sun-hee Lee, Jin Hur, Eun Ju, et al. 2010. "Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Somatic Cells by Protein-Based Reprogramming without Genetic Manipulation." *Blood* 116 (3): 386–95. doi:10.1182/blood-2010-02-269589.

Chou, Bin-Kuan, Prashant Mali, Xiaosong Huang, Zhaohui Ye, Sarah N. Dowey, Linda MS Resar, Chunlin Zou, Y. Alex Zhang, Jay Tong, and Linzhao Cheng. 2011. "Efficient Human iPS Cell Derivation by a Non-Integrating Plasmid from Blood Cells with Unique Epigenetic and Gene Expression Signatures." *Cell Research* 21 (3). Nature Publishing Group: 518–29. doi:10.1038/cr.2011.12.

Coviello, Domenico A., Barry J. Maron, Paolo Spirito, Hugh Watkins, Hans Peter Vosberg, Ludwig Thierfelder, Frederick J. Schoen, J. G. Seidman, and Christine E. Seidman. 1997. "Clinical Features of Hypertrophic Cardiomyopathy Caused by Mutation of a 'Hot Spot' in the Alpha-Tropomyosin Gene." *Journal of the American College of Cardiology* 29 (3): 635–40. doi:10.1016/S0735-1097(96)00538-4.

Davis, Robert L., Harold Weintraub, and Andrew B. Lassar. 1987. "Expression of a Single Transfected cDNA Converts Fibroblasts to Myoblasts." *Cell* 51 (6): 987–1000. doi:10.1016/0092-8674(87)90585-X.

Debold, Edward P, J P Schmitt, J B Patlak, S E Beck, J R Moore, J G Seidman, C Seidman, and D M Warshaw. 2007. "Hypertrophic and Dilated Cardiomyopathy Mutations Differentially Affect the Molecular Force Generation of Mouse Alpha-Cardiac Myosin in the Laser Trap Assay." *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 293 (1): H284–91. doi:10.1152/ajpheart.00128.2007.

Delahaye F, de Gevigney G. 2001. "Epidemiologie de L'insuffisance Cardiaque," 6–11.

Du, Cheng Kun, Sachio Morimoto, Kiyomasa Nishii, Reiko Minakami, Mika Ohta, Naoto Tadano, Qun Wei Lu, et al. 2007. "Knock-in Mouse Model of Dilated Cardiomyopathy Caused by Troponin Mutation." *Circulation Research* 101 (2): 185–94. doi:10.1161/CIRCRESAHA.106.146670.

Dubois, Nicole C, April M Craft, Parveen Sharma, David a Elliott, Edouard G Stanley, Andrew G Elefanty, Anthony Gramolini, and Gordon Keller. 2011. "SIRPA Is a Specific Cell-Surface Marker for Isolating Cardiomyocytes Derived from Human Pluripotent Stem Cells." *Nature Biotechnology* 29 (11): 1011–18. doi:10.1038/nbt.2005.

Eder, Alexandra, Ingra Vollert, Arne Hansen, and Thomas Eschenhagen. 2016. "Human Engineered Heart Tissue as a Model System for Drug Testing." *Advanced Drug Delivery Reviews* 96. Elsevier B.V.: 214–24. doi:10.1016/j.addr.2015.05.010.

Eggan, K, H Akutsu, J Loring, L Jackson-Grusby, M Klemm, W M Rideout, R Yanagimachi, and R Jaenisch. 2001. "Hybrid Vigor, Fetal Overgrowth, and Viability of Mice Derived by Nuclear Cloning and Tetraploid Embryo Complementation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (11): 6209–14. doi:10.1073/pnas.101118898.

Elliott, David A, Stefan R Braam, Katerina Koutsis, Elizabeth S Ng, Robert Jenny, Ebba L

CONFIDENTIEL

Lagerqvist, Christine Biben, et al. 2011. "NKX2-5(eGFP/w) hESCs for Isolation of Human Cardiac Progenitors and Cardiomyocytes." *Nature Methods* 8 (12): 1037–40. doi:10.1038/nmeth.1740.

Epstein, N D, G M Cohn, F Cyran, and L Fananapazir. 1992. "Differences in Clinical Expression of Hypertrophic Cardiomyopathy Associated with Two Distinct Mutations in the Beta-Myosin Heavy Chain Gene. A 908Leu----Val Mutation and a 403Arg----Gln Mutation." *Circulation* 86 (2): 345–52. doi:10.1161/01.CIR.86.2.345.

Evans, M J, and M H Kaufman. 1981. "Establishment in Culture of Pluripotential Cells from Mouse Embryos." *Nature*. doi:10.1038/292154a0.

Finley, Natosha, M Bret Abbott, Ekram Abusamhadneh, Vadim Gaponenko, Wen-ji Dong, G Gasmi-seabrook, Jack W Howarth, et al. 1999. "NMR Analysis of Cardiac Troponin C-Troponin I Complexes : E ¡ Ects of Phosphorylation" 453: 107–12.

Fu, Ji Dong, Nicole R. Stone, Lei Liu, C. Ian Spencer, Li Qian, Yohei Hayashi, Paul Delgado-Olguin, Sheng Ding, Benoit G. Bruneau, and Deepak Srivastava. 2013. "Direct Reprogramming of Human Fibroblasts toward a Cardiomyocyte-like State." *Stem Cell Reports* 1 (3). The Authors: 235–47. doi:10.1016/j.stemcr.2013.07.005.

Fusaki, Noemi, Hiroshi Ban, Akiyo Nishiyama, Koichi Saeki, and Mamoru Hasegawa. 2009. "Efficient Induction of Transgene-Free Human Pluripotent Stem Cells Using a Vector Based on Sendai Virus, an RNA Virus That Does Not Integrate into the Host Genome." *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences* 85 (8): 348–62. doi:10.2183/pjab.85.348.

Gabet, Amélie, Yves Juillière, Agathe Lamarche-vadel, Michel Vernay, and Valérie Olié. 2015. "National Trends in Rate of Patients Hospitalized for Heart Failure and Heart Failure Mortality in France , 2000 – 20 1 2." *European Journal of Heart Failure* 17: 583–90.

Gao, Wei Dong, Nestor Gustavo Pérez, Christine E Seidman, Jonathan G Seidman, and Eduardo Marbán. 1999. "Altered Cardiac Excitation – Contraction Coupling in Mutant Mice with Familial Hypertrophic Cardiomyopathy." *Journal of Clinical Investigation* 103 (5): 661–66. doi:10.1172/JCI5220.Figure.

Gonzalez, Rodolfo, Jae Wook Lee, and Peter G. Schultz. 2011. "Stepwise Chemically Induced Cardiomyocyte Specification of Human Embryonic Stem Cells." *Angewandte Chemie - International Edition* 50 (47): 11181–85. doi:10.1002/anie.201103909.

Gurdon, J B. 1962. "The Developmental Capacity of Nuclei Taken from Intestinal Epithelium Cells of Feeding Tadpoles." *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 10 (4): 622–40. doi:10.1002/stem.684.

Gussak, Ihor, Pedro Brugada, Josep Brugada, R. Scott Wright, Stephen L. Kopecky, Bernard R. Chaitman, and Preben Bjerregaard. 2000. "Idiopathic Short QT Interval:A New Clinical Syndrome?" *Cardiology* 94 (2): 99–102. doi:10.1159/000047299.

Hammoudi, Nadjib, Kiyotake Ishikawa, and Roger J Hajjar. 2015. "Adeno-Associated Virus-Mediated Gene Therapy in Cardiovascular Disease." *Current Opinion in Cardiology* 30 (3): 228–34. doi:10.1097/HCO.0000000000000159.

Harada, Keita, and James D Potter. 2004. "Familial Hypertrophic Cardiomyopathy Mutations from Different Functional Regions of Troponin T Result in Different Effects on the pH and Ca2+ Sensitivity of Cardiac Muscle Contraction." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (15): 14488–95. doi:10.1074/jbc.M309355200.

Harris, Samantha P., Christopher R. Bartley, Timothy A. Hacker, Kerry S. McDonald, Pamela S. Douglas, Marion L. Greaser, Patricia A. Powers, and Richard L. Moss. 2002. "Hypertrophic Cardiomyopathy in Cardiac Myosin Binding Protein-C Knockout Mice." *Circulation Research* 90 (5): 594–601. doi:10.1161/01.RES.0000012222.70819.64.

Heller, Mark J., Mahta Nili, Earl Homsher, and Larry S. Tobacman. 2003. "Cardiomyopathic Tropomyosin Mutations That Increase Thin Filament Ca 2+ Sensitivity and Tropomyosin

CONFIDENTIEL

N-Domain Flexibility." *Journal of Biological Chemistry* 278 (43): 41742–48. doi:10.1074/jbc.M303408200.

Hick, Aurore, Marie Wattenhofer-donzé, Satyan Chintawar, Philippe Tropel, Jodie P Simard, Nadège Vaucamps, David Gall, et al. 2013. "Neurons and Cardiomyocytes Derived from Induced Pluripotent Stem Cells as a Model for Mitochondrial Defects in Friedreich ' S Ataxia" 621: 608–21. doi:10.1242/dmm.010900.

Hinson, John T, Anant Chopra, Navid Nafissi, William J Polacheck, C Craig, Sandra Swist, Joshua Gorham, et al. 2015. "Titin Mutations in iPS Cells Define Sarcomere Insufficiency as a Cause of Dilated Cardiomyopathy." *Science* 349 (6251): 982–86. doi:10.1126/science.aaa5458.Titin.

Hirt, Marc N., Arne Hansen, and Thomas Eschenhagen. 2014. "Cardiac Tissue Engineering : State of the Art." *Circulation Research* 114 (2): 354–67. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.300522.

Hochedlinger, Konrad, and Rudolf Jaenisch. 2002. "Monoclonal Mice Generated by Nuclear Transfer from Mature B and T Donor Cells." *Nature* 415 (6875): 1035–38. doi:10.1038/nature718.

Hoffman, B, H Schmidt-Traub, A Perrot, KL Osterziel, and R Geßner. 2001. "Mutation and Polymorphism Report." *Human Mutation* 239: 5–8. doi:10.1002/humu.41.

Huang, Hsiang Po, Pin Hsun Chen, Wuh Liang Hwu, Ching Yu Chuang, Yin Hsiu Chien, Lee Stone, Chung Liang Chien, et al. 2011. "Human Pompe Disease-Induced Pluripotent Stem Cells for Pathogenesis Modeling, Drug Testing and Disease Marker Identification." *Human Molecular Genetics* 20 (24): 4851–64. doi:10.1093/hmg/ddr424.

Humpherys, D. 2001. "Epigenetic Instability in ES Cells and Cloned Mice." *Science* 293 (5527): 95–97. doi:10.1126/science.1061402.

Hwang, Hyun Seok, Dmytro O Kryshtal, Tromondae K Feaster, Verónica Sánchez-Freire, Jianhua Zhang, Timothy J Kamp, Charles C Hong, Joseph C Wu, and Björn C Knollmann. 2015. "Comparable Calcium Handling Of Human iPSC-Derived Cardiomyocytes Generated By Multiple Laboratories." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 85. Elsevier B.V.: 79–88. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.05.003.

Ieda, Masaki, Ji Dong Fu, Paul Delgado-Olguin, Vasanth Vedantham, Yohei Hayashi, Benoit G. Bruneau, and Deepak Srivastava. 2010. "Direct Reprogramming of Fibroblasts into Functional Cardiomyocytes by Defined Factors." *Cell* 142 (3). Elsevier Ltd: 375–86. doi:10.1016/j.cell.2010.07.002.

Inoue, Kimiko, Hiroshi Wakao, Narumi Ogonuki, Hiromi Miki, Ken Ichiro Seino, Rika Nambu-Wakao, Shinichi Noda, et al. 2005. "Generation of Cloned Mice by Direct Nuclear Transfer from Natural Killer T Cells." *Current Biology* 15 (12): 1114–18. doi:10.1016/j.cub.2005.05.021.

Investigators, THE HEART OUTCOMES P REVENTION EVALUATION STUDY. 2000. "EFFECTS OF AN ANGIOTENSIN-CONVERTING–ENZYME INHIBITOR, RAMIPRIL, ON CARDIOVASCULAR EVENTS IN HIGH-RISK PATIENTS." *The New England Journal of Medicine* 342: 145–53.

Itzhaki, Ilanit, Leonid Maizels, Irit Huber, Amira Gepstein, Gil Arbel, Oren Caspi, Liron Miller, et al. 2012. "Modeling of Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia with Patient-Specific Human-Induced Pluripotent Stem Cells." *Journal of the American College of Cardiology* 60 (11). Elsevier Inc.: 990–1000. doi:10.1016/j.jacc.2012.02.066.

James, J, Y Zhang, H Osinska, A Sanbe, R Klevitsky, T E Hewett, and J Robbins. 2000. "Transgenic Modeling of a Cardiac Troponin I Mutation Linked to Familial Hypertrophic Cardiomyopathy." *Circulation Research* 87 (9): 805–11. doi:10.1161/01.RES.87.9.805.

James, Jeanne, Yan Zhang, Kathy Wright, Sra Witt, Elizabeth Glascock, Hanna Osinska, Raisa Klevitsky, et al. 2002. "Transgenic Rabbits Expressing Mutant Essential Light Chain Do

CONFIDENTIEL

Not Develop Hypertrophic Cardiomyopathy." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 34 (7): 873–82. doi:10.1006/jmcc.2002.2025.

Jia, Fangjun, Kitchener D Wilson, Ning Sun, Deepak M Gupta, Mei Huang, Robert C Robbins, Mark a Kay, Michael T Longaker, and Joseph C Wu. 2010. "A Nonviral Minicircle Vector for Deriving Human iPS Cells." *Nat Methods* 7 (3): 197–99. doi:10.1038/nmeth.1426.A.

Jinek, Martin, Krzysztof Chylinski, Ines Fonfara, Michael Hauer, Jennifer A Doudna, and Emmanuelle Charpentier. 2012. "A Programmable Dual-RNA – Guided" 337 (August): 816–22. doi:10.1126/science.1225829.

Joanne, Pierre, Maria Kitsara, Solène Emmanuelle Boitard, Hany Naemetalla, Valérie Vanneaux, Mathieu Pernot, Jérôme Larghero, et al. 2016. "Nanofibrous Clinical-Grade Collagen Scaffolds Seeded with Human Cardiomyocytes Induces Cardiac Remodeling in Dilated Cardiomyopathy." *Biomaterials* 80: 157–68. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.11.035.

Kahan, Brenda W., and Boris Ephrussi. 1970. "Developmental Potentialities of Clonal in Vitro Cultures of Mouse Testicular Teratoma." *Journal of the National Cancer Institute* 44 (5): 1015–36. doi:10.1093/jnci/44.5.1015.

Kaji, Keisuke, Katherine Norrby, Agnieszka Paca, Maria Mileikovsky, Paria Mohseni, and Knut Woltjen. 2009. "Virus-Free Induction of Pluripotency and Subsequent Excision of Reprogramming Factors." *Nature* 458 (7239). Nature Publishing Group: 771–75. doi:10.1038/nature07864.

Kamisago, M, S D Sharma, S R DePalma, S Solomon, P Sharma, B McDonough, L Smoot, et al. 2000. "Mutations in Sarcomere Protein Genes as a Cause of Dilated Cardiomyopathy." *New England Journal of Medicine* 343 (23): 1688–96. doi:10.1056/NEJM200012073432304.

Kane, Nicole M, Ali Nowrouzi, Sayandip Mukherjee, Michael P Blundell, Jenny a Greig, Wai Kwong Lee, Miles D Houslay, et al. 2010. "Lentivirus-Mediated Reprogramming of Somatic Cells in the Absence of Transgenic Transcription Factors." *Molecular Therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy* 18 (12). Nature Publishing Group: 2139–45. doi:10.1038/mt.2010.231.

Kapplinger, Jamie D., Andrew P. Landstrom, Benjamin A. Salisbury, Thomas E. Callis, Guido D. Pollevick, David J. Tester, Moniek G P J Cox, et al. 2011. "Distinguishing Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy/dysplasia- Associated Mutations from Background Genetic Noise." *Journal of the American College of Cardiology* 57 (23). Elsevier Inc.: 2317–27. doi:10.1016/j.jacc.2010.12.036.

Karakikes, I, G D Senyei, J Hansen, C W Kong, E U Azeloglu, F Stillitano, D K Lieu, et al. 2014. "Small Molecule-Mediated Directed Differentiation of Human Embryonic Stem Cells toward Ventricular Cardiomyocytes." *Stem Cells Transl.Med.* 3 (2157–6564 (Print)): 18–31. doi:10.5966/sctm.2013-0110.

Karakikes, I, F Stillitano, M Nonnenmacher, C Tzimas, D Sanoudou, V Termglinchan, C W Kong, et al. 2015. "Correction of Human Phospholamban R14del Mutation Associated with Cardiomyopathy Using Targeted Nucleases and Combination Therapy." *Nat Commun* 6: 6955. doi:10.1038/ncomms7955.

Kehat, Izhak, Leonid Khimovich, Oren Caspi, Amira Gepstein, Rona Shofti, Gil Arbel, Irit Huber, Jonathan Satin, Joseph Itskovitz-Eldor, and Lior Gepstein. 2004. "Electromechanical Integration of Cardiomyocytes Derived from Human Embryonic Stem Cells." *Nature Biotechnology* 22 (10): 1282–89. doi:10.1038/nbt1014.

Ko, Kinarm, Natalia Tapia, Guangming Wu, Jeong Beom Kim, Marcos J Araúzo Bravo, Philipp Sasse, Tamara Glaser, et al. 2009. "Induction of Pluripotency in Adult Unipotent Germline Stem Cells." *Cell Stem Cell* 5 (1): 87–96. doi:10.1016/j.stem.2009.05.025.

Krum, Henry, and William T. Abraham. 2009. "Heart Failure." *The Lancet* 373 (9667). Elsevier

CONFIDENTIEL

Ltd: 941–55. doi:10.1016/S0140-6736(09)60236-1.

Laflamme, Michael a, Kent Y Chen, Anna V Naumova, Veronica Muskheli, James a Fugate, Sarah K Dupras, Hans Reinecke, et al. 2007. "Cardiomyocytes Derived from Human Embryonic Stem Cells in pro-Survival Factors Enhance Function of Infarcted Rat Hearts." *Nature Biotechnology* 25 (9): 1015–24. doi:10.1038/nbt1327.

Lahti, Anna L, Ville J Kujala, Hugh Chapman, Ari-pekka Koivisto, Mari Pekkanen-mattila, Erja Kerkelä, Jari Hyttinen, et al. 2012. "Model for Long QT Syndrome Type 2 Using Human iPS Cells Demonstrates Arrhythmogenic Characteristics in Cell Culture" 230: 220–30. doi:10.1242/dmm.008409.

Lan, Feng, Andrew S. Lee, Ping Liang, Veronica Sanchez-Freire, Patricia K. Nguyen, Li Wang, Leng Han, et al. 2013. "Abnormal Calcium Handling Properties Underlie Familial Hypertrophic Cardiomyopathy Pathology in Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells." *Cell Stem Cell* 12 (1). Elsevier Inc.: 101–13. doi:10.1016/j.stem.2012.10.010.

Lian, Xiaojun, Jianhua Zhang, Samira M Azarin, Kexian Zhu, Laurie B Hazeltine, Xiaoping Bao, Cheston Hsiao, Timothy J Kamp, and Sean P Palecek. 2013. "Directed Cardiomyocyte Differentiation from Human Pluripotent Stem Cells by Modulating Wnt/β-Catenin Signaling under Fully Defined Conditions." *Nature Protocols* 8 (1): 162–75. doi:10.1038/nprot.2012.150.

Lu, Qun Wei, Sachio Morimoto, Keita Harada, Cheng Kun Du, Fumi Takahashi-Yanaga, Yoshikazu Miwa, Toshiyuki Sasaguri, and Iwao Ohtsuki. 2003. "Cardiac Troponin T Mutation R141W Found in Dilated Cardiomyopathy Stabilizes the Troponin T-Tropomyosin Interaction and Causes a Ca2+ Desensitization." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 35 (12): 1421–27. doi:10.1016/j.yjmcc.2003.09.003.

Lu Han, Yang Li, Jason Tchao, Aaron D. Kaplan, Bo Lin, You Li, Jocelyn Mich-Basso, Agnieszka Lis, Narmeen Hassan, Barry London, Glenna C.L. Bett, Kimimasa Tobita, Randall L. Rasmusson, Lei Yang. 2014. "Study Familial Hypertrophic Cardiomyopathy Using Patient Specific Induced Pluripotent Stem Cells." *Cardiovascular Research Advance*.

Lundy, Scott D, Wei-Zhong Zhu, Michael Regnier, and Michael A Laflamme. 2013. "Structural and Functional Maturation of Cardiomyocytes Derived from Human Pluripotent Stem Cells." *Stem Cells and Development* 22 (14): 1991–2002. doi:10.1089/scd.2012.0490.

Lupoglazoff, Auteurs Jean-marie, and Isabelle Denjoy. 2007. "Syndrome Du QT Court Familial," 1–6.

Ma, Dongrui, Heming Wei, Jun Lu, Shuswen Ho, Guangqing Zhang, Xiaoming Sun, Yingzi Oh, et al. 2013. "Generation of Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes as a Cellular Model of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy." *European Heart Journal* 34 (15): 1122–33. doi:10.1093/eurheartj/ehs226.

Ma, Dongrui, Heming Wei, Yongxing Zhao, Jun Lu, Guang Li, Norliza Binte Esmail Sahib, Teng Hong Tan, et al. 2013. "Modeling Type 3 Long QT Syndrome with Cardiomyocytes Derived from Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells." *International Journal of Cardiology* 168 (6). Elsevier Ireland Ltd: 5277–86. doi:10.1016/j.ijcard.2013.08.015.

Mali, Prashant, John Aach, P Benjamin Stranges, Kevin M Esvelt, Mark Moosburner, Sriram Kosuri, Luhan Yang, and George M Church. 2013. "CAS9 Transcriptional Activators for Target Specificity Screening and Paired Nickases for Cooperative Genome Engineering." *Nature Biotechnology* 31 (9): 833–38. doi:10.1038/nbt.2675.

Marian, A J, Y Wu, D S Lim, M McCluggage, K Youker, Qt Yu, R Brugada, F DeMayo, M Quinones, and R Roberts. 1999. "A Transgenic Rabbit Model for Human Hypertrophic Cardiomyopathy." *Journal of Clinical Investigation* 104 (0021–9738 SB–A SB–M SB–X): 1683–92.

CONFIDENTIEL

Maron, Barry J., Jeffrey A. Towbin, Gaetano Thiene, Charles Antzelevitch, Domenico Corrado, Donna Arnett, Arthur J. Moss, Christine E. Seidman, and James B. Young. 2006. "Contemporary Definitions and Classification of the Cardiomyopathies: An American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functio." *Circulation* 113 (14): 1807–16. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.174287.

Mates, L, M K Chuah, E Belay, B Jerchow, N Manoj, A Acosta-Sanchez, D P Grzela, et al. 2009. "Molecular Evolution of a Novel Hyperactive Sleeping Beauty Transposase Enables Robust Stable Gene Transfer in Vertebrates." *Nature Genetics* 41 (6): 753–61. doi:10.1038/ng.343.

Mazzotta, Silvia, Carlos Neves, Rory J. Bonner, Andreia S. Bernardo, Kevin Docherty, and Stefan Hoppler. 2016. "Distinctive Roles of Canonical and Noncanonical Wnt Signaling in Human Embryonic Cardiomyocyte Development." *Stem Cell Reports* 7 (4). The Authors: 764–76. doi:10.1016/j.stemcr.2016.08.008.

Mcmurray, John J V, Stamatis Adamopoulos, Stefan D. Anker, Angelo Auricchio, Michael Böhm, Kenneth Dickstein, Volkmar Falk, et al. 2012. "ESC Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2012." *European Journal of Heart Failure* 14 (8): 803–69. doi:10.1093/eurjhf/hfs105.

McMurray, John J V, and Marc A. Pfeffer. 2005. "Heart Failure." *Lancet* 365 (9474): 1877–89. doi:10.1016/S0140-6736(05)66621-4.

Menasché, P., and V. Vanneaux. 2016. "Stem Cells for the Treatment of Heart Failure." *Current Research in Translational Medicine* 64 (2): 97–106. doi:10.1016/j.retram.2016.04.003.

Menon, Siddharth, Siny Shailendra, Andrea Renda, Michael Longaker, and Natalina Quarto. 2016. "An Overview of Direct Somatic Reprogramming: The Ins and Outs of iPSCs." *International Journal of Molecular Sciences* 17 (1): 1–20. doi:10.3390/ijms17010141.

Miller, Richard A, and Frank H Ruddle. 1976. "Pluripotent Hybrids Somatic Cell Phosphate Isomerase." *Cell* 9 (September): 45–55.

Miller, Todd, Danuta Szczesna, Philippe R. Housmans, Jiaju Zhao, Fatima De Freitas, Aldrin V. Gomes, Lieneke Culbreath, et al. 2001. "Abnormal Contractile Function in Transgenic Mice Expressing a Familial Hypertrophic Cardiomyopathy-Linked Troponin T (I79N) Mutation." *Journal of Biological Chemistry* 276 (6): 3743–55. doi:10.1074/jbc.M006746200.

Mirza, Mahmooda, Steven Marston, Ruth Willott, Christopher Ashley, Jens Mogensen, William McKenna, Paul Robinson, Charles Redwood, and Hugh Watkins. 2005. "Dilated Cardiomyopathy Mutations in Three Thin Filament Regulatory Proteins Result in a Common Functional Phenotype." *Journal of Biological Chemistry* 280 (31): 28498–506. doi:10.1074/jbc.M412281200.

Mizusawa, Y., M. Horie, and A.A. Wilde. 2014. "Genetic and Clinical Advances in Congenital Long QT Syndrome." *Circulation Journal : Official Journal of the Japanese Circulation Society* 78 (12): 2827–33. doi:10.1253/circj.CJ-14-0905.

Mogensen, Jens, Ross T. Murphy, Tony Shaw, Ajay Bahl, Charles Redwood, Hugh Watkins, Margaret Burke, Perry M. Elliott, and William J. McKenna. 2004. "Severe Disease Expression of Cardiac Troponin C and T Mutations in Patients with Idiopathic Dilated Cardiomyopathy." *Journal of the American College of Cardiology* 44 (10): 2033–40. doi:10.1016/j.jacc.2004.08.027.

Moss, A J, W Zareba, W J Hall, P J Schwartz, R S Crampton, J Benhorin, G M Vincent, et al. 2000. "Effectiveness and Limitations of Beta-Blocker Therapy in Congenital Long-QT Syndrome." *Circulation* 101 (6): 616–23. doi:10.1161/01.CIR.101.6.616.

Moss, AJ, W Zareba, WJ Hall, H Klein, DJ Wilber, D Cannom, and M Brown. 2002. "Prophylactic Implantation of a Defibrillator in Patients With Myocardial Infarction and

CONFIDENTIEL

Reduced Ejection Fraction." *N Engl J Med* 346 (12): 877–83. doi:10.1056/NEJMoa013474.

Mummery, C. 2003. "Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Cardiomyocytes: Role of Coculture With Visceral Endoderm-Like Cells." *Circulation* 107 (>21): 2733–40. doi:10.1161/01.CIR.0000068356.38592.68.

Munsie, Megan J., Anna E. Michalska, Carmel M. O'Brien, Alan O. Trounson, Martin F. Pera, and Peter S. Mountford. 2000. "Isolation of Pluripotent Embryonic Stem Cells from Reprogrammed Adult Mouse Somatic Cell Nuclei." *Current Biology* 10 (16): 989–92. doi:10.1016/S0960-9822(00)00648-5.

Murphy, Ross T., Jens Mogensen, Anthony Shaw, Toru Kubo, Sian Hughes, and William J. McKenna. 2004. "Novel Mutation in Cardiac Troponin I in Recessive Idiopathic Dilated Cardiomyopathy." *Lancet* 363 (9406): 371–72. doi:10.1016/S0140-6736(04)15468-8.

Nagy, A, E Gócza, M E Diaz, V Prideaux, E Iványi, M Markkula, and J Rossant. 1990. "Embryonic Stem Cells Alone Are Able to Support Fetal Development in the Mouse." *Development* 110: 815–21.

Nam, Young-Jae, Kunhua Song, Xiang Luo, Edward Daniel, Kaleb Lambeth, Katherine West, Joseph A Hill, et al. 2013. "Reprogramming of Human Fibroblasts toward a Cardiac Fate." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (14): 5588–93. doi:10.1073/pnas.1301019110.

Ng, Elizabeth S, Richard Davis, Edouard G Stanley, and Andrew G Elefanty. 2008. "A Protocol Describing the Use of a Recombinant Protein-Based, Animal Product-Free Medium (APEL) for Human Embryonic Stem Cell Differentiation as Spin Embryoid Bodies." *Nature Protocols* 3 (5): 768–76. doi:10.1038/nprot.2008.42.

Niimura, Hideshi, Kristen K Patton, William J Mckenna, Johann Soults, Barry J, J G Seidman, Christine E Seidman, and Barry J Maron. 2002. "Sarcomere Protein Gene Mutations in Hypertrophic." *Methods*, 446–51. doi:10.1161/hc0402.102990.

Nishizawa, Masatoshi, Kazuhisa Chonabayashi, Masaki Nomura, Azusa Tanaka, Masahiro Nakamura, Azusa Inagaki, Misato Nishikawa, et al. 2016. "Epigenetic Variation between Human Induced Pluripotent Stem Cell Lines Is an Indicator of Differentiation Capacity." *Stem Cell* 19 (3). Elsevier Inc.: 1–15. doi:10.1016/j.stem.2016.06.019.

Noseda, Michela, Tessa Peterkin, Filipa C. Simões, Roger Patient, and Michael D. Schneider. 2011. "Cardiopoietic Factors Extracellular Signals for Cardiac Lineage Commitment." *Circulation Research* 108 (1): 129–52. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.223792.

Ohno, Seiko, Dimitar P. Zankov, Wei Guang Ding, Hideki Itoh, Takeru Makiyama, Takahiro Doi, Satoshi Shizuta, et al. 2011. "KCNE5 (KCNE1L) Variants Are Novel Modulators of Brugada Syndrome and Idiopathic Ventricular Fibrillation." *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 4 (3): 352–61. doi:10.1161/CIRCEP.110.959619.

Okita, Keisuke, Yasuko Matsumura, Yoshiko Sato, Aki Okada, Asuka Morizane, Satoshi Okamoto, Hyenjong Hong, et al. 2011. "A More Efficient Method to Generate Integration-Free Human iPS Cells." *Nature Methods* 8 (5): 409–12. doi:10.1038/nmeth.1591.

Okita, Keisuke, Tatsuya Yamakawa, Yasuko Matsumura, Yoshiko Sato, Naoki Amano, Akira Watanabe, Naoki Goshima, and Shinya Yamanaka. 2013. "An Efficient Nonviral Method to Generate Integration-Free Human-Induced Pluripotent Stem Cells from Cord Blood and Peripheral Blood Cells." *Stem Cells* 31 (3): 458–66. doi:10.1002/stem.1293.

Olson, T M, V V Michels, S N Thibodeau, Y S Tai, and M T Keating. 1998. "Actin Mutations in Dilated Cardiomyopathy, a Heritable Form of Heart Failure." *Science* 280 (5364): 750–52. doi:10.1126/science.280.5364.750.

Paige, Sharon L., Tomoaki Osugi, Olga K. Afanasiev, Lil Pabon, Hans Reinecke, and Charles E. Murry. 2010. "Endogenous Wnt/??-Catenin Signaling Is Required for Cardiac Differentiation in Human Embryonic Stem Cells." *PLoS ONE* 5 (6).

CONFIDENTIEL

doi:10.1371/journal.pone.0011134.
Paterna, Salvatore, Parrinello Gaspare, Sergio Fasullo, Filippo M. Sarullo, and Pietro Di Pasquale. 2008. "Normal-Sodium Diet Compared with Low-Sodium Diet in Compensated Congestive Heart Failure: Is Sodium an Old Enemy or a New Friend?" *Clinical Science (London, England: 1979)* 114 (3): 221–30. doi:10.1042/CS20070193.
Perez-pinera, Pablo, D Dewran Kocak, Christopher M Vockley, Andrew F Adler, M Kabadi, Lauren R Polstein, Pratiksha I Thakore, et al. 2013. "Transcription Factors." *Nature Methods* 10 (10): 973–76. doi:10.1038/nmeth.2600.RNA-guided.
Plews, Jordan R., JianLiang Li, Mark Jones, Harry D. Moore, Chris Mason, Peter W. Andrews, and Jie Na. 2010. "Activation of Pluripotency Genes in Human Fibroblast Cells by a Novel mRNA Based Approach." *PLoS ONE* 5 (12). doi:10.1371/journal.pone.0014397.
Poetter, K, H Jiang, S Hassanzadeh, S R Master, A Chang, M C Dalakas, I Rayment, J R Sellers, L Fananapazir, and N D Epstein. 1996. "Mutations in Either the Essential or Regulatory Light Chains of Myosin Are Associated with a Rare Myopathy in Human Heart and Skeletal Muscle." *Nature Genetics* 13 (1): 63–69. doi:10.1038/ng0596-63.
Preston, Laura C., Christopher C. Ashley, and Charles S. Redwood. 2007. "DCM Troponin C Mutant Gly159Asp Blunts the Response to Troponin Phosphorylation." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 360 (1): 27–32. doi:10.1016/j.bbrc.2007.05.221.
Priori, Silvia G, Jacques Barhanin, Richard N W Hauer, Wilhelm Haverkamp, Habo J Jongsma, William J Mckenna, Dan M Roden, et al. 1999. "Genetic and Molecular Basis of Cardiac Arrhythmias : Impact on Clinical Management." *European Heart Journal* 20: 174–95.
Qian, Li, Yu Huang, C Ian Spencer, Amy Foley, Vasanth Vedantham, Lei Liu, Simon J Conway, Ji-dong Fu, and Deepak Srivastava. 2012. "In Vivo Reprogramming of Murine Cardiac Fibroblasts into Induced Cardiomyocytes." *Nature* 485 (7400). Nature Publishing Group: 593–98. doi:10.1038/nature11044.
Rapti, Kleopatra, Francesca Stillitano, Ioannis Karakikes, Mathieu Nonnenmacher, Thomas Weber, Jean-Sebastian Hulot, and Roger J Hajjar. 2015. "Effectiveness of Gene Delivery Systems for Pluripotent and Differentiated Cells." *Molecular Therapy — Methods & Clinical Development* 2 (May 2014): 14067. doi:10.1038/mtm.2014.67.
Resnick, James L, Lynn S Bixler, Linzhao Cheng, and Peter J Donovan. 1992. "Long-Term Proliferation of Mouse Primordial Germ Cells in Culture." *Nature* 359 (6395): 550–51. doi:10.1038/359550a0.
Richard, Pascale, Philippe Charron, Lucie Carrier, Céline Ledeuil, Theary Cheav, Claire Pichereau, Abdelaziz Benaiche, et al. 2003. "Hypertrophic Cardiomyopathy: Distribution of Disease Genes, Spectrum of Mutations, and Implications for a Molecular Diagnosis Strategy." *Circulation* 107 (17): 2227–32. doi:10.1161/01.CIR.0000066323.15244.54.
Rincon, Melvin Y., Thierry VandenDriessche, and Marinee K. Chuah. 2015. "Gene Therapy for Cardiovascular Disease: Advances in Vector Development, Targeting, and Delivery for Clinical Translation." *Cardiovascular Research* 108 (1): 4–20. doi:10.1093/cvr/cvv205.
Rowland, Benjamin D, René Bernards, and Daniel S Peeper. 2005. "The KLF4 Tumour Suppressor Is a Transcriptional Repressor of p53 That Acts as a Context-Dependent Oncogene." *Nature Cell Biology* 7 (11): 1074–82. doi:10.1038/ncb1314.
Rust, Elizabeth M., Faris P. Albayya, and Joseph M. Metzger. 1999. "Identification of a Contractile Deficit in Adult Cardiac Myocytes Expressing Hypertrophic Cardiomyopathy-Associated Mutant Troponin T Proteins." *Journal of Clinical Investigation* 103 (10): 1459–67. doi:10.1172/JCI6377.
Sanbe, A, D Nelson, J Gulick, E Setser, H Osinska, X Wang, T E Hewett, et al. 2000. "In Vivo Analysis of an Essential Myosin Light Chain Mutation Linked to Familial Hypertrophic Cardiomyopathy." *Circulation Research* 87 (4): 296–302.
CONFIDENTIEL

http://research.bmn.com/medline/search/record?uid=20407219.

Schmidtmann, Anja, Christopher Lindow, Sylvie Villard, Arnd Heuser, Andreas Mügge, Reinhard Geßner, Claude Granier, and Kornelia Jaquet. 2005. "Cardiac Troponin C-L29Q, Related to Hypertrophic Cardiomyopathy, Hinders the Transduction of the Protein Kinase A Dependent Phosphorylation Signal from Cardiac Troponin I to C." *FEBS Journal* 272 (23): 6087–97. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.05001.x.

Schmitt, Joachim P, Edward P Debold, Ferhaan Ahmad, Amy Armstrong, Andrea Frederico, David A Conner, Ulrike Mende, et al. 2006. "Cardiac Myosin Missense Mutations Cause Dilated Cardiomyopathy in Mouse Models and Depress Molecular Motor Function." *Pnas* 103 (39): 14525–30. doi:10.1073/pnas.0606383103.

Siu, David, Yau-chi Chan, Chung Wah Siu, Yee Ki Lee, Jenny Chung, Yee Ho, Wing Hon Lai, and Yau Chi Chan. 2012. "Modeling of Lamin A / C Mutation Premature Cardiac Aging Using Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells Modeling of Lamin A / C Mutation Premature Cardiac Aging Using Patient - Specific Induced Pluripotent Stem Cells," no. November. doi:10.18632/aging.100503.

Soldner, Frank, Dirk Hockemeyer, Caroline Beard, Qing Gao, George W. Bell, Elizabeth G. Cook, Gunnar Hargus, et al. 2009. "Parkinson's Disease Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells Free of Viral Reprogramming Factors." *Cell* 136 (5). Elsevier Ltd: 964–77. doi:10.1016/j.cell.2009.02.013.

Song, Kunhua, Young-Jae Nam, Xiang Luo, Xiaoxia Qi, Wei Tan, Guo N Huang, Asha Acharya, et al. 2012. "Heart Repair by Reprogramming Non-Myocytes with Cardiac Transcription Factors." *Nature* 485 (7400). Nature Publishing Group: 599–604. doi:10.1038/nature11139.

Stadtfeld, M, Masaki Nagaya, Jochen Utikal, Gordon Weir, and Konrad Hochedlinger. 2008. "Induced Pluripotent Stem Cells Generated without Viral Integration." *Science* 322: 945–49.

Sun, N., M. Yazawa, J. Liu, L. Han, V. Sanchez-Freire, O. J. Abilez, E. G. Navarrete, et al. 2012. "Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells as a Model for Familial Dilated Cardiomyopathy." *Science Translational Medicine* 4 (130): 130ra47-130ra47. doi:10.1126/scitranslmed.3003552.

Sweeney, H L, H S Feng, Z Yang, and H Watkins. 1998. "Functional Analyses of Troponin T Mutations That Cause Hypertrophic Cardiomyopathy: Insights into Disease Pathogenesis and Troponin Function." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (24): 14406–10. doi:10.1073/pnas.95.24.14406.

Szczesna, D, R Zhang, J Zhao, M Jones, G Guzman, and JD Potter. 2000. "Altered Regulation of Cardiac Muscle Contraction by Troponin T Mutations That Cause Familial Hypertrophic Cardiomyopathy." *The Journal of Biological Chemistry* 275 (Issue of January 7): 624–30. doi:10.1016/S1050-1738(01)00115-3.

Tada, Masako, Yousuke Takahama, Kuniya Abe, Norio Nakatsuji, and Takashi Tada. 2001. "Nuclear Reprogramming of Somatic Cells by in Vitro Hybridization with ES Cells." *Current Biology* 11 (19): 1553–58. doi:10.1016/S0960-9822(01)00459-6.

Takahashi, Kazutoshi, and Shinya Yamanaka. 2006. "Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors." *Cell* 126 (4). Elsevier: 663–76. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024.

Tanaka, Atsushi, Shinsuke Yuasa, Giulia Mearini, Toru Egashira, Tomohisa Seki, Masaki Kodaira, Dai Kusumoto, et al. 2014. "Endothelin-1 Induces Myofibrillar Disarray and Contractile Vector Variability in Hypertrophic Cardiomyopathy-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes." *Journal of the American Heart Association* 3 (6). doi:10.1161/JAHA.114.001263.

Tanaka, Kimiko, Yasuo Kitagawa, and Tatsuhiko Kadowaki. 2003. "Misexpression of Mouse

CONFIDENTIEL

Porcupine Isoforms Modulates the Differentiation of P19 Embryonic Carcinoma Cells." *Cell Biology International* 27 (7): 549–57. doi:10.1016/S1065-6995(03)00080-5.

Tardiff, Jil C., Timothy E. Hewett, Bradley M. Palmer, Charlotte Olsson, Stephen M. Factor, Russell L. Moore, Jeffrey Robbins, and Leslie A. Leinwand. 1999. "Cardiac Troponin T Mutations Result in Allele-Specific Phenotypes in a Mouse Model for Hypertrophic Cardiomyopathy." *Journal of Clinical Investigation* 104 (4): 469–81. doi:10.1172/JCI6067.

Thomson, James A, J Itskovitz-Eldor, Sander S Shapiro, Michelle A Waknitz, Jennifer J Swiergiel, Vivienne S Marshall, and Jeffrey M Jones. 1998. "Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts." *Science* 282 (5391): 1145–47. doi:10.1126/science.282.5391.1145.

Tomescot, André, Julia Leschik, Valérie Bellamy, Gilbert Dubois, Emmanuel Messas, Patrick Bruneval, Michel Desnos, et al. 2007. "Differentiation in Vivo of Cardiac Committed Human Embryonic Stem Cells in Postmyocardial Infarcted Rats." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 25 (9): 2200–2205. doi:10.1634/stemcells.2007-0133.

Turnbull, Irene C., Ioannis Karakikes, Gregory W. Serrao, Peter Backeris, Jia Jye Lee, Chaoqin Xie, Grant Senyei, et al. 2014. "Advancing Functional Engineered Cardiac Tissues toward a Preclinical Model of Human Myocardium." *FASEB Journal* 28 (2): 644–54. doi:10.1096/fj.13-228007.

Tyska, M J, E Hayes, M Giewat, C E Seidman, J G Seidman, and D M Warshaw. 2000. "Single-Molecule Mechanics of R403Q Cardiac Myosin Isolated from the Mouse Model of Familial Hypertrophic Cardiomyopathy." *Circulation Research* 86 (7): 737–44. doi:10.1161/01.RES.86.7.737.

Ueno, Shuichi, Gilbert Weidinger, Tomoaki Osugi, Aimee D Kohn, Jonathan L Golob, Lil Pabon, Hans Reinecke, Randall T Moon, and Charles E Murry. 2007. "Biphasic Role for Wnt/beta-Catenin Signaling in Cardiac Specification in Zebrafish and Embryonic Stem Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (23): 9685–90. doi:10.1073/pnas.0702859104.

Van Vliet, Patrick, Sean M. Wu, Stéphane Zaffran, and Michel Pucéat. 2012. "Early Cardiac Development: A View from Stem Cells to Embryos." *Cardiovascular Research* 96 (3): 352–62. doi:10.1093/cvr/cvs270.

Vang, Søren, Thomas J. Corydon, Anders D. Børglum, Melissa D. Scott, Judith Frydman, Jens Mogensen, Niels Gregersen, and Peter Bross. 2005. "Actin Mutations in Hypertrophic and Dilated Cardiomyopathy Cause Inefficient Protein Folding and Perturbed Filament Formation." *FEBS Journal* 272 (8): 2037–49. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.04630.x.

Vierbuchen, T, A Ostermeier, ZP Pang, Y Kokubu, TC Sudhof, and M Wernig. 2010. "Direct Conversion of Fibroblasts to Functional Neurons." *Nature* 463: 1035–42. doi:10.1016/j.wneu.2011.11.002.

Wakayama, S, M L Jakt, M Suzuki, R Araki, T Hikichi, S Kishigami, H Ohta, et al. 2006. "Equivalency of Nuclear Transfer-Derived Embryonic Stem Cells to Those Derived from Fertilized Mouse Blastocyst." *Stem Cells*, DOI:10.1634/stemcells.2005-0537 (http://stemcells. doi:10.1634/stemcells.2005-0537.

Wakayama, T, I Rodriguez, A C Perry, R Yanagimachi, and P Mombaerts. 1999. "Mice Cloned from Embryonic Stem Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (26): 14984–89. doi:10.1073/pnas.96.26.14984.

Warren, Luigi, Philip D. Manos, Tim Ahfeldt, Yuin Han Loh, Hu Li, Frank Lau, Wataru Ebina, et al. 2010. "Highly Efficient Reprogramming to Pluripotency and Directed Differentiation of Human Cells with Synthetic Modified mRNA." *Cell Stem Cell* 7 (5): 618–30. doi:10.1016/j.stem.2010.08.012.

Watkins, H, A Rosenzweig, DS Hwang, T Levi, W McKenna, CE Seidman, and JG. Seidman.

CONFIDENTIEL

1992. “Characteristics and Prognostic Implications of Myosin Missense Mutations in Familial Hypertrophic Cardiomyopathy.” *The New England Journal of Medicine* 326 (17): 1108–14.

Webster, Gregory, and Charles I. Berul. 2013. “An Update on Channelopathies: From Mechanisms to Management.” *Circulation* 127 (1): 126–40. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.060343.

Willems, Erik, Sean Spiering, Herman Davidovics, Marion Lanier, Zebin Xia, Marcia Dawson, John Cashman, and Mark Mercola. 2011. “Small-Molecule Inhibitors of the Wnt Pathway Potently Promote Cardiomyocytes from Human Embryonic Stem Cell-Derived Mesoderm.” *Circulation Research* 109 (4): 360–64. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.249540.

Wilmut, I, A E Schnieke, J McWhir, A J Kind, and K H Campbell. 1997. “Viable Offspring Derived from Fetal and Adult Mammalian Cells.” *Nature* 385 (6619): 810–13. doi:10.1038/385810a0.

Wu, Yongyan, Zhiying Ai, Kezhen Yao, Lixia Cao, Juan Du, Xiaoyan Shi, Zekun Guo, and Yong Zhang. 2013. “CHIR99021 Promotes Self-Renewal of Mouse Embryonic Stem Cells by Modulation of Protein-Encoding Gene and Long Intergenic Non-Coding RNA Expression.” *Experimental Cell Research* 319 (17). Elsevier: 2684–99. doi:10.1016/j.yexcr.2013.08.027.

Xie, Huafeng, Min Ye, Ru Feng, and Thomas Graf. 2004. “Stepwise Reprogramming of B Cells into Macrophages.” *Cell* 117 (5): 663–76. doi:10.1016/S0092-8674(04)00419-2.

Yakubov, Eduard, Gidi Rechavi, Shmuel Rozenblatt, and David Givol. 2010. “Reprogramming of Human Fibroblasts to Pluripotent Stem Cells Using mRNA of Four Transcription Factors.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 394 (1). Elsevier Inc.: 189–93. doi:10.1016/j.bbrc.2010.02.150.

Yang, Lei, Mark H. Soonpaa, Eric D. Adler, Torsten K. Roepke, Steven J. Kattman, Marion Kennedy, Els Henckaerts, et al. 2008. “Human Cardiovascular Progenitor Cells Develop from a KDR+ Embryonic-Stem-Cell-Derived Population.” *Nature* 453 (7194): 524–28. doi:10.1038/nature06894.

Yang, Q, A Sanbe, H Osinska, TE Hewett, R Klevitsky, and J Robbins. 1998. “A Mouse Model of Myosin Binding Protein C Human Familial Hypertrophic Cardiomyopathy.” *Journal of Clinical Investigation* 102: 1292–1300.

Yang, Xiulan, Lil Pabon, and Charles E. Murry. 2014. “Engineering Adolescence: Maturation of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes.” *Circulation Research* 114 (3): 511–23. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.300558.

Yoon, Byung Sun, Seung Jun Yoo, Jeoung Eun Lee, Seungkwon You, Hoon Taek Lee, and Hyun Soo Yoon. 2006. “Enhanced Differentiation of Human Embryonic Stem Cells into Cardiomyocytes by Combining Hanging Drop Culture and 5-Azacytidine Treatment.” *Differentiation* 74 (4). International Society of Differentiation: 149–59. doi:10.1111/j.1432-0436.2006.00063.x.

Yu, Seung Shin, Kazuyuki Dan, Hideto Chono, Emi Chatani, Junichi Mineno, and Ikunoshin Kato. 2008. “Transient Gene Expression Mediated by Integrase-Defective Retroviral Vectors.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 368 (4): 942–47. doi:10.1016/j.bbrc.2008.02.012.

Yumoto, Fumiaki, Qun Wei Lu, Sachio Morimoto, Hiroyuki Tanaka, Naoko Kono, Koji Nagata, Takao Ojima, et al. 2005. “Drastic Ca2+ Sensitization of Myofilament Associated with a Small Structural Change in Troponin I in Inherited Restrictive Cardiomyopathy.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338 (3): 1519–26. doi:10.1016/j.bbrc.2005.10.116.

Zareba, W, A J Moss, J P Daubert, W J Hall, J L Robinson, and M Andrews. 2003. “Implantable

CONFIDENTIEL

Cardioverter Defibrillator in High-Risk Long QT Syndrome Patients." *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 14 (4): 337–41.

Zareba, Wojciech, and Iwona Cygankiewicz. 2008. "Long QT Syndrome and Short QT Syndrome." *Progress in Cardiovascular Diseases* 51 (3). Elsevier Inc.: 264–78. doi:10.1016/j.pcad.2008.10.006.

Zhang, Miao, Jan Sebastian Schulte, Alexander Heinick, Ilaria Piccini, Jyoti Rao, Roberto Quaranta, Dagmar Zeuschner, et al. 2015. "Universal Cardiac Induction of Human Pluripotent Stem Cells in Two and Three-Dimensional Formats: Implications for in Vitro Maturation." *Stem Cells (Dayton, Ohio)* 33: 1456–69. doi:10.1002/stem.1964.

CONFIDENTIEL

Résumé :

L'objectif général de ce travail de doctorat a été centré sur l'utilisation des cellules pluripotentes induites humaines dans la modélisation et l'évaluation thérapeutique des pathologies cardiaques. Depuis leur découverte en 2006, les iPSC offrent une opportunité pour le développement de modèles cellulaires humains et spécifiques de patients pour l'étude des mécanismes physiopathologiques, l'évaluation de réponses pharmacologiques et le génération de cellules redifférenciées (ici en cardiomyocytes) pour des applications thérapeutiques cellulaires.

Dans ce travail nous avons démontré que la quantité mais aussi la qualité finale des cardiomyocytes dérivés d'iPSC dépend des conditions spatiales et pharmacologiques utilisées durant les différentes étapes de différenciation. L'utilisation d'un protocole de différentiation en monocouche avec blocage simultané et transitoire de l'ensemble des voies Wnt (canoniques et non canoniques) permet d'obtenir une maturation plus importante du sarcomère, étape essentielle pour la modélisation des sarcomèropathies.

La différenciation des iPSC en cardiomyocytes peut aussi être obtenue par une approche moléculaire ciblée visant à activer spécifiquement un programme cardiogénique. Celle-ci est obtenue via l'utilisation d'une protéine Cas9 mutée et couplée à un système transactivateur et permettant le ciblage simultané de 3 facteurs de transcription clés de la cardiogénèse. Cette approche moléculaire est renforcée par la combinaison avec une stimulation pharmacologique ciblant la voie Wnt.

Au-delà de la modélisation des pathologies cardiaques monogéniques, les cardiomyocytes dérivés d'iPSC permettent de reproduire des pathologies plus complexes et multigéniques.

Mots clés : [iPSC, Différenciation, cardiomyocytes, modélisation, édition du génome, CRISPRa]

Abstract:

The general objective of this work was centered on the use of human induced pluripotent cells in modeling and therapeutic evaluation of cardiac pathologies. Since their discovery in 2006, the iPSC provide an opportunity for the development of human cellular models and specific patients for the study of pathophysiological mechanisms, evaluation of pharmacological responses and the generation redifférenciées cells (cardiomyocytes here) for applications cellular therapeutic.

In this work we demonstrated that the quantity but also the final quality of cardiomyocytes derived from iPSC depends on the spatial and pharmacological conditions used during the various stages of differentiation. The use of a monolayer differentiation protocol with simultaneous and transient blocking of all Wnt pathways (canonical and noncanonical) allows to obtain a higher maturation of the sarcomere, an essential step for modeling sarcomeric cardiomyopathies.

IPSC differentiation into cardiomyocytes can also be obtained by targeted molecular approach to specifically activate cardiogenic program. This is achieved through the use of a mutated Cas9 protein and coupled with transactivator system. This allows simultaneous targeting of 3 key cardiogenesis transcription factors. This molecular approach is enhanced by the combination with a pharmacological stimulation targeting the Wnt pathway.

Beyond modeling of monogenic cardiac disease, cardiomyocytes derived from iPSC can reproduce more complex and multigenic diseases.

Keywords: [iPSC, differentiation, cardiomyocytes, modeling, genome editing, CRISPRa]

CONFIDENTIEL