



**HAL**  
open science

# Hépatocytes différenciés à partir de cellules souches pluripotentes induites : modèle pour la thérapie cellulaire et génique autologue de l'hémophilie B et modèle préclinique chez le primate

Eléonor Luce

► **To cite this version:**

Eléonor Luce. Hépatocytes différenciés à partir de cellules souches pluripotentes induites : modèle pour la thérapie cellulaire et génique autologue de l'hémophilie B et modèle préclinique chez le primate. Biologie cellulaire. Université Paris Saclay (COMUE), 2017. Français. NNT : 2017SACLS520 . tel-01968057

**HAL Id: tel-01968057**

**<https://theses.hal.science/tel-01968057>**

Submitted on 2 Jan 2019

**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.

# Hépatocytes différenciés à partir de cellules souches pluripotentes induites: modèle pour la thérapie cellulaire et génique autologue de l'hémophilie B et modèle préclinique chez le primate

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay  
préparée à l'université Paris Sud

École doctorale n°569 | Innovation thérapeutique : du fondamental à  
l'appliqué  
Spécialité: physiologie, physiopathologie

Thèse présentée et soutenue à Villejuif, le 15 décembre 2017, par

**Eléonor LUCE**

Composition du Jury :

Dr Laure COULOMBEL Directrice de recherche émérite, Membre du Comité National Consultatif d'Ethique	Président
Dr Chantal DESDOUETS Directrice de recherche, INSERM UMR_S1016	Rapporteur
Dr Sabine GERBAL-CHALOIN Chargée de recherche, INSERM UMR_S1183	Rapporteur
Dr Frank YATES Enseignant chercheur Sup'Biotech, Directeur des laboratoires CellTechs	Examineur
Thierry LAMBERT Hématologue, Responsable du Centre de Référence pour le Traitement des Hémophilies (CRTH) de l'hôpital Bicêtre	Examineur
Anne DUBART-KUPPERSCHMITT Directrice de recherche, INSERM UMR_S1193	Directeur de thèse



# REMERCIEMENTS

---

Une ancienne doctorante de l'équipe, Clara Steichen pour ne pas la citer, m'a dit un jour qu'écrire les remerciements de son mémoire de thèse avait finalement été un exercice difficile. Je me souviens m'être dit à l'époque que ça me semblait au contraire la partie la plus facile, après tant d'efforts de rédaction. Maintenant que je suis devant cette page blanche, je comprends mieux ce qu'elle voulait dire.

Je commencerai donc par remercier **les membres du jury** qui ont accepté cette lourde mission et tout particulièrement les rapporteurs qui m'ont aidée à améliorer ce manuscrit.

Ensuite, je voudrais remercier ma directrice de thèse, **Anne Dubart-Kupperschmitt**, pour m'avoir confié la rude tâche de reprendre le flambeau de Clara, pour tes précieux conseils, la confiance que tu m'as témoignée et la grande autonomie que tu m'as laissée. Merci de ne pas avoir craqué devant les corrections du papier espagnol, merci de m'avoir soutenue, tant professionnellement que personnellement, dans les moments difficiles.

Merci également à **Anne Weber** de m'avoir accueillie dans l'équipe. Merci pour tes conseils, ton expertise, tes relectures et ton optimisme quant à la transplantation du singe ! Merci à **Georges Uzan**, directeur de l'unité U972 à laquelle nous appartenions au début de l'aventure, puis à **Didier Samuel** et **François Le Naour** de nous avoir accueillis par la suite dans l'UMR\_S1193.

Un énorme merci à mon italienne adorée **Antonietta Messina**. Merci ma chérie de m'avoir tant apporté ces dernières années. Merci de m'avoir transmis une partie de ton savoir, tant sur la création d'agrégats que... des cheveux de Cendrillon, merci de m'avoir soutenue et merci d'avoir été là, toujours de bonne humeur et toujours dynamique. Je suis ravie de t'avoir forcé à parler français, et d'avoir partagé tous ces moments avec toi. Les « wonderwomens » forever !

Merci à **Jérôme Caron** d'avoir partagé ces 4 dernières années avec moi. Merci de ta bonne humeur (la plupart du temps...), merci pour les playlists dans le L2, les chorégraphies endiablées et les karaokés de folie.

Merci à **Clara Steichen**, ma blonde, qui m'a confié, non sans émotion, ses projets de thèse, ses bébés, et m'a fait confiance pour poursuivre ce qu'elle avait brillamment commencé. Merci d'avoir été là pour le début de cette grande aventure, et par la suite en congrès ou à l'apéro !

Merci à tous les membres de l'équipe passée et présente. Merci à **Sylvie Goulinet** d'avoir été mon maître zen pendant tant d'années, le bureau a tellement perdu en sérénité, odeur de thym et huiles essentielles depuis ton départ ! Merci à **Sarah Awan-Toor** de m'avoir appris ce qu'était la « coolitude » à l'état pur. Je me souviendrai toujours de ton « Là, je suis énervée », ou de ton « et voilà, j'ai aspiré mon culot » ! Merci également à **Noushin Dianat**, pour ta bonne humeur et ton accent qui nous a tant rafraîchi, de ces « celluloules » et de ces « touboules » ! Merci également à **Mickaël Allouche**, Super Stagiaire ! Merci pour ton aide précieuse, merci d'avoir été « Mister Q-PCR » pendant 6 mois et de nous avoir apporté ton accent du Sud (et ton pastis) si dépaysant. Merci

à mes « petites stagiaires », **Lou Guerry** et **Marine Duez**, pour avoir durant quelques mois partagé cette folle aventure avec moi. Et merci à **Nassima Benzoubir** avec qui j'ai également brièvement partagé un bureau. Merci pour ta bonne humeur, tes conseils et ton aide.

Merci à notre équipe de chirurgiens, **Guillaume Pourcher** et **Martin Gaillard** pour ceux que j'ai le plus connus, tellement « chir » dans l'attitude, et toujours agréables. Merci à **Istvan Blazsek**, pour sa gentillesse, sa bonne humeur, toutes ses « brèves » anecdotes le temps de ma cigarette et pour son pH-mètre !

Merci à notre gestionnaire de choc, **Vincent Quilin**, toujours disponible pour parler commande Safir, ordre de mission ou... jeux vidéo. Merci à **Christine Angelosanto**, pour ta bonne humeur et sa patience avec Airproduct !

Merci à **Ibrahim Casal**, pour sa gentillesse, sa bonne humeur, sa disponibilité et son aide précieuse, aussi bien pour les souris que pour sa caisse à outils. Merci également à toute l'équipe de l'animalerie, **Gaëlle Duvallet**, **Charlotte Auriou**, **Benoît Peuteman**, **Gilles Partoy**.

Merci également à tous ceux que j'ai rencontrés ces dernières années, avec qui j'ai travaillé, ou non, mais qui ont toujours été agréables, souriants, gentils et qui ont mis un peu de bonne humeur et parfois de légèreté durant ces dernières années pas toujours évidentes psychologiquement. Je pense par exemple à **Philippe Matima**, **Clémentine Pebarthe**, **Alejandra Vargas Valderrama**, **Anne-Charlotte Ponsen**, **Slavka Kascakova** et tant d'autres.

Merci à nos collaborateurs pour les travaux réalisés ensemble. Un merci tout particulier à **Olivier Christophe**, pour sa grande expertise de la coagulation, du FIX en particulier, sa disponibilité et son accueil, ses conseils, sa gentillesse et son aide précieuse avec les souris. Merci également à **Cécile Loubiere**, pour les difficiles analyses de facteur IX. Merci à **Gérard Tachdjian** et **Lucie Tosca** pour leur expertise en génomique. Merci à **Leila Maouche-Chrétien** et **Philippe Leboulch** pour la collaboration sur les iPSC de singe. Merci à **Lluis Martorell**, **Angel Raya**, **Francisco Vidal** et **Jordi Barquinero** pour la collaboration européenne sur les iPSC d'un patient hémophile. Merci aussi à nos collaborateurs nantais **Tuan Huy Nguyen**, **Angélique Fourier**, **Malika Gantier** et **Jean-Marie HESLAN** pour la collaboration sur l'élaboration des CRISPR.

Merci à mes amis, en particulier **Charlotte**, **Stéphanie**, **Sophie** et **Marianne**. Merci de m'avoir supportée ces dernières années, merci d'avoir accepté mes « absences », et mes silences radio, et merci d'être toujours là. Merci de me demander toujours « Et tes souris ? », et merci pour les soirées et les weekends à décompresser, à rigoler et à trinquer ! Merci à **Séverine** et l'équipe des musiciens **Magali**, **Astrid**, **Nicole**, **Elodée**, et vos moitiés, pour les soirées resto, malheureusement trop rares.

Et, enfin, merci à **ma famille**, pour leurs encouragements et leur soutien. Je remercie particulièrement mon oncle **Guy** et ma marraine chérie **Lili** d'avoir contribué depuis tant d'années à mon parcours scolaire et scientifique. Merci de m'avoir permis de suivre la voie que j'avais choisie. Merci également à ma sœur **Audrey**, ma moitié. Merci d'être une sœur géniale et pardon de ne pas être très disponible et de tout repousser à janvier.... Merci à mon beau-frère adoré **Cédric** et mes

nièces **Tessa** et **Chloé**, mes anges, si rafraîchissantes et capables de vous faire oublier tous vos soucis d'un sourire.

Pour finir, je voudrais remercier **mes parents**. En écrivant ces lignes, je me rends compte que je ne suis pas sûre de les avoir déjà vraiment remerciés pour tout ce qu'ils ont fait pour moi. C'est donc l'occasion ou jamais. Alors merci d'avoir cru en moi, même quand ça devenait compliqué, merci de m'avoir soutenue, merci de m'avoir permis de faire des études moins « courtes » que prévu, de m'avoir laissé partir à l'autre bout du monde pendant quelques mois, et merci pour les weekends au calme à Saint Souplets. Et pour finir, un merci tout particulier à ma formidable Maman. Merci pour ton soutien, ta patience, ton écoute quand je passais des heures à me plaindre des manips qui ne marchaient pas ! Merci d'être fière pour deux, et merci d'avoir pris ton rôle de « correctrice de manuscrit » avec le plus grand sérieux. Les cellules souches et le foie n'ont maintenant plus aucun secret pour toi, je n'en doute pas !

# AVANT-PROPOS

---

Au cours de mes études, j'ai eu l'occasion de réaliser des stages de plus ou moins longue durée dans des domaines assez différents de la biologie. J'ai tout d'abord commencé par travailler sur la binucléation hépatocytaire, lors de mes stages de BTS. Cela a été ma première rencontre avec ces cellules, et plus généralement avec le foie, un organe aux capacités étonnantes. Puis j'ai poursuivi mes études à Sup'Biotech et j'ai commencé à m'intéresser aux cellules souches, et plus particulièrement aux cellules souches pluripotentes induites (iPSC) et cette incroyable découverte de Shinya Yamanaka. J'ai eu la chance de réaliser mon stage de fin d'études au Harvard Stem Cell Institute, à Boston, aux Etats Unis où j'ai pu apprendre à reprogrammer des cellules somatiques en iPSC. Plusieurs projets d'études développés au sein du laboratoire m'ont alors confirmé l'énorme potentiel de ces cellules. A mon retour en France, Anne Dubart Kopperschmitt m'a proposé un poste dans son équipe. Elle travaillait sur les iPSC et leur différenciation en hépatocytes. C'était alors l'occasion rêvée de coupler deux domaines scientifiques qui m'avaient marquée au cours de mes études. Après 18 mois passés dans son équipe, nous nous sommes mises d'accord pour que je prenne la suite d'une étudiante en thèse, Clara Steichen. Et c'est ainsi que je me suis lancée dans cette aventure.

Mon projet était d'apporter la preuve du concept d'une thérapie cellulaire et génique autologue de maladies héréditaires du foie, par la transplantation d'hépatocytes différenciés à partir d'iPSC de patients, une fois celles-ci génétiquement corrigées. Je commencerai donc par présenter en introduction cet organe ainsi que les approches de transplantation développées jusqu'à ce jour afin de comprendre pourquoi nous avons développé cette approche de thérapie cellulaire à partir d'iPSC (**Introduction – Chapitre 1**). Je présenterai par la suite les cellules souches embryonnaires humaines dont la connaissance est essentielle à la compréhension de l'approche des iPSC développée par Shinya Yamanaka (**Introduction – Chapitre 2**).

Comme nous le verrons au cours de ces premiers chapitres, l'utilisation d'hépatocytes *in vitro* peut permettre de nombreuses applications. Leur faible capacité de prolifération et leur propension à la dédifférenciation *in vitro* a cependant nécessité de trouver une source alternative de cellules, dont les cellules souches pluripotentes, et a ainsi entraîné le développement de nombreux protocoles de différenciation hépatocytaire. Je présenterai donc, dans un troisième chapitre, un aperçu de ces différentes études ainsi que les éléments nécessaires à la compréhension de mes propres travaux (**Introduction – Chapitre 3**).

L'hémophilie B (HB) est une maladie génétique du foie entraînant un déficit en facteur 9 (FIX) de la coagulation synthétisé par les hépatocytes. Je décrirai donc cette maladie dans le dernier chapitre de l'introduction en présentant également les différentes approches thérapeutiques développées jusqu'à ce jour (**Introduction – Chapitre 4**). Une collaboration européenne m'a permis de travailler sur des iPSC d'un patient HB atteint d'une mutation atypique responsable de l'HB dans plusieurs familles royales européennes au cours des XIX<sup>e</sup> et XX<sup>e</sup> siècles. Après mise au point d'un protocole de différenciation hépatocytaire, nous avons réalisé une étude par séquençage à haut débit de l'ARNm du *F9* (**Résultats – Chapitre 1**).

Dans l'optique d'une thérapie cellulaire et génique, j'ai par la suite corrigé le défaut génétique de la maladie, à l'aide d'endonucléases artificielles, dans des iPSC obtenues au sein du laboratoire à partir de cellules d'un second patient. Les résultats de cette correction et de sa validation seront décrits par la suite (**Résultats – Chapitre 2**).

Avant son utilisation en clinique, la faisabilité et la sécurité d'une telle approche doivent être étudiées dans un modèle de gros animal. Le laboratoire, et en particulier une équipe de chirurgiens dirigés par Ibrahim Dagher, possède une forte expérience dans la transplantation d'hépatocytes chez le singe. La dernière partie de mon projet a donc consisté à mettre en place un protocole de différenciation d'iPSC de singe en hépatocytes en vue d'une transplantation autologue dans le foie de l'animal donneur (**Résultats – Chapitre 3**).

# TABLE DES MATIERES

---

Remerciements .....	3
Avant-propos .....	6
Table des matières .....	8
Table des illustrations.....	13
Liste des tableaux.....	15
Liste des abréviations .....	16
<b>CHAPITRE 1 : FOIE ET MEDECINE REGENERATIVE .....</b>	<b>18</b>
<b>I. Le foie : un organe complexe .....</b>	<b>18</b>
<b>II. Le foie et la transplantation .....</b>	<b>19</b>
A. Transplantation orthotopique du foie .....	19
B. Alternatives à la transplantation orthotopique du foie .....	21
a. Foies artificiels et bio-artificiels .....	21
b. Transplantation d'hépatocytes.....	22
<b>CHAPITRE 2 : CELLULES SOUCHES ET REPROGRAMMATION .....</b>	<b>25</b>
<b>I. Historique .....</b>	<b>25</b>
<b>II. Cellules souches embryonnaires .....</b>	<b>26</b>
A. Méthodes de dérivation.....	26
a. Isolement à partir de la masse interne du blastocyste.....	26
b. Transfert nucléaire .....	27
c. Fusion cellulaire .....	28
B. Caractéristiques principales des cellules souches embryonnaires.....	28
a. Auto-renouvellement .....	29
b. Pluripotence .....	29
C. Propriétés épigénétiques.....	30
D. Applications des hESC .....	31
a. Modèles d'étude du développement .....	31
b. Médecine régénérative et essais cliniques.....	31
c. Criblage.....	34
E. Problèmes liés à l'utilisation des hESC.....	34
<b>III. Cellules souches pluripotentes induites humaines.....</b>	<b>35</b>
A. Introduction aux cellules pluripotentes induites : la découverte de Shinya Yamanaka .....	35
B. Mécanisme de la reprogrammation .....	36
a. Remaniements cellulaires et géniques .....	37

b.	Remaniements épigénétiques .....	39
C.	Méthodes de reprogrammation .....	40
D.	Caractérisation des iPSC.....	43
E.	Avantages des iPSC humaines.....	43
a.	Thérapie cellulaire .....	44
b.	Criblage pharmacologique.....	45
c.	Modélisation in vitro de maladies .....	45
<b>IV.</b>	<b>Les cellules souches pluripotentes simiennes .....</b>	<b>46</b>
<b>V.</b>	<b>Intégrité génomique des hiPSC .....</b>	<b>47</b>
A.	Anomalies caryotypiques récurrentes dans les hiPSC .....	47
B.	Insertions ou délétions chromosomiques.....	48
C.	Mutations ponctuelles .....	48
D.	Impact des paramètres de la reprogrammation sur l'intégrité génomique des iPSC .....	49
<b>CHAPITRE 3 : DIFFÉRENCIATION DIRIGÉE DES CELLULES SOUCHES EN HÉPATOCTES.....</b>		<b>50</b>
<b>I.</b>	<b>Développement embryonnaire du foie .....</b>	<b>50</b>
A.	L'endoderme : première étape de la voie hépatique .....	50
B.	Formation du bourgeon hépatique et migration des hépatoblastes.....	51
C.	Bipotence et prolifération des hépatoblastes .....	52
D.	Différenciation des hépatoblastes en hépatocytes et maturation .....	53
<b>II.</b>	<b>Vue d'ensemble et protocoles existants .....</b>	<b>54</b>
A.	L'endoderme définitif : une étape clé.....	55
B.	Obtention et amplification des hépatoblastes .....	56
C.	Différenciation hépatocytaire et maturation des hépatocytes .....	56
<b>III.</b>	<b>Amélioration des protocoles « standard » de différenciation hépatocytaire .....</b>	<b>57</b>
A.	Amélioration des systèmes de culture en 2D .....	57
a.	Co-culture des hépatocytes .....	57
b.	Matrice extra-cellulaire .....	58
c.	Bio-impression .....	59
d.	Micro-puces .....	59
B.	Systèmes de culture en 3D.....	60
a.	Agrégats.....	60
b.	Organoïdes .....	61
<b>IV.</b>	<b>Utilisation des hépatocytes dérivés de CSP.....</b>	<b>62</b>
<b>CHAPITRE 4 : L'HEMOPHILIE B .....</b>		<b>64</b>
<b>I.</b>	<b>Historique de la maladie .....</b>	<b>64</b>
<b>II.</b>	<b>Présentation de la maladie .....</b>	<b>65</b>
A.	Génétique de l'hémophilie .....	65
B.	Symptômes et gravité de la maladie.....	65
<b>III.</b>	<b>Le rôle du facteur IX.....</b>	<b>66</b>

A.	L'hémostase et la coagulation .....	66
a.	L'hémostase primaire .....	66
b.	La coagulation.....	67
B.	Le gène du FIX .....	69
C.	La protéine du FIX et le rôle de la vitamine K .....	70
<b>IV.</b>	<b>Traitements de l'hémophilie B.....</b>	<b>71</b>
A.	Historique.....	71
B.	Traitements disponibles.....	72
A.	Nouveaux traitements en cours de développement .....	73
<b>V.</b>	<b>Thérapie génique de l'hémophilie B.....</b>	<b>74</b>
A.	Intérêts de la stratégie .....	74
B.	Essais cliniques.....	74
C.	Approches de thérapie génique <i>ex vivo</i> .....	75
<b>VI.</b>	<b>Utilisation des CSP pour la modélisation et le traitement de l'hémophilie B.....</b>	<b>76</b>
<b>VII.</b>	<b>Correction génétique : développement d'endonucléases artificielles .....</b>	<b>76</b>
A.	Zinc Finger Nucleases (ZFN) .....	77
B.	Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALEN) .....	78
C.	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-associated/Cas9 (CRISPR/Cas).....	79
<b>CHAPITRE 1 : MODELISATION DE L'HEMOPHILIE B : CAS D'UN PATIENT PORTEUR DE LA</b>		
<b>« MUTATION ROYALE ».....</b>		<b>83</b>
<b>I.</b>	<b>Présentation de l'article publié dans <i>Journal of Thrombosis and Haemostasis</i>.....</b>	<b>83</b>
<b>II.</b>	<b>Article .....</b>	<b>84</b>
<b>III.</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>99</b>
<b>CHAPITRE 2 : MODELISATION ET CORRECTION DE L'HEMOPHILIE B.....</b>		<b>100</b>
<b>I.</b>	<b>Obtention des cellules de patients.....</b>	<b>100</b>
A.	Précédents prélèvements et essais de reprogrammation .....	100
B.	Nouveaux prélèvements .....	101
a.	Tentative de reprogrammation à partir d'ECFC .....	101
b.	Tentatives de reprogrammation à partir de PBMC .....	102
c.	Prestataire extérieur.....	105
<b>II.</b>	<b>Différenciation hépatocytaire du clone HB-iPSC .....</b>	<b>106</b>
<b>III.</b>	<b>Correction génétique .....</b>	<b>106</b>
A.	Construction du plasmide .....	106
B.	Approches de correction.....	107
a.	Premier outil choisi : les TALEN .....	107
b.	Deuxième outil testé : technologie des CRISPR/Cas9.....	110
C.	Validation de la présence de la cassette thérapeutique dans les clones corrigés par séquençage.....	111
D.	Etude des insertions non ciblées .....	111

<b>IV.</b>	<b>Différenciation des iPSC corrigées en hépatocytes .....</b>	<b>112</b>
A.	Mise au point d'un protocole de différenciation dirigée en hépatocytes .....	112
B.	Etude de la production de FIX par les hépatocytes dérivés des iPSC.....	113
<b>V.</b>	<b>Amélioration de l'efficacité de différenciation par la culture 3D .....</b>	<b>114</b>
A.	Mise au point des conditions de différenciation en agrégats.....	114
B.	Analyse de la production de la protéine FIX et de son activité.....	116
<b>VI.</b>	<b>Validation de la correction <i>in vivo</i> : transplantation des hépatocytes dérivés des iPSC corrigées ....</b>	<b>117</b>
A.	Modèle animal .....	117
B.	Génotypage des animaux.....	118
C.	Analyse de la correction du phénotype hémophile .....	119
<b>VII.</b>	<b>Manuscrit en préparation .....</b>	<b>120</b>
<b>VIII.</b>	<b>Discussion et perspectives .....</b>	<b>149</b>

### **CHAPITRE 3 : PREUVE DE CONCEPT POUR LA TRANSPLANTATION AUTOLOGUE**

<b>D'HEPATOCYTES DERIVES D'IPSC DE SINGE (SIPSC) .....</b>	<b>151</b>	
<b>I.</b>	<b>Génération d'iPSC simiennes .....</b>	<b>151</b>
A.	Essais au laboratoire .....	151
A.	Collaboration et caractérisation d'iPSC simiennes .....	151
<b>II.</b>	<b>Culture des siPSC .....</b>	<b>152</b>
<b>III.</b>	<b>Différenciation hépatocytaire des siPSC.....</b>	<b>153</b>
<b>IV.</b>	<b>Transplantation des cellules différenciées chez la souris .....</b>	<b>156</b>
<b>V.</b>	<b>Mises au point des conditions de la transplantation chez le singe .....</b>	<b>156</b>
A.	Transduction GFP .....	156
B.	Banque de cellules .....	157
C.	Conditions de transplantation chez le singe .....	158
<b>VI.</b>	<b>Perspectives .....</b>	<b>158</b>
<b>I.</b>	<b>La problématique reprogrammation en iPSC des cellules de patients HB .....</b>	<b>160</b>
<b>II.</b>	<b>La correction génétique .....</b>	<b>162</b>
A.	Quelle stratégie et quel outil ?.....	162
B.	L'intégration non spécifique : comment l'étudier et qu'en conclure ?.....	165
<b>III.</b>	<b>Les systèmes de différenciation hépatocytaire .....</b>	<b>166</b>
A.	Quelles cellules utiliser pour la différenciation ?.....	166
B.	Les limites des protocoles de différenciation : cas de l'étude du FIX .....	167
C.	L'apport des systèmes de différenciation en 3D.....	168
<b>IV.</b>	<b>L'utilisation des cellules dérivées des iPSC en thérapeutique .....</b>	<b>169</b>
A.	Intégrité génomique des iPSC et des cellules différenciées.....	169

B.	Le potentiel manque de maturité des cellules obtenues après différenciation peut-il être un obstacle à leur application en thérapeutique? .....	171
<b>V.</b>	<b>Intérêts de la thérapie cellulaire appliquée à l'hémophilie B .....</b>	<b>172</b>
<b>VI.</b>	<b>Intérêts du modèle primate non humain .....</b>	<b>174</b>
<b>VII.</b>	<b>Questions éthiques.....</b>	<b>175</b>
<b>ARTICLES PUBLIES NON PRESENTES DANS LE MANUSCRIT .....</b>		<b>200</b>
<b>ARTICLE EN COURS DE SOUMISSION NON PRESENTE DANS LE MANUSCRIT .....</b>		<b>200</b>

# TABLE DES ILLUSTRATIONS

---

Figure 1: Structure du foie humain .....	18
Figure 2: Structure du lobule hépatique humain .....	19
Figure 3: Evolution du nombre de greffes en fonction des organes depuis 1991 .....	20
Figure 4: Evolution du nombre de publications sur PubMed mentionnant les cellules souches pluripotentes (embryonnaires ou pluripotentes induites) de 1950 à 2016.....	26
Figure 5: Dérivation de cellules souches embryonnaires à partir d'un blastocyste humain .....	27
Figure 6: Transfert nucléaire pour l'obtention de NT-ESC humaines.....	28
Figure 7: Pluripotence des cellules souches.....	29
Figure 8: Chronologie des évènements génétiques et épigénétiques au cours des 3 phases de la reprogrammation de fibroblastes embryonnaires de souris (MEF).....	37
Figure 9 : Rôle des facteurs de transcription Oct4, Klf4 et Sox2 au cours de la reprogrammation cellulaire .....	38
Figure 10: Applications potentielles des hiPSC .....	44
Figure 11: Induction de l'hépatogenèse par les signaux BMP et FGF .....	51
Figure 12: Formation du bourgeon hépatique et migration des hépatoblastes.....	52
Figure 13: Impact de la zonation des hépatocytes sur leur métabolisme .....	54
Figure 14: Etapes et marqueurs clés de la différenciation hépatocytaire de CSP .....	55
Figure 15: Génération d'un bourgeon hépatique à partir de cellules dérivées d'iPSC .....	62
Figure 16: Arbre généalogique de la reine Victoria montrant la transmission de l'hémophilie à travers les différentes grandes familles royales.....	64
Figure 17: Formation du clou plaquettaire .....	67
Figure 18: Schéma d'activation de la coagulation <i>in vitro</i> .....	68
Figure 19: Schéma de la coagulation <i>in vivo</i> .....	69
Figure 20: Schéma de la structure du FIX.....	69
Figure 21 : Schéma représentant la séquence du FIX sécrété dans la circulation sanguine.....	70
Figure 22 : Schéma représentant la séquence du FIX plasmatique avant et après activation de la coagulation (FIX sécrété et FIX activé) .....	71
Figure 23: Technologie des nucléases à doigts de zinc (ZFN).....	77
Figure 24: Technologie des Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALEN) .....	79
Figure 25: System Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-associated/Cas9 (CRISPR/Cas9).....	80
Figure 26: Représentation de la « mutation royale » à la jonction intron/exon de l'exon 4.....	83
Figure 27: Principe d'isolement des PBMC à partir d'un prélèvement de sang total. ....	101
Figure 28: Analyse par cytométrie en flux de cellules PBMC de patient après transduction par des VLP-GFP .....	103
Figure 29: Morphologie des cellules PBMC transduites à différentes MOI de VLP-OSKM .....	104
Figure 30: Analyses par immunofluorescence des protéines OCT4 et NANOG après cytopspin des cellules PBMC transduites à différentes MOI de VLP-OSKM.....	105
Figure 31: Plasmide et cassette de correction .....	106
Figure 32: Stratégie de correction du génome par la technologie des TALEN et intégration de la cassette thérapeutique au site AAVS1 .....	108

Figure 33: Protocole de correction du défaut génétique des HB-iPSC mis au point par la technologie des TALEN.....	109
Figure 34: Stratégie de correction du génome par la technologie des CRISPR/Cas9 et intégration de la cassette thérapeutique au site <i>AAVS1</i> .....	110
Figure 35: Localisation des amorces utilisées pour la validation des clones corrigés.....	111
Figure 36: Etude de l'insertion non ciblée dans deux clones corr-HB-iPSC.....	112
Figure 37: Schéma représentatif du moulage des micro-puits d'agarose.....	114
Figure 38: Mise au point de la concentration cellulaire optimale pour la formation des agrégats au cours de la différenciation hépatocytaire .....	115
Figure 39: Mise au point du stade de différenciation des cellules à utiliser pour la formation et le maintien des agrégats au cours de la différenciation hépatocytaire.....	115
Figure 40: Validation des conditions de différenciation hépatocytaire en 3D mises au point sur les cellules.....	116
Figure 41: Présentation du modèle de souris transgéniques <i>F9KO</i> .....	118
Figure 42: Schéma représentatif de la distinction des deux allèles (muté ou non) du <i>F9</i> chez la souris <i>F9KO</i> . .....	119
Figure 43: Exemple de gel PCR pour le génotypage des souris <i>F9KO</i> .....	119
Figure 44: Caractérisation du clone siPSC 902.2 .....	152
Figure 45: Protocole de différenciation hépatocytaire mis au point pour les siPSC.....	153
Figure 46: Analyse par RT-PCR de l'expression de marqueurs spécifiques au cours de la différenciation hépatocytaire des siPSC. ....	153
Figure 47: Caractérisation par immunofluorescence et cytométrie de flux des siPSC dans les premiers stades de la différenciation (J0 à J11) .....	154
Figure 48: Caractérisation par immunofluorescence et cytométrie de flux des siPSC dans les derniers stades de la différenciation (J18 à J25) .....	155
Figure 49: Protocole de transduction de cellules siPSC différenciées en hépatocytes à l'aide de vecteurs lentiviraux codant la GFP. ....	156
Figure 50: Analyse par cytométrie en flux de l'expression de GFP dans les cellules différenciées transduites (85% GFP+) et détection de la GFP par immunofluorescence (de gauche à droite).....	157
Figure 51: Morphologie des siPSC différenciées en hépatoblastes congelées à J18 de la différenciation hépatocytaire (panneaux de gauche) puis 2 jours après décongélation (panneaux de droite) .....	157
Figure 52: Construction des Target- AID .....	164

# LISTE DES TABLEAUX

---

Tableau 1 : Essais cliniques basés sur l'utilisation de cellules épithéliales de rétine différenciées à partir de hESC.....	33
Tableau 2 : Méthodes de reprogrammation publiées. ....	42
Tableau 3: Liste non exhaustive des protocoles de différenciation en endoderme définitif publiés à ce jour .....	55
Tableau 4: les facteurs de coagulation.....	67
Tableau 5: Récapitulatif des expériences de reprogrammation de prélèvements de patients HB au laboratoire.....	161

# LISTE DES ABBREVIATIONS

---

<b>A1AT</b> : alpha-1-antitrypsine	<b>FDA</b> : Food and drug administration
<b>AAV</b> : Adéno-associated virus	<b>FGF2</b> : Basic fibroblast growth factor
<b>ADLHSC</b> : Adult derived human liver stem cells	<b>FIX</b> : protéine Facteur IX
<b>ADN</b> : Acide désoxyribonucléique	<b>FIXr</b> : protéine Facteur IX recombinante
<b>AFP</b> : Alpha-fœtoprotéine	<b>FoxA</b> : Forkhead Box A
<b>ARN(m)</b> : Acide ribonucléique (messagers)	<b>GATA</b> : GATA Binding Protein
<b>ARNmm</b> : Acide ribonucléique, messagers modifiés	<b>GLA</b> : gamma-carboxyglutamic acid-rich
<b>BMP</b> : Bone morphogenic protein	<b>GMP</b> : Good manufacturing process
<b>BPF</b> : Bonnes pratiques de fabrication	<b>HA</b> : Hémophilie A
<b>CGH-array</b> : Comparative genomic hybridization array	<b>HB</b> : Hémophilie B
<b>CiRA</b> : Center for iPS cell Research and application	<b>HDR</b> : Homology direct repair
<b>CNV</b> : Copy number variations	<b>hESC</b> : Human embryonic stem cells (cellules souches embryonnaires humaines)
<b>CRISPR</b> : Clustered regularly interspaced short palindromic repeats	<b>hFIX</b> : FIX humain
<b>CSP</b> : Cellules souches pluripotentes	<b>HGF</b> : Hepatocyte growth factor
<b>CYP</b> : Cytochrome P450	<b>hiPSC</b> : human induced pluripotent stem cells (Cellules souches pluripotentes induites humaines)
<b>DMLA</b> : Dégénérescence maculaire liée à l'âge	<b>HLA</b> : Human leukocyte antigen
<b>EB</b> : Embryoid body	<b>HLC</b> : Hepatocyte-like cells
<b>ECFC</b> : Endothelial colony forming cells	<b>HNF</b> : Hepatocyte nuclear factor
<b>EGF</b> : epidermal growth factor	<b>HP</b> : Hepatocytes primaires humains
<b>EMT</b> : Epithelial to mesenchymal transition (TEM en français)	<b>HPH</b> : Human primary hepatocytes
<b>ESC</b> : Embryonic stem cells (cellules souches embryonnaires)	<b>HTS</b> : high-throughput screening
<b>F9</b> : gène codant pour le Facteur 9	<b>HUVEC</b> : Human umbilical vein endothelial cells
	<b>IP</b> : Immunoprécipitation

**iPSC** : induced pluripotent stem cells (cellules souches pluripotentes induites)

**iPSC-HLC** : induced pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells

**KOSR** : Knock-out serum

**LSEC** : Liver sinusoidal endothelial cells

**MCI** : Masse cellulaire interne

**MEF** : Mouse embryonic fibroblasts

**MET** : Mesenchymal to epithelial transition (TME en français)

**MMP** : matrix metalloproteinase

**mmRNA** : modified messenger ribonucleic acid

**MOI** : Multiplicity of infection

**MSC** : mesenchymal stem cells

**NGS** : next-generation sequencing

**NHEJ** : Non-homologous end joining

**NHP** : Non-human primate

**NMD** : Nonsense Mediated Decay

**OCT4** : octamer-binding transcription factor 4

**OKSM** : Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc

**ORF** : Open reading frame (phase ouverte de lecture)

**PAS** : Periodic acid schiff

**PBMC** : Peripheral blood mononuclear cells

**PBS** : Phosphate buffer saline

**PCR** : Polymerase chain reaction

**PDMS** : Polydimethylsiloxane

**PEC** : Progéniteurs endothéliaux circulants

**PEG** : Polyéthylène glycol

**PSC** : Pluripotent stem cells (cellules souches pluripotentes)

**RH** : Recombinaison homologue

**RPE** : Retinal pigment epithelium

**SCNT** : Somatic cell nuclear transfer

**sgRNA** : single guide RNA

**shRNA** : short hairpin RNA

**siPSC** : simian induced pluripotent stem cells

**SNP** : Single nucleotide polymorphism

**SNV** : Single nucleotide variation

**SOX2** : Sex determining region Y-box 2

**SSEA** : Stage-specific embryonic antigen

**STR** : Short tandem repeat

**SVF** : Sérum de veau foetal

**TALEN** : Transcription activator-like effector nucleases

**TGFβ** : Transforming growth factor β

**uPA** : urokinase-type plasminogen activator

**UTR** : Untranslated region

**VEGF** : Vascular endothelial growth factor

**VLP** : Virus-like protein

**WB** : western blot

**WT** : wild type (sauvage)

**ZFN** : Zinc finger nucleases

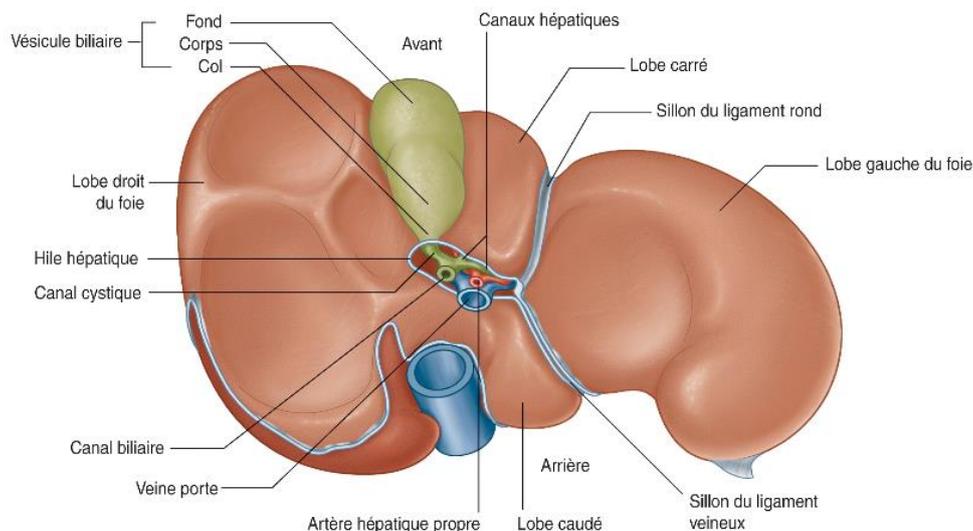
# INTRODUCTION

## Chapitre 1 : Foie et médecine régénérative

### I. Le foie : un organe complexe

Le foie est l'organe le plus volumineux chez l'homme et représente entre 2 et 5% de la masse corporelle totale. Malgré sa grande taille, il possède une très grande capacité de régénération. On considère en effet que 20 à 30% de sa masse suffiraient à le régénérer entièrement. Dans la mythologie grecque déjà, cette surprenante capacité à se réparer était connue et représentée par le supplice du titan Prométhée, enchaîné à un rocher et dont le foie était dévoré par un aigle durant la journée et se régénérait la nuit.

Situé dans la partie supérieure droite de l'abdomen, le foie est en partie protégé par les côtes. Il est composé de deux lobes principaux, le lobe gauche (1/3 de l'organe) et le lobe droit (2/3 de l'organe), ainsi que deux lobes beaucoup plus petits, le lobe carré et le lobe caudé (fig.1).

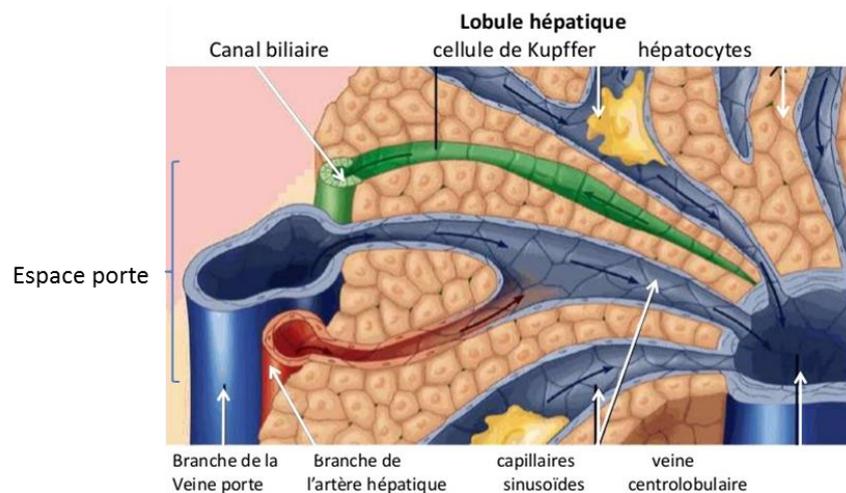


**Figure 1:** Structure du foie humain (Richard L. Drake - Gray's Anatomie pour les étudiants - 2011)

Le foie est constitué à 80 % d'hépatocytes, localisés dans le parenchyme. Ce sont des cellules épithéliales polarisées avec une face basolatérale du côté sinusoidal qui permet le transport des nutriments et l'export des sécrétions endocrines, et une face apicale par laquelle passe le transport des acides et sels biliaires dans les canalicules biliaires générés par des jonctions serrées entre les hépatocytes voisins.

Mais le foie est également composé d'autres types cellulaires comme par exemple les cellules des canaux biliaires (cholangiocytes) qui représentent environ 3% des cellules hépatiques, les cellules endothéliales, ou les cellules de Kupffer (macrophages du foie) qui représentent environ 2% des

cellules du foie. Les cellules hépatiques sont regroupées en lobules, unités fonctionnelles du foie présentes par millions dans l'organe. De forme polyédrique, ils sont structurés par la disposition des différents vaisseaux (fig.2). En leur centre se trouve la veine centrolobulaire, permettant de collecter le sang à la sortie du lobule, entourée d'espaces portes dans lesquels sont regroupés une branche de l'artère hépatique, une de la veine porte et un canal biliaire.



**Figure 2:** Structure du lobule hépatique humain (figure adaptée et traduite de <http://www.pathologyoutlines.com>)

Le foie est un organe très vascularisé. Il reçoit une grande partie du sang provenant directement du système digestif par la veine porte (70 à 80 % du débit sanguin hépatique), permettant l'apport de nutriments de l'intestin qui seront stockés, métabolisés et détoxifiés dans le foie. Mais l'apport en sang se fait également par l'artère hépatique (représentant 20 à 30 % du débit total) qui permet un apport en oxygène. Le sang de ces deux vaisseaux se mélange dans les sinusoides hépatiques qui cheminent entre les travées d'hépatocytes pour se réunir dans la veine centrolobulaire.

Sa vascularisation importante ainsi que son organisation cellulaire permet au foie de remplir de nombreuses fonctions. Il permet par exemple l'absorption du glucose et le stockage du glycogène, le métabolisme du cholestérol et de l'urée, et la sécrétion de la bile, indispensable à la digestion. Il est de plus le principal organe de détoxification du sang des xénobiotiques et il produit des protéines plasmatiques comme l'albumine, ou encore des protéines intervenant dans la voie de la coagulation. Il a également un rôle dans l'immunité grâce aux cellules de Kupffer, macrophages spécifiques du foie.

## II. Le foie et la transplantation

### A. Transplantation orthotopique du foie

Les maladies qui peuvent toucher le foie ont des causes variées : virales (hépatite B ou C), génétiques (maladie de Wilson, hypercholestérolémie familiale, hémophilie, etc...), cancéreuses (carcinome hépatocellulaire, cholangiocarcinome) ou encore liées à l'alcool (cirrhose) ou aux médicaments (hépatite médicamenteuse). Bien que des traitements existent pour certaines de ces maladies, elles

peuvent parfois évoluer en insuffisance hépatique aiguë mettant en jeu le pronostic vital du patient. Le seul traitement curatif est alors la transplantation orthotopique du foie, technique maîtrisée efficacement depuis la fin des années 1980. Depuis 1991, le nombre de greffes de foie a augmenté de près de 66%, c'est aujourd'hui le deuxième organe le plus greffé après le rein (fig.3).

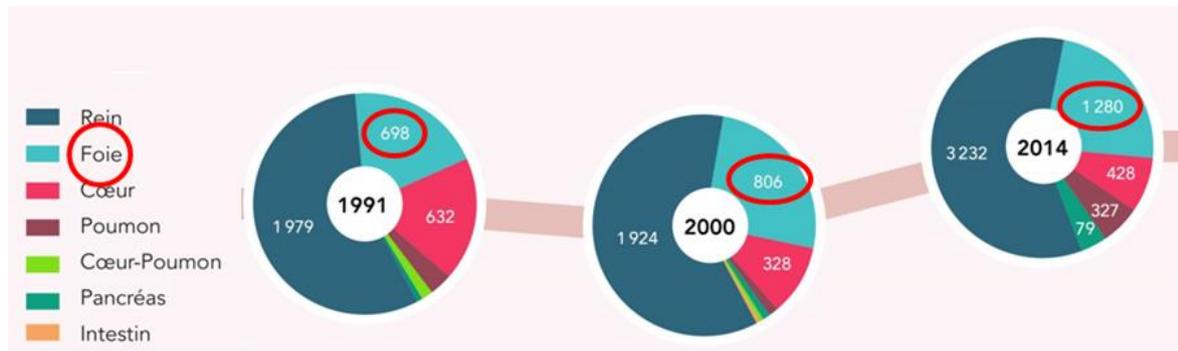


Figure 3: Evolution du nombre de greffes en fonction des organes depuis 1991 (dondorganes.fr)

Malheureusement, malgré les progrès des techniques de transplantation, comme la transplantation de foie partiel ou la transplantation à donneur vivant, la pénurie de greffons hépatiques persiste et le nombre de greffons disponibles reste insuffisant pour couvrir les besoins des patients en attente de transplantation. En 2011, en France, 1 164 patients ont pu recevoir une greffe de foie, soit 47.3% des 2 462 candidats à la transplantation (source : Agence de la Biomédecine - [www.agence-biomedecine.fr](http://www.agence-biomedecine.fr)).

En plus de la quantité limitée de greffons éligibles à la transplantation, d'autres facteurs rendent cette approche parfois impossible, comme par exemple les contre-indications à la transplantation comme des défaillances cardiaques ou respiratoires, ou encore des cirrhoses alcooliques non sevrées. De plus, des problèmes de compatibilité entre le receveur et le greffon se posent, telle que la compatibilité de groupe sanguin ABO. Dans tous les cas, un traitement immunosuppresseur est donné au receveur, provoquant de nombreux effets secondaires pouvant aller jusqu'à l'apparition de cancer. Dans certains cas, ces traitements immunosuppresseurs ne suffisent pas et l'organe est rejeté par le receveur. De plus, des complications opératoires ou post-opératoires peuvent apparaître comme une défaillance de l'organe nouvellement transplanté chez 10 à 15% des patients, ou encore des complications vasculaires, comme des thromboses de l'artère hépatique, biliaires ou infectieuses dans les cas d'hépatite par exemple.

Face à la pénurie d'organe, il est important de trouver des alternatives à la greffe, comme la transplantation d'hépatocytes, qui pourrait être suffisante pour certains patients atteints de maladies métaboliques par exemple, dans lesquelles la structure de l'organe n'est pas touchée, mais où seule une fonction hépatique est manquante et pourrait être assurée par les cellules saines greffées.

## B. Alternatives à la transplantation orthotopique du foie

Face aux difficultés évoquées précédemment, des alternatives à la transplantation d'organe sont explorées, comme par exemple la construction de foies bio-artificiels ou la transplantation d'hépatocytes.

### a. Foies artificiels et bio-artificiels

Dès les années 1950, l'hémodialyse a été utilisée dans les cas de maladies rénales et a montré des résultats très prometteurs. En 1958, cette technique a été utilisée chez 5 patients atteints de maladies hépatiques afin d'éliminer les toxines responsables des encéphalopathies hépatiques, et a montré une diminution du taux d'ammoniaque dans le sérum des patients, entraînant une amélioration de leur état clinique<sup>1</sup>. Plus tard, en 1967, l'équipe de Burnell a rapporté le premier cas d'un patient atteint de maladie hépatique et traité par circulation croisée avec un patient sain<sup>2</sup>. Cette étude a montré le rétablissement total du malade mais cette pratique n'a pas été poursuivie, les donneurs souffrant de sévères effets secondaires. Bien qu'aujourd'hui ce genre de pratique nous paraisse déontologiquement incroyable, elle a permis de mettre en lumière l'effet bénéfique de l'hémodialyse dans le traitement des maladies hépatiques, et a ouvert la voie vers le développement de ce qu'on appelle aujourd'hui les foies artificiels. Depuis 1968 et l'apparition de la plasmaphérèse<sup>3</sup> (technique permettant de prélever le plasma d'un individu), de nombreux systèmes ont été développés puis améliorés afin de traiter certaines maladies hépatiques, pour finalement aboutir à un foie artificiel comme nous le connaissons aujourd'hui.

Malheureusement, l'efficacité de l'hémodialyse démontrée pour les patients atteints de maladies rénales n'est pas la même que celle de la dialyse hépatique des foies artificiels. En effet, l'hémodialyse a pour but d'éliminer les petites toxines hydrosolubles du sang mais les hépatites conduisent souvent à l'accumulation de toxines liées à l'albumine, non éliminées par simple dialyse. De plus, ces systèmes ne permettent pas de détoxification enzymatique, ni de sécrétions hépatiques. Plusieurs systèmes de dialyse hépatique ont été développés. Le plus utilisé est le système MARS (« Molecular Adsorbants Recirculation System ») développé en Allemagne en 1999. Il se compose de deux circuits séparés. Un premier circuit permet de mettre en contact le sang du patient et de l'albumine sérique humaine à travers une membrane semi-perméable<sup>4</sup>. L'albumine va alors absorber les toxines du sang du patient puis être filtrée. Le second circuit se compose d'un appareil d'hémodialyse utilisé pour nettoyer l'albumine du premier circuit avant qu'elle ne soit remise en circulation dans le premier circuit. Le traitement se fait généralement sur trois à cinq séances de dialyse de 8 h mais a un coût important (plus de 2.000 € pour 6 heures de traitement) et ne permet pas de traiter le patient sur une longue durée<sup>5</sup>.

Face aux nombreuses fonctions assurées par le foie, qui ne le sont donc plus ou mal, lors d'une maladie hépatique grave, plusieurs équipes ont tenté de développer ce qu'on appelle aujourd'hui un foie bio-artificiel. A la différence des foies artificiels, qui agissent uniquement comme des filtres afin d'éliminer les toxines de l'organisme à la place de l'organe défectueux, les foies bio-artificiels permettent en plus de synthétiser des protéines hépatiques essentielles à l'organisme. Les premiers essais ont d'abord été développés en utilisant des animaux, comme des chiens<sup>6</sup> ou des cochons<sup>7,8,9</sup>, puis les animaux ont été remplacés par des bioréacteurs, dans lesquels des hépatocytes de chiens<sup>10</sup>

d'abord, de cochons<sup>11,12</sup>, puis enfin d'humains<sup>12</sup> ont été utilisés. Cependant, ces systèmes présentaient des problèmes de viabilité cellulaire qui ont dans leurs débuts fait douter de leur efficacité.

Depuis le début des années 90, ces équipements ont évidemment été améliorés et des études en phase I ont montré des résultats prometteurs chez certains patients, présentant des améliorations neurologiques et hémodynamiques. Un article publié en janvier 2016 regroupant les résultats de 10 études publiées entre 2000 et 2014 a montré que l'utilisation de foies artificiels ou bio-artificiels réduisait le risque de mortalité à court terme de près de 30% chez des patients atteints d'hépatites chroniques à aiguës<sup>13</sup>. Sur ces 10 études, 2 ont montré une réduction de 30% du risque de mortalité à moyen terme et 50% à long terme chez ces mêmes patients. L'utilisation de ces foies bio-artificiels n'est cependant pas une solution à long terme et ne sert le plus souvent qu'à maintenir l'état du patient en attente de greffon.

### *b. Transplantation d'hépatocytes*

Face à la pénurie d'organe, de nombreuses équipes se sont penchées sur la transplantation d'hépatocytes comme alternative à la transplantation de foie. Il existe pour cela plusieurs sources de cellules possibles, présentant chacune leurs avantages et leurs inconvénients.

#### *i. Hépatocytes matures*

L'isolement d'hépatocytes est techniquement possible après hépatectomie. Cependant les cellules ainsi obtenues perdent rapidement leurs caractéristiques phénotypiques en culture *in vitro*<sup>14</sup>, dû en partie à la perte de l'architecture tissulaire (perte des interactions cellules-cellules et cellules-matrice), mais aussi aux endotoxines contenues dans la collagénase utilisée pour leur isolement. Cette culture *in vitro* est cependant nécessaire afin de réaliser des tests fonctionnels avant la transplantation. De plus, les hépatocytes ont une capacité de prolifération quasi nulle *in vitro* et ne peuvent donc pas être amplifiés avant la transplantation. Enfin, même si des approches ont été développées afin d'améliorer les conditions de congélation/décongélation requises pour leur stockage, celles-ci entraînent des altérations aussi bien sur le plan morphologique que fonctionnel<sup>15</sup>.

Afin de pallier ce problème, de nouvelles techniques de culture sont aujourd'hui en développement, comme par exemple leur coculture avec des fibroblastes de souris dans un système de sandwich au collagène<sup>16</sup>, ou encore le développement de nouvelles matrices à base de laminine servant de support à la culture<sup>17</sup>. Des tentatives ont été également menées afin d'immortaliser des hépatocytes adultes<sup>18</sup>, mais les résultats obtenus jusqu'à aujourd'hui ne montrent pas un succès total, la prolifération et le maintien des fonctions hépatocytaires n'étant que partiels. Enfin, la disponibilité de tissus pour l'isolement des cellules est limitée, réduisant cette pratique au cas par cas, pour les patients en attente d'un greffon.

#### *ii. Progéniteurs hépatiques adultes et fœtaux*

Plusieurs autres types cellulaires ont donc été utilisés jusqu'à ce jour, comme les progéniteurs hépatiques fœtaux. Découverts chez la souris, ces cellules présentent de nombreux avantages par rapport aux hépatocytes adultes : ce sont des cellules bipotentes, c'est-à-dire capables de se

différencier en hépatocytes et en cellules biliaires, et très prolifératives lorsqu'une régénération hépatique importante est nécessaire<sup>19</sup>. Des études ont montré chez la souris la présence d'un gradient de jeunes hépatocytes possédant un fort potentiel prolifératif dans les zones périportales et d'hépatocytes plus matures dans les zones périportales, permettant une régénération hépatique due à une prolifération des progéniteurs périportaux qui migreront par la suite vers la veine centrale pour se différencier en hépatocytes<sup>20</sup>. Cette répartition hépatocytaire a par la suite été confirmée chez l'homme, montrant la présence de progéniteurs hépatiques au niveau du canal de Hering dans le foie adulte, et probablement au niveau de la plaque ductale chez l'embryon<sup>21</sup>. Plusieurs études ont d'ailleurs montré que des progéniteurs hépatiques murins étaient capables de proliférer *in vitro* et de se différencier en hépatocytes matures une fois greffés dans le foie de la souris<sup>22,23,24</sup>. De plus, ces cellules sont moins apoptotiques que les hépatocytes adultes après transplantation, moins immunogéniques, et de taille plus petite, permettant une injection intraportale et une dispersion plus facile<sup>25</sup>. En revanche, des problèmes de cryopréservation doivent encore être étudiés. Malheureusement, les résultats obtenus avec les progéniteurs hépatiques humains, dont l'isolement à partir d'un foie adulte a été décrit en 2006<sup>26</sup>, ne semblent pour l'instant pas montrer une régénération hépatique suffisante<sup>27</sup>, remettant en question la similitude de fonctions entre les progéniteurs hépatiques murins et humains. Il est cependant nécessaire de rappeler que de telles études chez l'homme requièrent l'utilisation d'un foie humain, souvent de mauvaise qualité, les meilleurs étant utilisés en clinique pour des transplantations.

### *iii. Cellules souches de la moelle osseuse*

La découverte d'hépatocytes portant un chromosome Y chez des patientes ayant reçu une greffe de moelle osseuse provenant d'un homme a permis de constater que les cellules souches de la moelle osseuse pouvaient contribuer à la régénération hépatique chez l'humain<sup>28</sup>. Des études ont par la suite confirmé chez l'animal la possibilité d'utiliser des cellules souches de la moelle osseuse afin de régénérer le foie *in vivo*, dans des modèles comme la souris<sup>29,30,31,32</sup>, le rat<sup>33</sup>, et le cochon<sup>34</sup>. Certaines de ces études montrent que cette régénération est en fait due à une fusion des cellules transplantées avec les hépatocytes résidents de l'animal. De plus, l'étude réalisée sur le cochon a montré un faible taux de repopulation de l'organe par les cellules transplantées (4.6%). Enfin, il a été également montré que les cellules souches mésenchymateuses (MSC pour mesenchymal stem cells) de la moelle osseuse jouaient un rôle dans la fibrose hépatique<sup>35</sup>, et que les bénéfices d'une telle greffe pourraient être dus aux propriétés angiogéniques des cellules plutôt qu'à leur réel potentiel de différenciation. Une analyse immunologique ainsi qu'un suivi à long terme des animaux restent encore à réaliser avant d'envisager une application clinique.

### *iv. Cellules souches du tissu adipeux*

Les cellules souches mésenchymateuses ont été à l'origine découvertes dans la moelle osseuse. Cependant, on peut également les trouver dans d'autres tissus comme le tissu adipeux. Ces cellules peuvent également être différenciées en hépatocytes<sup>36,37</sup>, et montrent un pourcentage de repeuplement hépatique de 10% après transplantation dans un modèle murin de régénération hépatique<sup>38</sup>. La stabilité phénotypique de ces cellules après transplantation et l'étude de leur capacité à contribuer à l'homéostasie du tissu à long terme restent cependant à démontrer avant leur utilisation en thérapie.

v. *Cellules souches du foie adulte*

Les cellules souches du foie adulte (ADLHSC de l'anglais Adult Derived Human Liver Stem Cells) présentent plusieurs avantages par rapport aux hépatocytes adultes ou aux progéniteurs fœtaux: elles sont capables de proliférer *in vitro* tout en restant fonctionnelles et leurs fonctions et morphologie sont maintenues après décongélation. De plus, leur utilisation n'entraîne pas les complications éthiques liées à l'utilisation de cellules fœtales. Il a été montré que ces cellules présentent également une propension à la différenciation dirigée en hépatocytes fonctionnels<sup>39</sup>. Les cellules ainsi obtenues sont capables de synthétiser du glucose mais aussi de métaboliser l'ammoniaque en urée. Une étude préclinique a montré l'absence de tumorigénèse suite à la culture à long terme de ces cellules<sup>40</sup>.

Enfin, deux applications cliniques ont été rapportées. L'injection intraportale d'ADLHSC chez un patient de 17 ans atteint de glycogénose de type 1 a permis de montrer le repeuplement du foie, sans invasion dans les organes périphériques, ainsi que le maintien de ces cellules pendant 5 jours post injection<sup>41</sup>. Une seconde étude rapporte le maintien de cellules transplantées dans le foie d'une petite fille âgée de 3 ans atteinte de déficience en ornithine carbamyl transférase, jusqu'à 3 mois après injection<sup>42</sup>. Cependant, ces résultats sont à prendre avec précaution, puisque seulement 4% de repeuplement ont été détectés après ces 3 mois, et que le suivi n'a pas pu se poursuivre, la patiente ayant reçu une greffe d'organe après ce délai.

vi. *Cellules souches embryonnaires et cellules souches pluripotentes induites*

Comme nous le verrons plus en détails dans le chapitre suivant, les cellules souches embryonnaires humaines<sup>43,44</sup>, et plus récemment les cellules souches pluripotentes induites<sup>45,46</sup>, peuvent être différenciées *in vitro* en hépatocytes. Cette différenciation guidée est basée sur les différentes étapes du développement embryonnaire du foie, mimées par l'ajout de facteurs de croissance ou de petites molécules dans le milieu de culture. Cette nouvelle approche permet une source quasi inépuisable d'hépatocytes.

## Chapitre 2 : Cellules souches et reprogrammation

### I. Historique

Le terme de cellule souche est apparu dès le 19<sup>e</sup> siècle dans les recherches du biologiste allemand Ernst Haeckel (1834-1919), qui l'utilise d'abord pour désigner un organisme unicellulaire à l'origine des organismes multicellulaires<sup>47</sup> (« Stammzellen »), puis plus tard comme la cellule œuf à l'origine d'un organisme complexe comme un animal ou un homme<sup>48</sup> (« Stammzelle »). Ce terme sera par la suite repris par plusieurs biologistes au début des années 1900 comme August Weismann<sup>47,49</sup> (1834-1914), ou Theodor Boveri<sup>47,50</sup> (1862-1915), qui précisèrent peu à peu certaines caractéristiques de ces cellules comme leur propriété d'auto-renouvellement et leur capacité à se différencier en plusieurs types cellulaires.

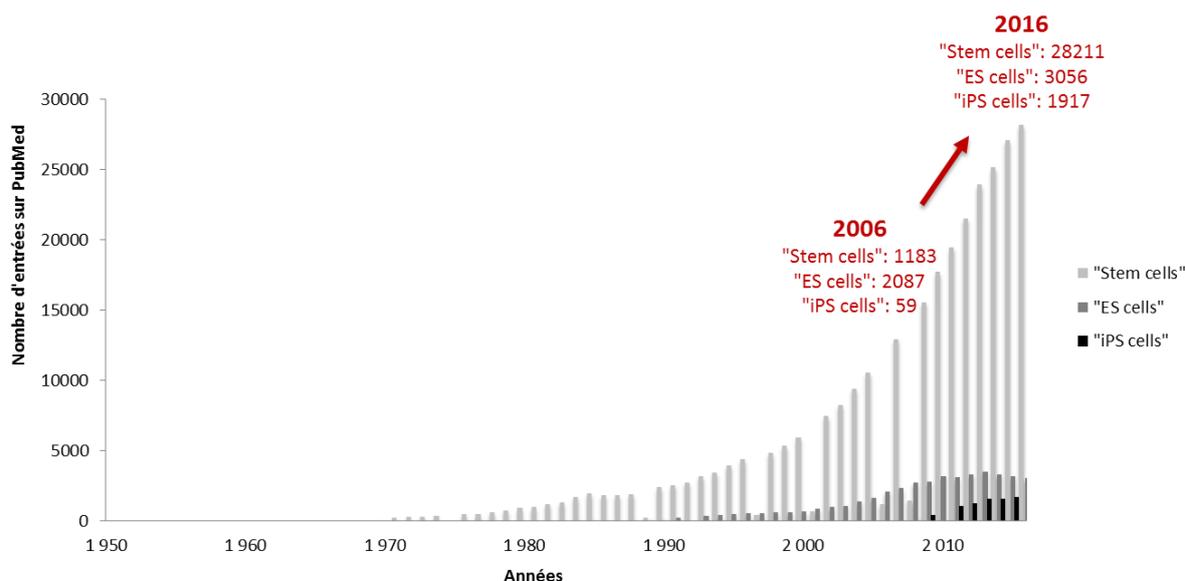
Au milieu du XX<sup>e</sup> siècle, les recherches sur ces cellules aux capacités extraordinaires s'étant peu à peu développées, une autre de leurs facettes fut mise en lumière : leur potentiel tumorigène, confirmé en 1907 par les travaux de Azkanazy<sup>47,51</sup> chez la souris. Dans les années 1950, l'américain Leroy Stevens, du Jackson Laboratory, découvrit une lignée de souris ayant une propension au développement de tératomes<sup>52</sup>. Il entreprit, ainsi que Barry Pierce<sup>53</sup> à la même époque, d'étudier le fort potentiel d'auto-renouvellement des populations cellulaires composant ces tératomes ou tératocarcinomes. Ils comparèrent ainsi ces cellules à celles composant un embryon, les deux « types » cellulaires permettant le développement de différents types de tissus à des degrés variables de différenciation. Des expériences de transplantations successives de ces tumeurs chez les souris<sup>54</sup> les ont amenés à émettre l'hypothèse de la présence de cellules embryonnaires dans ces tumeurs, et c'est ainsi que Barry Pierce développa le concept de corps embryoïde en 1959<sup>55</sup>, confirmant ainsi les résultats de Azkanazy du début des années 1900.

En 1972, les travaux du britannique Martin Evans présentèrent le premier isolement de cellules pluripotentes à partir d'une tumeur<sup>56</sup>. Le lien entre cellules tumorales et cellules embryonnaires fut confirmé par les travaux de Beatrice Mintz<sup>57</sup> et Ralph Brinster<sup>58</sup>, montrant que ces cellules tumorales pouvaient donner lieu au développement normal d'un embryon de souris après leur injection au stade blastocyste. Quelques années plus tard, en 1981, l'équipe de Martin Evans, nobélisé en 2007, publia le premier isolement et la culture de cellules souches embryonnaires de souris<sup>59</sup>. Cette découverte fut une étape clé dans la recherche sur les cellules embryonnaires car on pouvait alors cultiver des cellules, non tumorales, directement à partir de blastocystes sans devoir produire des lignées cellulaires de tératocarcinome<sup>60</sup>. C'est en 1998 que l'équipe américaine de James Thomson rapporta le premier isolement et la culture de cellules souches embryonnaires humaines (hESC pour human Embryonic Stem Cells)<sup>61</sup>, issues d'embryons surnuméraires conçus lors de fécondations *in vitro*.

La recherche sur les cellules souches a alors pris un tournant décisif et de nombreuses équipes ont étudié leurs incroyables propriétés, offrant la perspective de nouvelles applications comme la thérapie cellulaire, le criblage de molécules thérapeutiques, la reconstruction ou le remplacement de tissus malades. Seulement 10 ans après le premier isolement de cellules souches embryonnaires humaines, l'équipe de Shinya Yamanaka, nobélisé pour ces travaux en 2012, a encore bouleversé ce domaine de recherche en développant le principe de la reprogrammation de cellules somatiques<sup>62,63</sup>.

Il a montré que l'expression, à l'aide de vecteurs viraux, d'un cocktail de facteurs de transcription permettait de ré-activer les gènes associés à la pluripotence dans une cellule somatique, et ainsi la dé-différenciation de cette cellule vers l'état pluripotent caractéristique des cellules souches embryonnaires. Cette remarquable découverte a ainsi permis de contourner les problèmes éthiques liés à l'utilisation de cellules embryonnaires humaines et d'ouvrir une nouvelle porte sur une médecine personnalisée. Le nombre de travaux publiés sur les cellules souches, qu'elles soient embryonnaires ou pluripotentes induites, n'a alors cessé d'augmenter (fig.4).

### Evolution du nombre de publications dans le domaine des cellules souches de 1950 à 2016



**Figure 4:** Evolution du nombre de publications sur PubMed mentionnant les cellules souches pluripotentes (embryonnaires ou pluripotentes induites) de 1950 à 2016.

## II. Cellules souches embryonnaires

Tout d'abord isolées en 1981 chez la souris<sup>59</sup>, puis en 1998 chez l'homme par l'équipe de James Thomson<sup>61</sup>, les cellules embryonnaires (« ESC » pour Embryonic Stem Cells) sont, comme leur nom l'indique, dérivées d'un embryon. Les principales caractéristiques de ces cellules, sur lesquelles nous reviendrons plus en détails par la suite, comprennent l'auto-renouvellement, soit la capacité d'une cellule à créer davantage de cellules souches conservées dans un état indifférencié ; la clonogénicité, la capacité d'une cellule à former des cellules génétiquement identiques ; et la pluripotence, qui est la capacité à se différencier en plusieurs types cellulaires *in vitro* et *in vivo*.

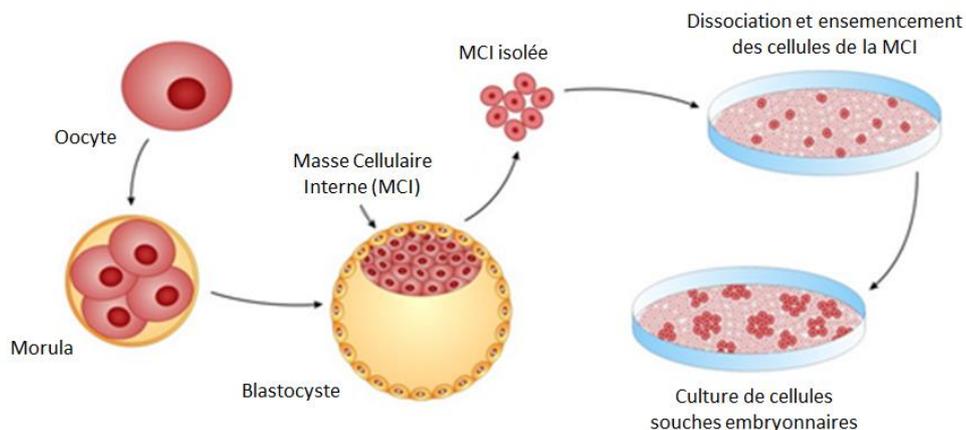
### A. Méthodes de dérivation

#### a. Isolement à partir de la masse interne du blastocyste

Les zygotes, formés suite à la fertilisation d'un ovocyte par un spermatozoïde, sont totipotents, c'est à dire capables de donner naissance à tous les types de cellules et donc à un organisme entier. Après

plusieurs divisions cellulaires, les zygotes se différencient en blastocystes à partir desquels la masse cellulaire interne (MCI), qui formera l'embryon, peut être isolée.

Les travaux de M. Evans sur des embryons de souris en 1981 montrèrent que les cellules de la MCI pouvaient être cultivées *in vitro* tout en gardant leur capacité de pluripotence<sup>59</sup>. C'est en 1998 que l'équipe de J. Thomson<sup>61</sup> publia la première dérivation de lignées de cellules souches embryonnaires humaines, à partir d'embryons issus de fécondation *in vitro* (fig.5).



**Figure 5:** Dérivation de cellules souches embryonnaires à partir d'un blastocyste humain (figure traduite et adaptée de Z. Balajthy – 2011)

La plupart des lignées de hESC utilisées aujourd'hui ont été obtenues par cette méthode. Cependant, celle-ci implique le plus souvent une culture sur des cellules nourricières de souris appelées MEF (Mouse Embryonic Fibroblasts), en présence de sérum animal. Cette méthode de culture n'étant pas compatible avec de potentielles applications cliniques, de nombreuses recherches sont actuellement effectuées afin d'obtenir des cellules dérivées et cultivées en absence de composés d'origine animale, dans des conditions définies et traçables (BPF pour Bonnes Pratiques de Fabrication, et en anglais GMP pour Good Manufacturing Process). Les MEF peuvent par exemple être remplacées par des matrices, comme le Matrigel®, la laminine<sup>64</sup>, ou bien encore des polymères synthétiques<sup>65</sup>. Des milieux de culture définis ont également été développés afin d'éliminer les sérums animaux, comme le NutriStem<sup>66</sup>, le TeSR2<sup>67</sup>, l'Essential 8<sup>68</sup> ou le StemFit<sup>69</sup>.

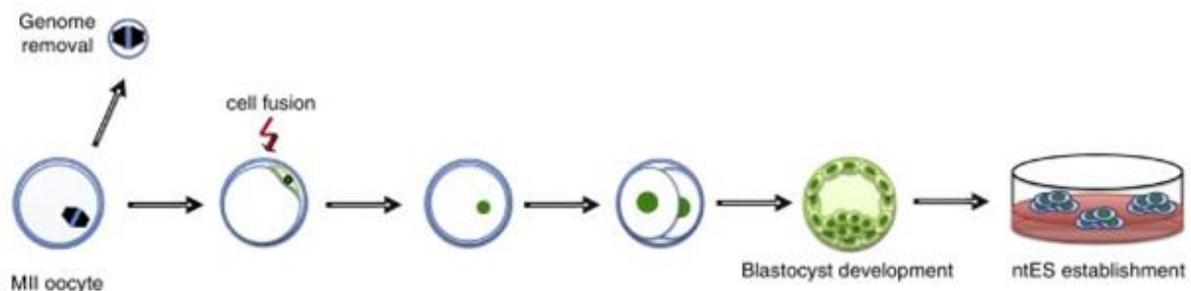
Cependant, la destruction d'embryons humains nécessaire à l'obtention d'ESC par cette approche pose de nombreux problèmes éthiques.

### b. Transfert nucléaire

La notion de transfert nucléaire a tout d'abord été développée au XIX<sup>e</sup> siècle comme étant une technique consistant à prélever le noyau d'une cellule somatique et à l'introduire dans le cytoplasme d'un ovocyte énucléé. Les premières expériences furent menées par l'allemand H. Spemann en 1938<sup>70</sup> sur des œufs de poissons et d'amphibiens. Quelques années plus tard, les américains O. Briggs et T.J. King<sup>71</sup> publièrent les premiers travaux d'injection de noyau de la blastula dans un ovocyte énucléé de grenouille *Rana pipiens*. Ils montrèrent ainsi que si le noyau et le cytoplasme de la cellule œuf utilisée étaient de la même espèce, un embryon pouvait être formé. Plus tard, en 1962, JB

Gurdon publia ses travaux sur le transfert de noyaux de cellules intestinales de têtards dans des ovocytes énucléés de grenouilles<sup>72</sup> montrant que le cytoplasme de la cellule énucléée permettait les divisions cellulaires nécessaires à la formation d'un blastocyste possédant les caractéristiques génétiques de la cellule intestinale utilisée. Cette technique a, par la suite, été utilisée dans de nombreuses autres espèces comme la souris<sup>73</sup>, le primate<sup>74</sup>, le cochon<sup>75</sup>, le lapin<sup>76</sup>, le chien<sup>77</sup>, le chat<sup>78</sup>, ou encore le chameau<sup>79</sup>. Le transfert d'un noyau de cellule épithéliale de glande mammaire dans un ovocyte de brebis a par ailleurs permis après transplantation chez l'animal de donner naissance à la très connue brebis Dolly en 1997<sup>80</sup>, première d'une longue série d'animaux clonés.

C'est en 2013 que le transfert nucléaire a été appliqué sur des cellules humaines permettant ainsi l'obtention de cellules souches embryonnaires humaines à partir de blastocystes générés par transfert nucléaire, appelées NT-ESC<sup>81</sup> (Nuclear Transfert-Embryonic Stem Cells) (fig.6). L'utilisation du transfert nucléaire pour l'obtention de NT-ESC permet ainsi d'obtenir des lignées ESC spécifiques d'un patient, permettant ainsi de modéliser certaines maladies génétiques *in vitro*. Cependant, même si la dérivation de NT-ESC ne requiert pas la destruction d'un embryon humain, la nécessité d'utiliser un ovocyte humain pose cette fois encore des problèmes éthiques.



**Figure 6:** Transfert nucléaire pour l'obtention de NT-ESC humaines (Yamada – *Current opinion in genetics and development* - 2015)

### c. Fusion cellulaire

Une autre approche de dérivation de cellules embryonnaires est la fusion cellulaire<sup>82</sup>. Celle-ci consiste, comme son nom l'indique, à fusionner une cellule somatique avec une cellule ES afin d'obtenir une cellule ES hybride tétraploïde. Cette approche a ainsi permis de mettre en évidence la capacité des cellules embryonnaires à reprogrammer le noyau d'une cellule somatique<sup>83,84</sup>. Cependant, plusieurs limites se posent à l'utilisation de cette méthode comme la présence de deux génomes distincts complets dans les cellules hybrides obtenues, ainsi que les problèmes éthiques liés à l'utilisation des cellules embryonnaires humaines.

### B. Caractéristiques principales des cellules souches embryonnaires humaines

Les cellules souches embryonnaires présentent deux caractéristiques : leur capacité d'auto-renouvellement, c'est-à-dire leur capacité à générer des cellules filles identiques aux cellules mères, ainsi que leur pluripotence, c'est-à-dire leur capacité à se différencier en plusieurs types

cellulaires<sup>85,86</sup> et théoriquement, par analogie avec la souris, avec tous les types cellulaires de l'organisme humain.

### a. Auto-renouvellement

Dès les années 1880, la question de la longévité des cellules intéressait certains scientifiques, comme August Weismann qui considérait que la mort survenait car les cellules ne pouvaient pas se diviser indéfiniment. C'est en 1965 que Hayflick confirma le nombre limite de divisions cellulaires de fibroblastes en culture<sup>87</sup>. La plupart des cellules somatiques cultivées *in vitro* présentent en effet un nombre fini (moins de 80) de doublements de population avant l'arrêt de la réplication ou la sénescence<sup>88</sup>. Celle-ci peut être liée à plusieurs phénomènes comme le raccourcissement des télomères, des défauts de réparation de l'ADN, une perte d'intégrité génomique, ou un trop grand stress oxydatif<sup>89</sup>. Les cellules souches en revanche sont dites "capables de prolifération extensive" ce qui signifie qu'elles peuvent subir plus de deux fois ce nombre de doublements de population (160) sans transformation oncogénique ni sénescence<sup>90,91,92</sup>. En 2004, Rosler et *al.*<sup>93</sup> publia une étude montrant que les cellules ES gardaient leur capacité d'auto-renouvellement ainsi que leur pluripotence après plus d'un an en culture.

### b. Pluripotence

Comme évoqué précédemment, la seconde caractéristique des cellules souches embryonnaires est leur pluripotence, c'est-à-dire leur capacité à se différencier en cellules dérivant des trois feuillettes embryonnaires (fig.7).

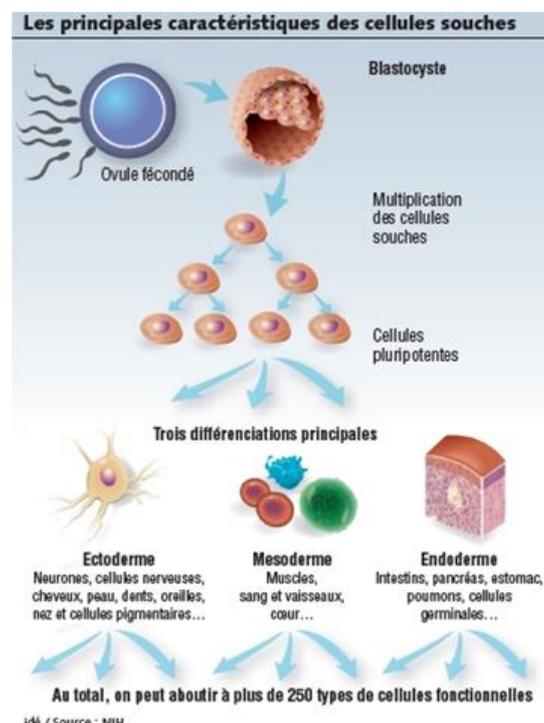


Figure 7: Pluripotence des cellules souches ([www.lesechos.fr](http://www.lesechos.fr) – source NIH)

Il existe plusieurs moyens d'évaluer les propriétés des cellules souches pluripotentes. Celles-ci peuvent être validées *in vitro* par l'expression de marqueurs plus ou moins spécifiques des cellules souches comme l'activité de la phosphatase alcaline, ou l'expression de marqueurs de surface détectables par cytométrie de flux ou immunofluorescence comme TRA-1-60, TRA-1-81, SSEA-3 ou SSEA-4 (Stage-Specific Embryonic Antigen 3 ou 4). La différenciation des ESC en cellules issues des trois feuillets embryonnaires permet également de confirmer leur pluripotence. Cette différenciation peut être spontanée, lors de leur culture en suspension, en absence de Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2) pour les hESC ou de Leukemia Inhibitory Factor (LIF) pour les ESC de souris, permettant la formation de corps embryoides composés de cellules différenciées, identifiables morphologiquement, issues des trois feuillets embryonnaires. Il est également possible de diriger la différenciation des ESC dans une voie spécifique en choisissant les conditions de culture appropriées. Plusieurs protocoles ont ainsi été publiés permettant d'obtenir des cellules dérivées de l'endoderme, comme les hépatocytes<sup>44</sup> ; de l'ectoderme, comme des motoneurones<sup>94</sup> ; ou des cardiomyocytes dérivés du mésoderme<sup>95</sup>.

Enfin, la pluripotence des ESC peut être validée *in vivo* après injection intramusculaire ou dans la capsule rénale de souris immunodéficientes formant un tératome composé de cellules différenciées issues des trois feuillets embryonnaires<sup>96</sup>.

### C. Propriétés épigénétiques

Chez les mammifères, plusieurs phénomènes participent aux modifications épigénétiques, y compris la méthylation de l'ADN, les modifications post-traductionnelles des histones comme leur méthylation, acétylation, phosphorylation ou ubiquitylation, ou bien encore le remodelage de la chromatine.

Au stade blastocyste, les cellules sont sujettes à de nombreuses modifications épigénétiques et il a été montré que les mécanismes de méthylation/déméthylation de l'ADN, au niveau de séquences régulatrices d'un gène ont un fort impact sur le comportement et le devenir des cellules<sup>97</sup>. Ainsi, les hESC utilisées en culture peuvent présenter des profils épigénétiques différents, pouvant ainsi impacter le maintien de leur pluripotence ou leur capacité de différenciation *in vitro*. Des études réalisées sur plusieurs lignées hESC ont ainsi montré que celles-ci présentent des caractéristiques épigénétiques communes<sup>98</sup>, potentiellement influencées par leurs conditions de culture (avec ou sans cellules nourricières, passage mécanique ou enzymatique), et le nombre de passages<sup>99</sup>.

Plusieurs études ont également montré que les hESC présentaient des modifications de leurs histones H3 et H4<sup>100</sup>, en particulier des acétylations. Ces modifications facilitant la transcription d'un gène par l'ARN polymérase, elles sont généralement associées à l'activation de celui-ci et les acétylations retrouvées dans les hESC peuvent donc potentiellement impacter leur capacité de différenciation dans certains types cellulaires<sup>101</sup>. Une étude du profil épigénétique des lignées hESC semble donc préconisée, surtout dans le cadre d'une utilisation thérapeutique.

#### D. Applications des hESC

En raison de leurs propriétés exceptionnelles, les hESC sont utilisées dans de nombreuses applications développées plus en détails dans les paragraphes suivants.

##### *a. Modèles d'étude du développement*

La possibilité de cultiver des hESC *in vitro* a permis tout d'abord d'améliorer notre compréhension de la biologie du développement précoce de l'embryon. Le développement des techniques d'analyses comme la CGH-array (Comparative Genomic Hybridization-array), la possibilité d'étudier les SNP (Single Nucleotide Polymorphism) ou encore des technologies plus courantes comme la PCR quantitative, ont permis d'étudier les cellules de l'embryon à différents stades de son développement. Une étude a par exemple montré que 60 à 80% des embryons au stade précoce (2<sup>e</sup> ou 3<sup>e</sup> jour de développement) sont porteurs d'une anomalie chromosomique, et que ce taux diminue à 40% au stade blastocyste (5<sup>e</sup> ou 6<sup>e</sup> jour de développement)<sup>102</sup>, mettant ainsi en avant la nécessité d'étudier les mécanismes impliqués dans la perturbation du cycle cellulaire à ce stade, mais également ses mécanismes de régulation. Plus récemment, le séquençage du transcriptome, appelé RNA-seq, a également permis d'étudier l'ARN au cours des différents stades du développement, et d'établir le profil d'expression allélique de certains gènes<sup>103</sup>.

En termes de médecine de reproduction, l'utilisation des hESC a également ouvert de nouvelles portes sur la recherche sur le développement de l'ovocyte, comme par exemple l'étude de sa capacité à se développer en fonction de son environnement. Ceci a permis d'améliorer la sélection des embryons utilisés pour les Fécondations *in vitro* (FIV) et donc d'obtenir des grossesses plus rapidement.

Enfin, l'utilisation des hESC a permis de montrer que les deux chromosomes X étaient encore actifs au stade blastocyste chez l'humain<sup>104</sup>, à la différence des autres mammifères où l'un des deux chromosomes X est inactivé très précocement afin d'égaliser la quantité de protéines produites dans les cellules mâles (XY) et femelles (XX). Cette découverte a permis de mettre en évidence une différence majeure entre les cellules animales et humaines, et donc la nécessité de mener des études chez l'homme.

##### *b. Médecine régénérative et essais cliniques*

L'accès aux hESC et le développement de protocoles de différenciation dirigée de ces cellules en différents types cellulaires par modulation de leurs conditions de culture offrent de nouvelles perspectives de traitement, en remplaçant par exemple les cellules défectueuses d'un patient par des cellules obtenues après différenciation *in vitro*. C'est ce qu'on appelle la thérapie cellulaire, ou médecine régénérative. Cette approche a d'abord été appliquée dans des modèles animaux, en utilisant par exemple des cellules souches embryonnaires humaines ou murines pour traiter des pathologies comme la maladie de Parkinson<sup>105</sup>, le diabète<sup>106</sup>, la dystrophie musculaire<sup>107</sup>, l'infarctus du myocarde<sup>108</sup> chez la souris, ou chez le singe<sup>109</sup>.

Chez l'homme, le premier essai clinique utilisant des cellules dérivées de hESC a été mené par la société californienne Geron<sup>110</sup> en 2010. Celui-ci était basé sur l'utilisation d'oligodendrocytes dérivés à partir de la lignée hESC H1 pour le traitement de lésions de la moelle épinière. Le traitement, administré dans les quinze jours après la lésion, devait permettre de régénérer la gaine de myéline. En effet, avant le lancement de cet essai, des études précliniques réalisées par une équipe de chercheurs de la compagnie Geron et publiées en mai 2005 ont montré que l'injection d'oligodendrocytes dérivés à partir de hESC (appelés GRNOPC1) rétablissait la locomotion dans un modèle de rat présentant une lésion artificielle de la moelle épinière reproduisant les mêmes signes cliniques que chez l'humain<sup>111</sup>. En comparaison avec le groupe témoin, les animaux ayant reçu l'injection de GRNOPC1 ont présenté une reprise de l'activité locomotrice de leurs pattes. De plus, l'analyse histologique de la moelle épinière au niveau des injections a montré une remyélinisation et une augmentation du nombre d'axones à proximité des zones d'injection. Des analyses réalisées neuf mois après l'injection ont permis de montrer que les cellules qui se développaient dans les zones de lésions étaient bien des cellules issues de GRNOPC1.

Le premier des 4 patients inclus dans la phase 1 de l'essai clinique, servant à s'assurer de l'innocuité du traitement, a reçu son injection de GRNOPC1 en 2010. En octobre 2011, la société Geron annonçait des données préliminaires indiquant qu'aucune amélioration de l'état des patients n'avait été constatée mais qu'aucun effet secondaire grave n'avait été observé non plus. L'essai a cependant été stoppé le mois suivant, pour des raisons plus économiques et stratégiques que de sécurité<sup>112</sup>. Le GRNOPC1 a par la suite été racheté par la société Asterias Biotherapeutics<sup>113</sup>, qui a réalisé également une étude de phase 1 avec ce produit (rebaptisé AST-OPC1) sur 5 patients suivis pendant 5 ans, et n'ayant montré aucun effet secondaire. Chez 4 de ces 5 patients, un potentiel effet positif des cellules injectées a été noté montrant un rétrécissement du site de lésion et une diminution de la détérioration du tissu lésé. Les résultats encourageants de cette phase I ont permis à l'entreprise d'obtenir l'autorisation de poursuivre ces essais en une phase I/IIa en novembre 2014. A ce jour, plusieurs patients ont été traités mais le recrutement des 35 patients de cet essai se poursuit toujours (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02302157>).

Fin 2014, le Pr Menasché, réalise une première mondiale (française !) en greffant un patch contenant des progéniteurs cardiaques dérivés de hESC<sup>114</sup> à une patiente de 68 ans atteinte d'insuffisance cardiaque sévère, à l'endroit précis où l'infarctus avait eu lieu<sup>115</sup>. Un an plus tard, l'état de la patiente s'est considérablement amélioré. Le recrutement des 6 patients de cet essai clinique initié en 2013 est en cours et s'achèvera en 2018 (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02057900>).

Enfin, de nombreux essais cliniques basés sur l'utilisation de cellules épithéliales de rétine (RPE pour Retinal Pigmented Epithelial cells) différenciées à partir de hESC ont été lancés ces dernières années (tableau 1).

Numéro d'identification	Maladie	Initiateurs	Nombre de patients	Date de début	Date de fin	Recrutement
NCT03046407	DMLA*	Public: Académie chinoise des sciences	10	Février 2017	Décembre 2020	En cours
NCT02590692	DMLA	Privé: "Regenerative Patch Technologies" (USA)	20	Octobre 2015	Septembre 2022	En cours
NCT02941991	Dystrophie maculaire de Stargardt	Privé : "Astellas Pharma" (Japon)	11	Octobre 2016	Décembre 2017	Clos
NCT01674829	DMLA	Privé : CHABiotech (Corée du Sud)	12	Aout 2012	Avril 2016	/
NCT01469832	Dystrophie maculaire de Stargardt	Privé : "Astellas Pharma" (Japon)	12	Novembre 2011	Septembre 2015	Clos
NCT02903576	DMLA / Dystrophie maculaire de Stargardt	Public : Université fédérale de Sao Paulo (Brésil)	18	Mars 2016	Juin 2017	En cours
NCT02445612	Dystrophie maculaire de Stargardt	Privé : "Astellas Pharma" (Japon)	12	Mai 2015	Aout 2029	Clos
NCT02463344	DMLA	Privé : "Astellas Pharma" (Japon)	11	Mai 2015	Aout 2029	Clos
NCT01344993 NCT01345006	DMLA	Privé : "Astellas Pharma" (Japon)	13	Avril 2011	Aout 2015	Clos
NCT02749734	DMLA	Public : Hopital Southwest (Chine)	15	Janvier 2016	Décembre 2017	En cours

\* DMLA : "Age-related Macular Degeneration": dégénérescence maculaire liée à l'âge.

**Tableau 1 :** Essais cliniques basés sur l'utilisation de cellules épithéliales de rétine différenciées à partir de hESC (source : clinicaltrials.gov)

En mars 2017, le scandale du « faux essai clinique » (pourtant publié sur le site officiel mis en place par le NIH, National Institute of Health) ayant fait perdre la vue à 3 patientes américaines atteintes de DMLA a alerté toute la communauté scientifique. Trois femmes de 72, 78 et 88 ans, pensant participer à une étude fiable menée par une clinique privée, ont versé chacune 5 000 dollars afin de recevoir leur traitement. Celui-ci consistait à prélever par liposuction de la graisse de l'abdomen des patientes, de la mélanger à leur sang enrichi en plaquettes, puis d'y incorporer des enzymes, afin d'obtenir des cellules-souches. Cette mixture a ensuite été injectée par les cliniciens dans les deux yeux des patientes. Au bout de 36 heures, les premiers effets désastreux de cette intervention se

sont fait sentir, et les trois patientes ont totalement perdu la vue un an après l'intervention. En dehors des conséquences dévastatrices pour les patientes, un autre problème majeur se pose. En effet, ce faux essai clinique est aujourd'hui encore relayé sur le site officiel du NIH répertoriant les essais cliniques (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02024269>), où il est précisé que l'essai a été abandonné avant le recrutement de patients. En juillet 2016, une étude révélait un chiffre édifiant : au moins 570 cliniques américaines proposent des soins illégaux utilisant de soi-disant cellules souches.

### c. Criblage

De par leurs caractéristiques uniques de pluripotente et d'auto-renouvellement, les hESC peuvent donner naissance à de nombreux types de cellules différenciées, permettant ainsi de mettre en place des criblages haut-débit de molécules pharmacologiques sur des types cellulaires humains jusqu'alors peu ou pas accessibles<sup>116</sup>. Jusqu'alors de tels criblages étaient réalisés sur des modèles animaux et on estime aujourd'hui leur efficacité à prédire la toxicité de composés pharmaceutiques sur l'homme à 50%<sup>117</sup>. Malheureusement, certaines maladies ne permettent pas de tels modèles et les différences de réponses entre les cellules animales et humaines rendent parfois ces modèles inutiles, voire trompeurs. L'utilisation de cellules différenciées à partir de hESC permet deux approches de criblage : la stratégie du médicament candidat, et le criblage à haut débit par HTS (High-Throughput Screening). La première approche est utilisée lorsque les mécanismes responsables de la maladie sont bien connus et que quelques médicaments potentiels sont déjà disponibles pour traiter des maladies semblables par exemple. La seconde approche en revanche repose sur les tests de nombreux composés pharmacologiques, jusqu'à un million, qu'il faudra bien sûr par la suite tester *in vivo*. Cette approche requiert cependant que le phénotype de la maladie puisse être rapidement visible, comme par exemple une variation de la prolifération cellulaire ou la production d'une protéine facilement détectable.

L'utilisation de hESC pour le criblage toxicologique a ainsi été décrite après leur différenciation en cardiomyocytes<sup>118</sup>, en neurones<sup>119</sup>, ou encore en hépatocytes<sup>120</sup>.

### E. Problèmes liés à l'utilisation des hESC

Dans un premier temps, l'utilisation de cellules différenciées à partir de hESC dans un contexte de thérapie pose le problème de fonctionnalité des cellules obtenues par rapport à des cellules primaires ou des lignées. De plus, l'efficacité des protocoles de différenciation n'étant pas toujours suffisante pour permettre l'obtention d'une population homogène de cellules d'intérêt, le risque de la présence résiduelle de cellules souches, pouvant ainsi provoquer l'apparition de tératomes, reste élevé. La possible présence de cellules tumorigènes dans le produit thérapeutique final, potentiellement due à une accumulation de mutations chromosomiques durant leur culture *in vitro*, est également à prendre en compte. Enfin, les conditions d'obtention et de stockage des cellules utilisées en thérapie doivent remplir les conditions de sécurité et respecter les bonnes pratiques de fabrication (BPF, ou GMP pour Good Manufacturing Process).

De plus, en dépit de leur potentiel prometteur, l'utilisation de cellules hESC conduit à plusieurs problèmes d'ordre éthique, moral ou religieux. Aucun domaine de la biologie n'a été plus

controversé que celui impliquant la reproduction humaine. La recherche sur les cellules souches porte également sur certaines des questions les plus fondamentales de la société, y compris la définition de la vie humaine et le statut moral et juridique de l'embryon humain. L'objection la plus fondamentale à la recherche sur les hESC est basée sur le fait que cette recherche prive un embryon humain de tout autre potentiel de se développer en un être humain vivant. Pour ceux qui croient que la vie d'un être humain commence au moment de la conception, la recherche sur les hESC viole les principes qui interdisent la destruction de la vie humaine et l'utilisation de la vie humaine comme un moyen à une autre fin.

L'utilisation des hESC, en recherche ou en thérapie, a donc amené à réviser les lois de bioéthique. En France, la première loi de bioéthique de 1994 interdisait toute recherche sur les hESC, sauf recherche non invasive ne portant pas atteinte à l'embryon. En 2004, celle-ci a été modifiée afin de permettre la manipulation de lignées de hESC existantes et la dérivation de nouvelles lignées uniquement sous réserve d'obtention d'une dérogation d'une durée de 5 ans délivrée par l'Agence de la biomédecine, et restreinte aux embryons obtenus par Fécondation *in vitro* (FIV) ne faisant plus l'objet d'un projet parental et après l'accord des parents. Au 1er janvier 2006, environ 300 lignées avaient été dérivées et publiées dans au moins 20 pays<sup>121</sup> (essentiellement les Etats-Unis, Israël, la Grande-Bretagne, la Suède, l'Australie, la Corée du Sud, et l'Espagne). Mais, seule une vingtaine est réellement utilisée en recherche par la communauté internationale. En 2013, le Parlement français a adopté une loi visant à autoriser la recherche encadrée sur ces cellules (Loi n° 2013-715 du 6 août 2013), maintenant l'obligation d'obtenir une autorisation de l'Agence de la Biomédecine, aux mêmes conditions que précédemment.

Jusqu'en 2007, les hESC étaient les seules cellules à posséder les extraordinaires caractéristiques d'auto-renouvellement et de pluripotence évoquées précédemment. Cependant, comme nous venons de le voir, leur utilisation en laboratoire pose de nombreux problèmes éthiques, moraux ou religieux. C'est dans ce contexte que l'équipe de S. Yamanaka a développé une technique permettant de reprogrammer une cellule somatique adulte différenciée en cellule pluripotente dite « induite » (iPSC, de l'anglais induced Pluripotent Stem Cell).

### III. Cellules souches pluripotentes induites humaines

#### A. Introduction aux cellules pluripotentes induites : la découverte de Shinya Yamanaka

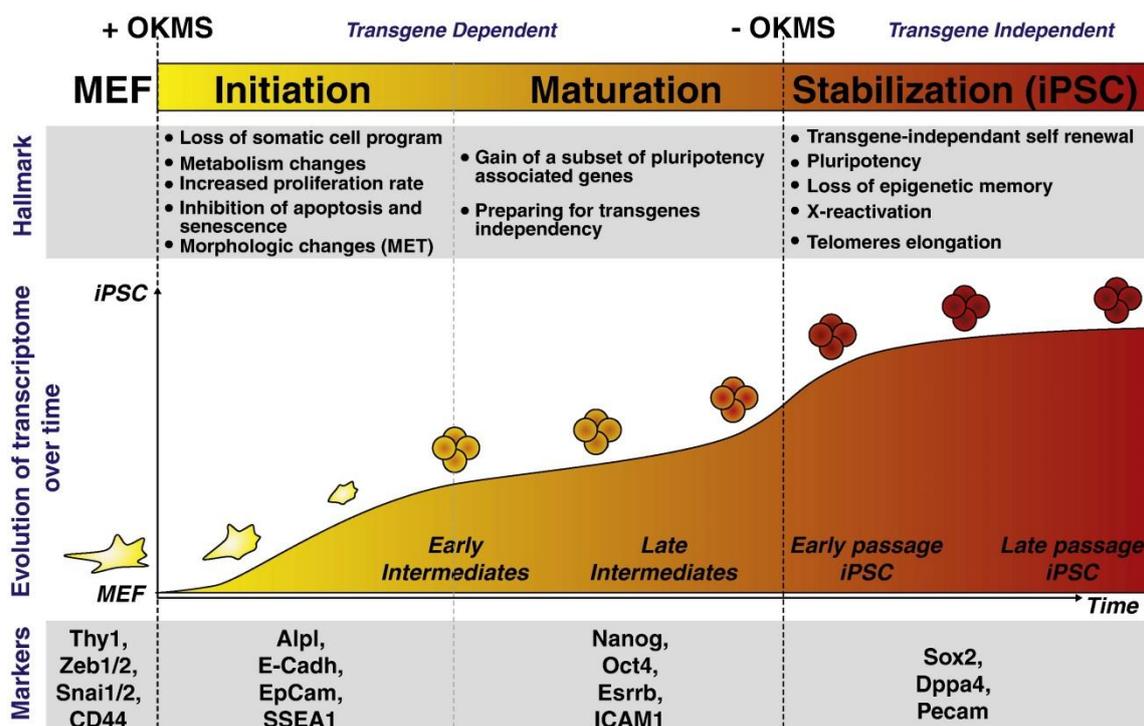
Arrivée en tête des dix percées scientifiques majeures de l'année 2008 présentées dans le journal « *Science* »<sup>122</sup>, la reprogrammation de cellules adultes spécialisées en cellules pluripotentes ayant les mêmes caractéristiques et potentiels que des cellules embryonnaires a ouvert une nouvelle voie de recherche sur les cellules souches. En effet, en 2006, l'équipe de S. Yamanaka publia dans la revue *Cell* une technique de reprogrammation de cellules adultes de souris en cellules ayant toutes les capacités des cellules embryonnaires en introduisant dans ces cellules adultes 4 gènes impliqués dans la pluripotence des cellules souches embryonnaires<sup>62</sup>. Ces cellules dites « pluripotentes induites », sont appelées les iPSC (induced Pluripotent Stem Cells). L'équipe japonaise a testé un cocktail de 24 gènes connus pour leur rôle dans le maintien de l'identité des cellules ES de souris. Ils ont utilisé pour cela un modèle de souris génétiquement modifiées possédant une cassette  $\beta$ gal/neo

(fusion de la beta galactosidase et du gène de résistance à la néomycine) insérée par recombinaison homologue dans le gène *Fbx15*, spécifiquement exprimé dans les cellules ES murines. La surexpression de chacun des 24 gènes choisis par transduction rétrovirale dans des fibroblastes embryonnaires de souris *Fbx15<sup>βgeo/βgeo</sup>* ne permit l'obtention d'aucun clone résistant au G418, indiquant qu'aucun de ces candidats ne pouvait à lui seul activer *Fbx15*. En revanche, la transduction simultanée des 24 candidats permit l'obtention de 22 colonies pluripotentes résistantes à l'antibiotique. Afin de déterminer quels facteurs induisaient cette reprogrammation, les auteurs ont supprimé un à un les différents candidats, jusqu'à obtenir une liste de 4 facteurs, nécessaires à l'obtention de colonies « ES-like » : *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* et *c-Myc*. L'année suivante, deux équipes, celle de Shinya Yamanaka<sup>63</sup> au Japon et de James Thomson<sup>123</sup> aux Etats-Unis, publièrent quasi simultanément les mêmes résultats sur la reprogrammation de cellules humaines en iPSC, les cocktails de facteurs de croissance utilisés différant légèrement dans les deux études.

## B. Mécanisme de la reprogrammation

La reprogrammation cellulaire est un processus complexe donnant lieu à des remaniements cellulaires et géniques, mais également à de grands changements épigénétiques permettant l'extinction des gènes de marqueurs de différenciation, ainsi que l'expression des gènes de cellules souches et de pluripotence. La chronologie de ces événements a été très étudiée et on en sait aujourd'hui un peu plus sur les différentes étapes de ce processus.

La plupart des études ayant permis de décortiquer ce mécanisme complexe ont été effectuées chez la souris, dans un système permettant une expression contrôlée des facteurs OKSM par induction à la doxycycline<sup>124</sup>. En contrôlant l'exposition à l'antibiotique, on peut ainsi maîtriser la fenêtre temporelle d'expression des facteurs de reprogrammation afin d'isoler plusieurs populations cellulaires à différents « stades » de la reprogrammation. Il semblerait que la reprogrammation repose sur 3 phases distinctes : une phase d'initiation, une phase de maturation suivie d'une phase de stabilisation de la reprogrammation<sup>125</sup> (fig.8).



**Figure 8:** Chronologie des événements génétiques et épigénétiques au cours des 3 phases de la reprogrammation de fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) (David et Polo – *Stem Cell Research* – 2014).

### a. Remaniements cellulaires et géniques

La phase d'initiation a été la phase la plus étudiée pendant quelques années, non seulement pour des raisons techniques (phase facilement étudiable même dans les cas où la reprogrammation ne mène pas à l'obtention d'iPSC, les premières méthodes de reprogrammation utilisées étant peu efficaces), mais aussi car la grande majorité des cellules est capable d'initier la reprogrammation<sup>126</sup>. Ces études ont montré que les cellules subissaient à la fois une diminution d'expression des marqueurs de surface spécifiques des fibroblastes, une augmentation d'expression des gènes associés à la pluripotence, ainsi qu'une réactivation de l'activité télomérase<sup>124,127</sup>.

Des études menées sur cette première phase de reprogrammation de fibroblastes murins ont montré que les cellules subissent une transition mésenchymo-épithéliale (TME, ou MET, de l'anglais Mesenchymal to Epithelial Transition)<sup>128</sup>. Cette transition se caractérise par une augmentation de l'expression des marqueurs des jonctions épithéliales et une répression des gènes impliqués dans le maintien d'un phénotype mésenchymateux. Au cours de cette transition, les cellules perdent peu à peu leur phénotype fibroblastique, visible par une inhibition de l'expression des marqueurs fibroblastiques comme *Thy 1*, *Snai1/2* ou encore *ZEB1/2*<sup>129</sup>; et acquièrent un phénotype épithélial avec l'apparition de jonctions adhérentes, visibles par l'expression de la cadhérine I et de la beta caténine par exemple. Un article publié en 2010 a montré que l'initiation de cette transition était en partie due à la voie de signalisation BMP (Bone Morphogenetic Proteins), qui interagirait avec les facteurs OKSM<sup>125</sup> afin d'activer certains miRNA comme miR205 et miR200.

Plusieurs articles publiés en 2012 ont ensuite permis de mettre en évidence les deux phases suivantes d'expression génique précédemment évoquées<sup>126,130</sup>. Durant les 3 premiers jours de la

reprogrammation, les gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, le métabolisme et l'organisation du cytosquelette sont activés, alors que les gènes associés au développement sont réprimés. Après 9 jours, on observe une surexpression des gènes associés au développement embryonnaire et à la maintenance des cellules souches : c'est la phase de stabilisation de la reprogrammation. L'étude de Polo et *al.* a ainsi montré qu'au cours de cette seconde phase, des gènes associés à la pluripotence comme *Fbx15* ou *Sall1* par exemple étaient activés, ainsi que certains gènes impliqués dans les cellules souches. Le cluster de gènes le plus tardivement activé identifié dans cette étude comprend des marqueurs connus de la souche comme *Nanog*, *Oct4*, *Sox2*, marquant l'acquisition d'un état souche et pluripotent stable.

Si la plupart des études semblent s'accorder sur la chronologie des événements, les mécanismes par lesquels les facteurs de transcription induisent cette reprogrammation ne semblent pas encore élucidés. Comme nous l'avons vu précédemment, la reprogrammation implique à la fois une inactivation du programme de différenciation mais également une activation du programme de transcription spécifique des cellules pluripotentes. L'une des théories avancées est que ces quatre facteurs participeraient à la fois à l'inactivation du programme somatique mais aussi à l'activation des gènes responsables de la pluripotence et de l'auto-renouvellement des iPSC car ces derniers peuvent être à la fois inhibiteurs et activateurs (fig.9A). Les gènes codant pour les régulateurs des cellules somatiques pourraient donc être inhibés par la fixation des facteurs de reprogrammation, tandis que les gènes responsables de l'auto-renouvellement et de la pluripotence pourraient être activés. Un autre mécanisme d'action impliquerait la séquestration, par ces facteurs de transcription, de protéines importantes pour la transcription des cellules somatiques dans des complexes inactifs, agissant comme des antagonistes de la différenciation<sup>131</sup>(fig.9B).

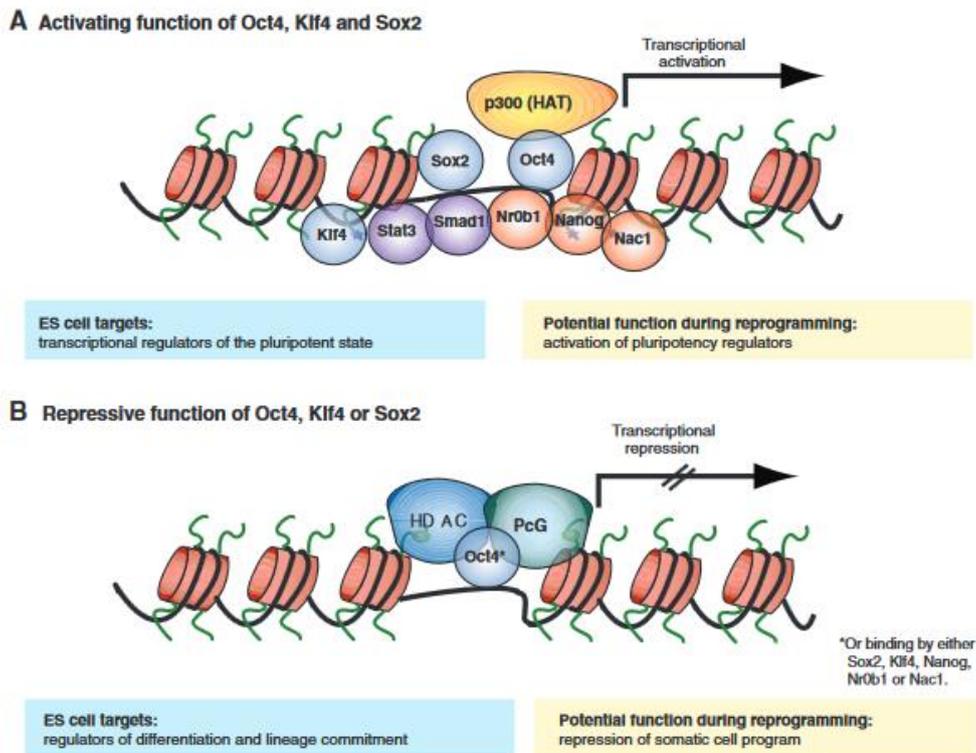


Figure 9 : Rôle des facteurs de transcription Oct4, Klf4 et Sox2 au cours de la reprogrammation cellulaire (Hochedlinger – *Development* – 2009)

Des études sur le rôle de cMyc au cours de la reprogrammation ont montré des fonctions pléiotropiques de celui-ci, comme le contrôle de l'initiation de la replication<sup>132</sup>, ou des effets sur la structure de la chromatine, et en particulier sur l'acétylation des histones<sup>133</sup>, qui pourrait ainsi permettre aux facteurs de transcription d'accéder à leurs sites cibles. Ce point a d'ailleurs été confirmé par des études utilisant des inhibiteurs de l'acétylation de l'histone qui pouvaient remplacer cMyc dans des expériences de reprogrammation<sup>134,135</sup>.

Des études menées grâce au système murin inductible à la doxycycline précédemment évoqué ont montré que la fenêtre temporelle d'exposition à l'antibiotique influait sur l'expression de certains gènes et que la génération d'iPSC nécessitait l'expression des facteurs de reprogrammation pendant une durée minimum de 12 à 16 jours<sup>124</sup>. D'après cette étude, l'arrêt de l'exposition à ces facteurs avant 12 jours entraîne un retour des cellules partiellement reprogrammées vers un état différencié. C'est également à cette étape de la reprogrammation qu'on observe l'activation des gènes endogènes *Oct4* et *Nanog*. En revanche, une exposition prolongée aux facteurs de reprogrammation exogènes empêche l'expression de certains gènes permettant la stabilisation de la reprogrammation<sup>136</sup>.

### *b. Remaniements épigénétiques*

L'importance de l'épigénétique dans la reprogrammation a été démontrée par la différence d'efficacité du processus dans différents types cellulaires. Par exemple, des progéniteurs neuronaux exprimant déjà Sox2 et Klf4 se reprogramment plus facilement que des fibroblastes<sup>137</sup>.

L'un des éléments clés de la reprogrammation est l'expression de gènes qui ont été « inactivés » au cours du développement. Ces gènes sont la plupart du temps situés dans des régions où la chromatine est très compactée, appelée hétérochromatine, ce qui implique que les facteurs de transcription utilisés pour la reprogrammation doivent tout d'abord « ouvrir » cette chromatine mais aussi supprimer les marqueurs épigénétiques des régions transcriptionnellement inactives, déméthyliser l'ADN et ajouter les marqueurs des histones des régions actives<sup>138</sup>. Les premiers facteurs de transcription impliqués dans la reprogrammation, appelés « pionniers », peuvent donc accéder à ces régions très compactes et induire une réorganisation de la chromatine ou encore permettre la fixation d'autres facteurs ou d'enzymes comme des protéines modifiant les histones<sup>139,140,141</sup>. L'ouverture de la chromatine, due à l'interaction de ces pionniers avec des nucléosomes<sup>142</sup>, permet de libérer l'accès à certains promoteurs sur lesquels pourront agir par la suite d'autres facteurs de transcription. La décondensation de la chromatine peut également être réalisée par acétylation et déméthylation des histones et il a ainsi été montré que l'utilisation de butyrate de sodium<sup>143</sup> ou d'acide valproïque<sup>144</sup>, des inhibiteurs des histones déacétylases (HDAC), permettait d'augmenter l'efficacité de la reprogrammation.

Une étude menée par Soufi et al.<sup>145</sup> a montré que la présence des facteurs OKS en grande quantité entraînait leur fixation sur beaucoup plus de gènes qu'ils ne le font physiologiquement et surtout que ces derniers pouvaient se fixer sur des régions inactives de l'ADN et agir comme les facteurs « pionniers » évoqués précédemment, alors que Myc se fixait uniquement sur des régions accessibles de l'ADN, confirmant le rôle distinct de Myc évoqué dans de précédentes études<sup>146</sup>.

De plus, des études menées sur la première phase de la reprogrammation ont montré uniquement des modifications des histones et aucune méthylation ou déméthylation de l'ADN<sup>126</sup>. Ceci a été confirmé dans une étude basée sur des shRNA (Short Hairpin RNA), montrant l'effet inhibiteur de l'histone methyltransferase DOT1L sur le déclenchement de la MET<sup>147</sup>.

Enfin, une étude a montré l'absence d'initiation de la reprogrammation dans un triple Knock-Out (K.O) Tet1, 2, 3 chez la souris, mettant ainsi en avant le rôle des Tets dans l'activation de certains microARN miR-200 nécessaires à la MET<sup>148</sup>. Une étude menée sur la reprogrammation de cellules B en 2014 a d'ailleurs confirmé le rôle de Tet2, dont la surexpression induite par C/EBP $\alpha$  augmentait la vitesse de reprogrammation<sup>149</sup>.

Après toutes ces modifications épigénétiques permettant de dédifférencier la cellule en « effaçant » son identité somatique, l'identité souche et pluripotente de la cellule peut ensuite être établie et stabilisée par une phase de méthylation.

Des études menées sur des stades plus tardifs de la reprogrammation ont montré un allongement des télomères à un niveau semblable à celui des cellules embryonnaires<sup>150</sup>, ainsi qu'une réactivation du chromosome X inactif dans les iPSCs femelles de souris<sup>127,151</sup>. En effet, dans les cellules de mammifères femelles, l'inactivation d'un des 2 chromosomes X au cours du développement embryonnaire est un mécanisme permettant de limiter l'expression des gènes portés par ce chromosome. Des études menées sur la reprogrammation de fibroblastes de souris ont montré une réactivation de l'X inactivé à un stade tardif du processus et une inactivation aléatoire d'un des 2 X lors de la re-différenciation des iPSC obtenues<sup>152</sup>. En revanche, des résultats parfois contraires ont été observés dans des études portant sur les iPSC humaines, potentiellement dus aux conditions de dérivation des hiPSC<sup>153</sup>.

Malgré toutes ces modifications épigénétiques, plusieurs études ont montré que les iPSC humaines gardent une signature épigénétique de la cellule somatique de laquelle elles dérivent<sup>154,155</sup> et possèdent donc une préférence de différenciation dans le type cellulaire d'origine<sup>156</sup>.

### C. Méthodes de reprogrammation

La méthode de reprogrammation initialement développée par l'équipe de Shinya Yamanaka nécessitait l'utilisation de 4 vecteurs rétroviraux intégratifs afin d'apporter les 4 gènes nécessaires. Cette méthode a été longtemps utilisée car plus efficace que de nombreuses autres mais elle présente certains inconvénients comme le risque de mutagenèse insertionnelle due à l'intégration d'une ou plusieurs séquences virales dans le génome et le risque d'absence d'extinction des transgènes qui peut influencer sur la capacité des cellules obtenues à se différencier. Des approches intégratives « améliorées » ont alors été développées, comme le système Cre/Lox, qui permet d'exciser les séquences virales après reprogrammation. Cependant, ces techniques intégratives présentent toujours un risque et sont peu compatibles avec une utilisation des cellules en clinique. Des approches non-intégratives ont alors été développées en utilisant par exemple des vecteurs viraux non intégratifs, des ARN<sup>157</sup>, des protéines<sup>158</sup>, ou des épisomes<sup>159</sup>.

Le tableau 2 présente un aperçu de ces nombreuses techniques, dans lequel sont résumés en quelques lignes les avantages et inconvénients de chacune d'entre elles. Cependant, il est parfois

difficile de les comparer, car l'efficacité de la reprogrammation ne dépend pas uniquement de la technique employée, mais également des cellules de départ<sup>160</sup>. De plus, la reproductibilité d'une expérience n'étant pas toujours évidente d'un laboratoire à un autre, ces comparaisons sont à nuancer.

Méthode de reprogrammation		Avantages	Inconvénients	Références	
Intégrative	Virale	Retrovirus	Très efficace, stable Facile d'utilisation Efficace sur un grand nombre de types cellulaires	Intégration génomique (possibilité système Cre/Lox)	Takahashi <sup>163</sup>
		Lentivirus	Efficace, stable Facile d'utilisation Efficace sur un grand nombre de types cellulaires	Intégration génomique	Maherali <sup>161</sup>
		Vecteurs lentiviraux excisables	Excisable Assez efficace	Intégration génomique	Chang <sup>162</sup>
		Systèmes lentivirus inducibles	Expression contrôlée des facteurs de reprogrammation	Intégration génomique	Hockemeyer <sup>163</sup>
	Non-virale	Transposons PiggyBac	Assez efficace Excisable	Intégration génomique Efficacité?	Woltjen <sup>164</sup>
		ZFN (Zinc Finger Nucleases)	Intégration ciblée Excisable	Intégration génomique	Ramalingam <sup>165</sup>
Non intégrative	Virus recombinant	Adenovirus	Très faible intégration génomique Simple	Lent et peu efficace	Mitani <sup>166</sup>
		Sendai	Pas d'intégration génomique Efficace sur un grand nombre de types cellulaires Facilement éliminé	Phase d'élimination du virus pas immédiate (plusieurs passages nécessaires)	Fusaki <sup>167</sup>
	Episomale	Vecteurs episomaux	Pas d'intégration génomique	Lent et peu efficace	Yu <sup>159</sup>
	Autres	mRNA	Pas d'intégration génomique Pas de transgène	Nécessité de transfections multiples	Warren <sup>157</sup>
		Protéines	Pas d'intégration génomique Pas de transgène	Nécessité de transfections multiples	Zhou <sup>158</sup>
		miRNA	Pas d'intégration génomique Pas de transgène		Anokye-Danso <sup>168</sup>

Tableau 2 : Méthodes de reprogrammation publiées.

En plus du développement de nouvelles méthodes de reprogrammation, de nombreuses études visent également à utiliser des cellules qui peuvent être obtenues par des méthodes non-invasives, à la différence des fibroblastes de peau initialement utilisés qui nécessitaient une biopsie. Ainsi, de nombreuses études sont aujourd'hui réalisées à partir de cellules de sang périphérique<sup>169</sup>, ou encore de cellules obtenues et amplifiées à partir d'échantillons d'urine<sup>170</sup>.

#### D. Caractérisation des iPSC

Si la formation de colonies « ESC-like » est un premier moyen de sélectionner et de repiquer manuellement les iPSC après reprogrammation, il est nécessaire de les caractériser afin de confirmer leur pluripotence. Il existe pour cela des moyens simples et rapides comme un test d'activité de la phosphatase alcaline<sup>171</sup>, réalisable en 15 minutes grâce à des kits commercialisés. On peut également réaliser des marquages par immunofluorescence de protéines membranaires caractéristiques des cellules souches comme SSEA-3, SSEA-4 (Stage-specific embryonic antigen 3 et 4), TRA-1-61 ou TRA-1-80. Des analyses par RT-PCR ou PCR quantitative permettent également de vérifier l'expression de marqueurs de cellules souches comme *OCT4*, *SOX2* ou encore *NANOG*.

De plus leur pluripotence, ou capacité de différenciation dans les divers types cellulaires de l'organisme, doit également être évaluée. Comme nous l'avons vu précédemment, cela peut être réalisé *in vitro* en générant de façon spontanée, après retrait du FGF2 (Fibroblast Growth Factor), des corps embryoïdes exprimant des marqueurs de cellules issues des trois feuillets embryonnaires. Un test *in vivo* de formation de tératomes contenant des cellules différenciées issues des trois feuillets embryonnaires après injection des iPSC dans des souris immunodéficientes est l'ultime confirmation de leur pluripotence.

Il est également important de confirmer l'identité des iPSC par l'étude de leur profil génétique afin de s'assurer que celui-ci est le même que celui des cellules utilisées pour la reprogrammation. Ceci peut être réalisé en vérifiant la présence d'une mutation dans les cellules de départ, ou en analysant des séquences ADN connues pour varier entre individus comme les STR<sup>172</sup> (Short Tandem Repeat).

Enfin, le processus de reprogrammation représentant un important stress cellulaire, il est nécessaire de s'assurer de l'intégrité du caryotype, qui peut parfois subir des modifications durant ce processus. Nous reviendrons plus en détails sur le contrôle de l'intégrité génomique des iPSC dans le paragraphe V.

#### E. Avantages des iPSC humaines

De par leurs caractéristiques similaires et parce qu'elle évite le problème éthique de la destruction d'embryon humain, l'utilisation d'hiPSC apparaît comme une alternative à la recherche sur les hESC et présente donc les avantages précédemment évoqués (Chap.2 - II. D) (médecine régénérative, criblage de candidats médicaments...). De plus, issues de patients spécifiques, elles permettent également la modélisation de certaines maladies dont le phénotype s'exprime dans des cellules jusqu'alors inaccessibles (fig.10).

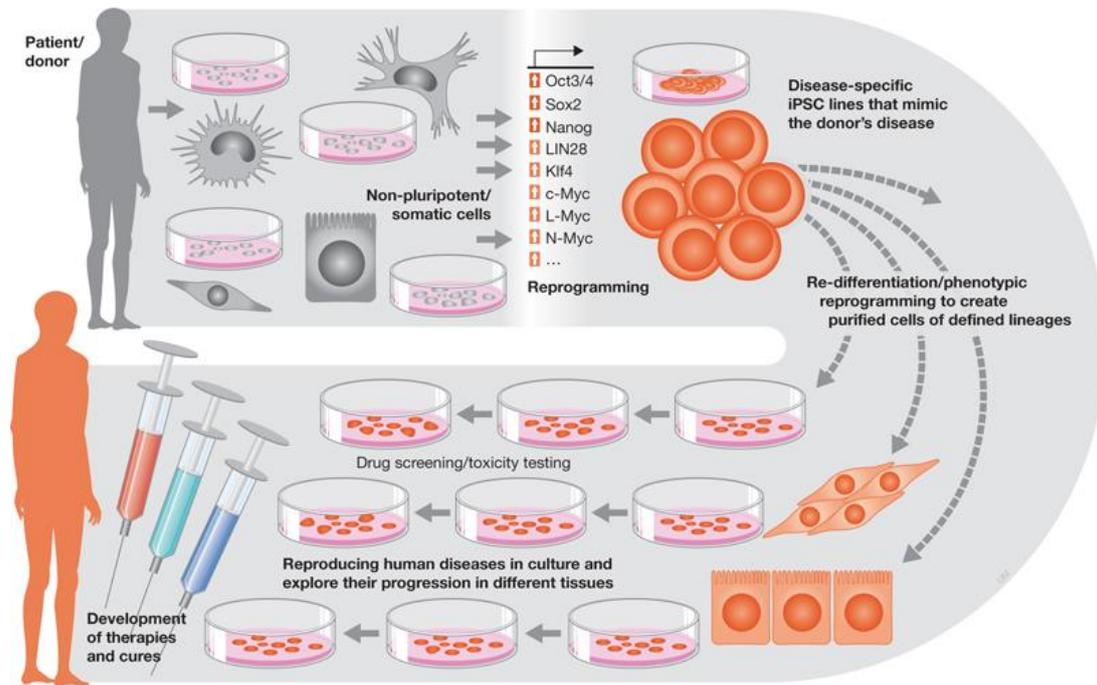


Figure 10: Applications potentielles des hiPSC (Deng W. – EMBO – 2010)

### a. Thérapie cellulaire

Depuis la découverte des hiPSC, la génération de cellules autologues à des fins de régénération tissulaire ou de thérapie cellulaire a été l'une des principales approches de la médecine régénérative basée sur ces cellules.

De nombreuses études chez l'animal ont déjà montré la faisabilité de l'utilisation de cellules différenciées à partir d'iPSC comme nouvelle source cellulaire pour la thérapie, chez la souris dans le traitement de la déparnocytose<sup>173</sup> (ou anémie falciforme), ou de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA)<sup>174</sup>, chez le singe dans le traitement de la maladie de Parkinson<sup>175</sup> ou encore chez le cochon pour le traitement de l'infarctus du myocarde<sup>176</sup>.

En septembre 2014 a eu lieu la première transplantation autologue de cellules dérivées d'hiPSC, dans un essai clinique japonais dirigé par le Pr. Takahashi pour le traitement de la DMLA<sup>177</sup>. Une patiente japonaise de 70 ans a ainsi reçu une transplantation de cellules de l'épithélium pigmentaire de la rétine (RPE pour Retinal Pigment Epithelium) différenciées à partir d'iPSC reprogrammées à partir de ses propres cellules de peau. Même si aucun effet secondaire n'a été détecté depuis, l'essai clinique a été stoppé en raison d'une modification de la loi japonaise relative à la médecine régénérative<sup>178</sup>. L'équipe du Pr. Takahashi a cependant déposé une nouvelle demande afin d'utiliser cette fois des cellules HLA-compatibles, et non pas autologues, pour la différenciation en RPE, issues du centre CiRA (Center for iPS Cell Research and Application) créé à Kyoto en avril 2010 par le Pr. Shinya Yamanaka et visant à créer une gigantesque banque de hiPSC de grade clinique.

*b. Criblage pharmacologique*

Les tests de toxicité de certaines molécules thérapeutiques sont le plus souvent réalisés sur des modèles animaux, comme le zebrafish<sup>179</sup> ou la grenouille<sup>180</sup>, ou sur des cellules animales cultivées *in vitro* mais la différence de métabolisme, et donc de réponse à ces molécules, entre les animaux et les humains pose des problèmes lors de l'extrapolation, pour l'utilisation clinique, des résultats obtenus chez l'animal<sup>181</sup>. L'utilisation de cellules dérivées d'hiPSC offre la possibilité d'utiliser des cellules humaines afin d'améliorer la pertinence des résultats obtenus, et ainsi d'optimiser les premières phases de développement de médicaments ou d'essais cliniques<sup>182</sup>.

Une étude publiée en 2015 a par exemple décrit l'utilisation de cardiomyocytes dérivés à partir de hiPSC dans un système en 3D sur micropuce<sup>183</sup>. Les auteurs ont ainsi testé 2 médicaments utilisés en clinique, le Verapamil et le Metoprolol, qui ont tous deux un impact connu sur le rythme des battements cardiaques. Les résultats obtenus sur les micropuces concordent avec les effets observés en clinique, et sont plus proches des résultats observés chez les patients que les précédents tests réalisés sur des cellules de cochon cultivées en 2D.

Une autre étude, publiée en 2012, a décrit l'utilisation de progéniteurs neuronaux dérivés à partir de hiPSC afin de tester l'effet de plus de 1500 molécules sur la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine, impliquée dans les mécanismes de traitement des troubles bipolaires<sup>184</sup>.

Enfin, les hépatocytes dérivés à partir d'hiPSC sont également de bons candidats pour des applications de criblage de molécules (drug screening) car le foie est le principal organe d'élimination des xénobiotiques. Cependant, pour donner des résultats fiables, les cellules différenciées doivent présenter des caractéristiques métaboliques semblables ou très proches de celles d'hépatocytes primaires, et à ce jour, les niveaux d'expression de cytochrome P450 et d'autres enzymes de détoxification sont bien inférieurs à ceux mesurés dans les hépatocytes primaires. Une étude a cependant montré des résultats très encourageants, en utilisant cette fois un système de co-culture d'hépatocytes dérivés d'hiPSC et de fibroblastes murins dans des micropuits<sup>185</sup>. Les auteurs décrivent les résultats du test de 47 molécules sur ces co-cultures, avec une efficacité identique à celle observée sur des hépatocytes primaires.

*c. Modélisation in vitro de maladies*

La découverte des iPSC ainsi que le développement de protocoles de différenciation dirigée dans de nombreux types cellulaires représente une source quasi illimitée de cellules dans le domaine de la médecine régénérative. Des iPSC reprogrammées à partir de cellules d'un patient seront porteuses de la mutation responsable de la maladie. La différenciation de ces iPSC en un type cellulaire d'intérêt peut ainsi permettre à la fois de mieux comprendre l'impact de la mutation sur le type cellulaire choisi, permettant ainsi des études de physiopathogénèse, mais aussi de tester certaines drogues sur ces cellules comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent.

Les premières études rapportant l'utilisation d'iPSC spécifiques d'un patient ont été publiées en 2008, soit juste un an après la découverte des hiPSC. La première, de Dimos et *al.*, décrit la génération d'hiPSC à partir de cellules d'une patiente de 82 ans atteinte d'une forme familiale de sclérose latérale amyotrophique (ALS pour Amyotrophic lateral sclerosis)<sup>186</sup>. La seconde étude de

Park et *al.*, décrit la dérivation de lignées hiPSC à partir de plusieurs patients atteints de maladies génétiques diverses<sup>187</sup>. Depuis, de nombreuses équipes ont dérivé des hiPSC de patients atteints de maladies génétiques neurologiques comme la maladie de Huntington<sup>188</sup>, la maladie de Parkinson<sup>189</sup>, ou la forme héréditaire de la maladie d'Alzheimer<sup>190</sup>; musculaire comme la dystrophie musculaire de Duchenne<sup>191</sup>; métabolique comme l'hypercholestérolémie familiale<sup>192</sup>, ainsi que des maladies des yeux comme la dégénération maculaire liée à l'âge<sup>193</sup> dont les causes génétiques ne sont pas encore tout à fait élucidées, ou des maladies du sang comme la  $\beta$ -Thalassémie<sup>194</sup>.

La modélisation de ces maladies génétiques est un précieux atout et, même si elle n'est pas parfaite, permet d'offrir un modèle supplémentaire pour de nombreuses pathologies pour lesquelles les modèles animaux manquent ou ne sont pas assez représentatifs de la pathologie chez l'homme. Ces modèles sont cependant un peu moins pertinents dans le cas de maladies multifactorielles où l'environnement joue également un rôle compliqué à reproduire *in vitro*.

#### IV. Les cellules souches pluripotentes simiennes

Après la grenouille au XIXe siècle, la drosophile au XXe siècle, les souris sont aujourd'hui très souvent utilisées en laboratoire pour leur reproduction rapide, leur facilité d'élevage, ou encore leur coût modéré. Si de nombreux mécanismes moléculaires sont partagés par toutes les espèces vivantes et peuvent donc être extrapolés à l'homme (dans une certaine mesure) à partir des observations chez l'animal, ceci devient plus problématique quand on s'intéresse par exemple au cerveau ou au système immunitaire. De plus, l'étude de certaines pathologies comme les maladies dégénératives par exemple, nécessite un suivi à long terme de l'animal et est donc limité par la faible durée de vie de certains animaux.

Le modèle singe, ou primate-non-humain (PNH), est donc indispensable pour certaines applications, malgré de nombreux efforts pour limiter l'utilisation de grands animaux à des fins de recherches médicales et pour développer des alternatives comme les études *in silico*. Les similarités génétiques et physiologiques avec l'homme, ainsi que leur espérance de vie moyenne, permettent de réaliser des études à long terme, comme un suivi de cellules transplantées par exemple. Des modèles simiens de la maladie de Parkinson<sup>195</sup>, des modèles d'ischémie cérébrale<sup>196</sup> ou de lésion de la moelle épinière<sup>197</sup> ont ainsi été développés chez le marmoset. En effet, le marmoset est l'un des modèles simiens les plus utilisés en laboratoire, et est d'ailleurs, à ce jour, le seul à partir duquel ont été créés des modèles transgéniques ayant montré une transmission germinale du transgène<sup>198</sup>, à la différence d'autres modèles comme le macaque rhésus<sup>199</sup>.

Les premières ESC de singe ont été dérivées en 1995, par l'équipe de J. Thomson<sup>200</sup>. En 2010, l'équipe française de M. Pucéat rapportait un prometteur essai clinique de greffe de progéniteurs cardiovasculaires dérivés d'ESC de singe dans un modèle d'infarctus du myocarde<sup>201</sup>.

Plus tard, des iPSC de singe ont été dérivées à partir de macaques rhésus<sup>202</sup>, de marmosets<sup>203</sup>, de pigtail macaques<sup>204</sup>, de singes cynomolgus<sup>205</sup> ou encore de babouins<sup>206</sup> ou de drills<sup>207</sup>. Certaines études ont d'ailleurs rapporté leur différenciation en cellules épithéliales pigmentées rétinienne<sup>208</sup>, en cellules pancréatiques productrices d'insuline<sup>209</sup>, en cellules souches hématopoïétiques capables de greffer chez la souris<sup>210</sup>, ou encore en hépatocytes<sup>211</sup>. Enfin, certains articles présentent également la transplantation de neurones dopaminergiques différenciés à partir d'iPSC de singe chez

la souris<sup>212</sup>, ou encore la transplantation autologue de progéniteurs neuronaux chez le macaque rhésus<sup>213</sup>.

## V. Intégrité génomique des hiPSC

Avant leur utilisation en thérapeutique, il est nécessaire de s'assurer de la stabilité génomique des hiPSC. Plusieurs études ont montré l'apparition de mutations dans certaines lignées hiPSC, comme rapporté dans le second essai clinique japonais précédemment évoqué, dans lequel l'une des lignées hiPSC qui devait être utilisée avait acquise des mutations au cours de la culture *in vitro* précédant l'essai<sup>178</sup>. Même si ces mutations n'auraient pas forcément provoqué d'effet secondaire indésirable, ou d'apparition de tumeur, de nombreuses équipes se penchent actuellement sur l'étude de l'intégrité génomique de ces cellules, ainsi que sur le développement de techniques permettant de la réduire.

La première méthode utilisée pour détecter des modifications caryotypiques comme des translocations ou des larges inversions est le Giemsa (G)-banding<sup>214,215</sup>, qui permet de marquer les chromosomes en métaphase. Pour les études de plus haute résolution, on utilise des puces d'hybridation génomique comparative<sup>216</sup> (CGH-arrays de l'anglais Comparative Genomic Hybridization-arrays) permettant d'analyser les variations du nombre de copies dans l'ADN (CNV pour Copy Number Variation) comme des duplications ou des délétions ; ou encore des Single Nucleotide Polymorphism-arrays<sup>217</sup> (SNP). Cependant, ces dernières techniques ne permettent pas de détecter des inversions ou des translocations, à la différence du G-banding. En 2005, le séquençage haut débit (HTS pour High-Throughput Sequencing, ou NGS pour Next-Generation Sequencing) a permis à la fois de détecter des variations génétiques à l'échelle nucléotidique<sup>218</sup>, mais aussi des variations peu fréquentes qui ne pouvaient pas être détectées jusqu'alors<sup>219</sup>.

### A. Anomalies caryotypiques récurrentes dans les hiPSC

Les premières études rapportant des anomalies génomiques dans les hiPSC ont été publiées en 2010<sup>220</sup>. Dans l'étude de Mayshar et *al.*, plusieurs lignées hiPSC et hESC ont été analysées et des anomalies récurrentes ont été rapportées, comme une trisomie du chromosome 12 par exemple. La présence sur ce chromosome de gènes impliqués dans le cycle cellulaire ainsi que du gène *NANOG*, pourrait donner un avantage sélectif aux cellules atteintes de cette trisomie. Les auteurs de cette étude ont par ailleurs également rapporté un gain de la région 12p après une culture prolongée des cellules. D'autres anomalies récurrentes ont été détectées, comme sur les chromosomes 8 et X<sup>221,222</sup>. De façon intéressante, un grand nombre de mutations observées dans les hiPSC ont également été rapportées dans les hESC, comme les trisomies des chromosomes 12, 17 ou X, ou des amplifications de locus spécifiques comme le 12p, 17q ou le 20q11.21<sup>223</sup>. Tout comme pour la région 12p, l'amplification de ces régions peut apporter un avantage sélectif aux cellules, les gènes *SURVIVIN* ou *STAT3* impliqués dans l'auto-renouvellement étant situés dans la région 17q, et le gène *DNMT3b* codant une méthyltransférase fortement exprimée dans les cellules souches pluripotentes (en anglais PSC pour Pluripotent Stem Cells) situé au niveau du locus 20q11.21. Ces modifications génomiques ne sont en revanche pas retrouvées dans des échantillons de cellules somatiques, et sont caractéristiques de lignées de cellules humaines pluripotentes *in vitro*<sup>224</sup>.

## B. Insertions ou délétions chromosomiques

La première étude des CNV dans les hiPSC a été réalisée en 2009 par l'équipe de Chin et *al.*, par la technique du CGH array<sup>225</sup>. Les auteurs ont montré la présence de CNV dans chaque lignée hiPSC étudiée, mais aucune de ces modifications n'était partagée par l'ensemble des cellules. Plus tard, l'équipe de Hussein et *al.* a montré que le nombre moyen de CNV dans les hiPSC (109) était deux fois plus élevé que dans les hESC (55) ou dans les fibroblastes analysés (53)<sup>226</sup>. Les auteurs ont montré la présence d'un grand nombre de CNV dans les hiPSC à bas passage, majoritairement des délétions, diminuant au cours des passages en culture<sup>226,224</sup>. Une étude a d'ailleurs montré qu'au moins la moitié de ces CNV était dûe à un mosaïcisme dans les fibroblastes utilisés pour la reprogrammation<sup>227</sup>. La réduction du nombre de CNV au cours des passages en culture peut s'expliquer par un mécanisme de réparation de l'ADN, ou par une sélection des cellules les moins touchées par ces CNV. Les résultats obtenus dans les études évoquées précédemment<sup>226,224</sup> ont montré que la sélection peut s'effectuer à la fois contre certains CNV mais aussi pour en favoriser d'autres, avec la présence de délétions de gènes suppresseurs de tumeurs à faible passage et des duplications d'oncogènes à passage tardif.

## C. Mutations ponctuelles

L'analyse des SNP dans les hiPSC a été réalisée par NGS et a permis d'identifier en moyenne 10 mutations dans des régions codantes du génome dans chaque lignée hiPSC obtenue<sup>228,229,230</sup>. Ces différentes études sont basées sur le séquençage de l'exome de plusieurs lignées d'hiPSC provenant de différents laboratoires et ayant été reprogrammées par des techniques différentes, ainsi que sur des échantillons de fibroblastes utilisés pour les reprogrammations. Des résultats similaires ont d'ailleurs été obtenus sur des iPSC de souris<sup>231</sup>. Jusqu'à ce jour cependant, aucune de ces mutations ponctuelles ne s'est avérée récurrente dans des lignées d'hiPSC dérivées de différents échantillons de cellules somatiques.

L'apparition de ces mutations ponctuelles peut s'expliquer par trois hypothèses : (i) ces mutations étaient déjà présentes dans les cellules somatiques utilisées pour la reprogrammation, (ii) ces mutations ont lieu au cours de la reprogrammation ou (iii) celles-ci apparaissent au cours des différents passages en culture. Certaines études ont en effet montré qu'une partie de ces mutations ponctuelles étaient préexistantes dans certaines cellules somatiques utilisées pour la reprogrammation<sup>227,232,228</sup>. De plus, une étude menée sur des iPSC de souris a montré que 157 SNP étaient partagés par 4 clones iPSC obtenus à partir des mêmes fibroblastes de départ, ce qui confirmerait la première hypothèse évoquée<sup>231</sup>. Le potentiel rôle de ces mutations préexistantes comme avantage sélectif dans la reprogrammation ou la prolifération des iPSC reste encore à déterminer. L'étude menée par Ji et *al.*<sup>233</sup> appuie en revanche la seconde hypothèse, à savoir l'apparition de ces mutations ponctuelles au cours de la reprogrammation (75% d'entre elles selon les auteurs). Ces résultats sont d'ailleurs confirmés par une autre étude, au cours de laquelle des iPSC ont été reprogrammées à partir de MEF directement prélevés d'un embryon de souris, afin de minimiser le nombre de mutations présentes dans la population de cellules de départ<sup>234</sup>. Les auteurs rapportent l'apparition de plus de 120 mutations ponctuelles dans 3 clones iPSC obtenus avec des méthodes de reprogrammation différentes, dès les premières divisions cellulaires post-reprogrammation. Enfin, l'étude de Gore et *al.*<sup>228</sup> défend pour sa part la troisième hypothèse, en

décrivant l'apparition de 4 mutations ponctuelles supplémentaires dans une lignée de hiPSC après 40 passages en culture, comme également décrit dans la culture à long terme d'autres types cellulaires.

Les raisons de l'apparition de ces mutations n'étant pas encore élucidées, les hypothèses précédemment présentées ne sont bien sûr ni exhaustives ni exclusives, et une combinaison de plusieurs d'entre elles pourraient être à l'origine de ce phénomène.

#### D. Impact des paramètres de la reprogrammation sur l'intégrité génomique des iPSC

Plusieurs paramètres peuvent avoir un impact sur la stabilité génomique des hiPSC, comme par exemple les cellules utilisées pour la reprogrammation, la méthode de reprogrammation choisie ou encore les facteurs de reprogrammation.

Les premières expériences de reprogrammation ont été réalisées sur des fibroblastes de peau, principalement pour leur facilité d'obtention par simple biopsie et pour leur facilité de culture *in vitro*. Cependant, notre peau est soumise à de nombreuses agressions par notre environnement, comme par exemple les rayons UV, qui peuvent provoquer une accumulation de mutations dans les fibroblastes<sup>235</sup>, qui se retrouveront donc dans les hiPSC obtenues. Une étude publiée en 2013 a cependant montré, en analysant les CNV par puce Affymetrix dans 8 lignées d'hiPSC dérivées à partir de 5 types cellulaires différents, que les mutations dans les régions codantes du génome étaient dues au mécanisme de la reprogrammation des hiPSC mais indépendantes du type de cellules de départ utilisées<sup>230</sup>. En plus du type cellulaire, il est important de prendre en compte l'âge du patient à partir duquel les iPSC sont reprogrammées. En effet, plus le patient sera âgé et plus ses cellules auront accumulé de mutations<sup>236</sup>. Certaines études ont d'ailleurs montré dans des cellules de la peau<sup>237</sup>, ou du sang<sup>238</sup>, que les cellules d'un patient sain mais âgé présentaient autant de mutations que des cellules cancéreuses.

Selon une étude publiée en 2011 portant sur plusieurs lignées de hiPSC reprogrammées avec différentes méthodes, il n'y a pas de corrélation directe entre la méthode de reprogrammation et le nombre de CNV dans les hiPSC obtenues<sup>226</sup>, observation que nous avons nous-même confirmée dans une étude réalisée sur plusieurs clones hiPSC reprogrammés au laboratoire par deux méthodes intégratives et non intégratives<sup>239</sup>. Plus récemment, en 2016, l'équipe de Bhutani a confirmé ces résultats en comparant 3 méthodes de reprogrammation différentes, à savoir les vecteurs rétroviraux, les virus Sendai et les ARNm<sup>240</sup>. En revanche, l'étude de Sugiura et *al.* montre que les iPSC reprogrammées avec des vecteurs rétroviraux présentent deux fois plus de mutations que celles obtenues avec des méthode non-intégratives<sup>234</sup>. L'équipe de Cheng et *al.* a d'ailleurs publié des résultats allant dans ce sens et montre, par séquençage du génome de 3 lignées hiPSC reprogrammées par une méthode non-intégrative, l'apparition de seulement 6 à 12 SNV dans des régions codantes du génome, dont 50% sont des mutations silencieuses<sup>232</sup>.

Il a également été montré que les facteurs de reprogrammation les plus souvent utilisés peuvent avoir des conséquences sur l'intégrité génomique et ont parfois été associés au développement de cancer comme OCT4<sup>241</sup>, SOX2<sup>242</sup>, KLF4<sup>243</sup>, c-MYC<sup>244</sup>, NANOG<sup>245</sup> ou encore LIN28<sup>246</sup>. De nombreuses équipes ont alors développé des protocoles de différenciation en réduisant le nombre de facteurs de reprogrammation par exemple<sup>135,137,247</sup> ou en les remplaçant par de petites molécules<sup>248</sup>.

## Chapitre 3 : Différenciation dirigée des cellules souches en hépatocytes

Les propriétés exceptionnelles des cellules souches pluripotentes évoquées dans le chapitre précédent ont amené de nombreuses équipes à développer des protocoles de différenciation guidée de ces cellules en différents types cellulaires. Nous n'évoquerons dans ce chapitre que la différenciation guidée des cellules souches pluripotentes (CSP) en hépatocytes. Celle-ci est basée sur l'utilisation de matrices, de milieux de culture et de cytokines utilisés pour mimer les différentes étapes du développement embryonnaire du foie. Nous aborderons donc dans la première partie de ce chapitre les principales étapes du développement embryonnaire du foie, avant de faire un tour d'horizon des différents protocoles de différenciation en hépatocytes développés jusqu'à ce jour.

### I. Développement embryonnaire du foie

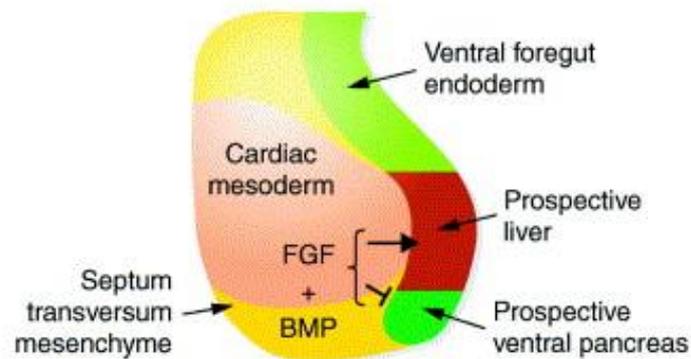
Comme évoqué précédemment, le foie est un organe complexe composé de plusieurs types cellulaires dont les propriétés et l'organisation spatiale permettent d'assurer les nombreuses fonctions de l'organe. Dans ce paragraphe, nous nous intéresserons au développement embryonnaire du foie, et plus particulièrement aux différentes étapes menant à la formation et l'organisation des hépatocytes.

#### A. L'endoderme : première étape de la voie hépatique

Après la fécondation, la segmentation permet la division de l'œuf fécondé en cellules non différenciées appelées blastomères. L'étape suivante, la gastrulation, permet le remaniement de ces blastomères et la formation d'une structure appelée ligne primitive, à partir de laquelle se formeront les trois feuillets embryonnaires : l'endoderme, le mésoderme et l'ectoderme. Chacun de ces feuillets donnera par la suite naissance à des cellules différenciées spécifiques : l'ectoderme, feuillet externe de l'embryon, donnera naissance à l'épiderme et au système nerveux ; et le mésoderme, le feuillet intermédiaire, aux tissus conjonctifs comme les os ou le derme ainsi que les tissus musculaires. Enfin, l'endoderme, feuillet interne de l'embryon, donnera naissance au tissu épithélial qui tapisse le tube digestif ou les voies respiratoires, et également à certains organes comme le pancréas et le foie.

Dans les années 1970, des expériences menées par Nicole Le Douarin sur l'embryon de poulet mirent en lumière l'origine endodermique des cellules du parenchyme hépatique<sup>249</sup>. Par la suite, de nombreuses études chez la souris ont permis de mieux comprendre les nombreux mécanismes et signaux responsables du développement du foie. Ainsi, des expériences de traçage cellulaire des cellules de l'endoderme dans un embryon de souris ont permis de localiser les cellules donnant naissance au foie dans la partie ventrale de l'endoderme<sup>250</sup>. Cette partie est localisée près du mésoderme cardiaque et du mésenchyme. Cette localisation des cellules dans l'espace leur permet de recevoir des signaux de différentes natures (fig.11), qui vont à la fois avoir un rôle dans le devenir de ces cellules, mais aussi dans leur organisation spatiale<sup>251</sup>. Ainsi, la présence de cellules du mésoderme cardiaque permettra la libération de signaux de la famille des FGF (Fibroblast Growth Factor) 1 et 2. Une étude dans des explants d'endoderme antérieur de souris a montré que la présence de ces facteurs permettait d'induire l'expression d'albumine<sup>252,253</sup>, sécrétée par le foie. Il a de plus été montré que la réponse à ces signaux FGF était dépendante de la concentration,

démontrant l'importance de la position de l'endoderme par rapport au cœur (source majoritaire de FGF)<sup>254,255</sup>. La présence du septum transversum proche de l'endoderme permet quant à elle la sécrétion des facteurs BMP2 et BMP4 (Bone Morphological Protein 2 et 4) ainsi que le facteur de transcription GATA4. Ce dernier régule l'expression de BMP4, fortement exprimé dans le septum transversum et nécessaire à la spécification hépatique, comme montré dans une expérience chez la souris<sup>256</sup>.



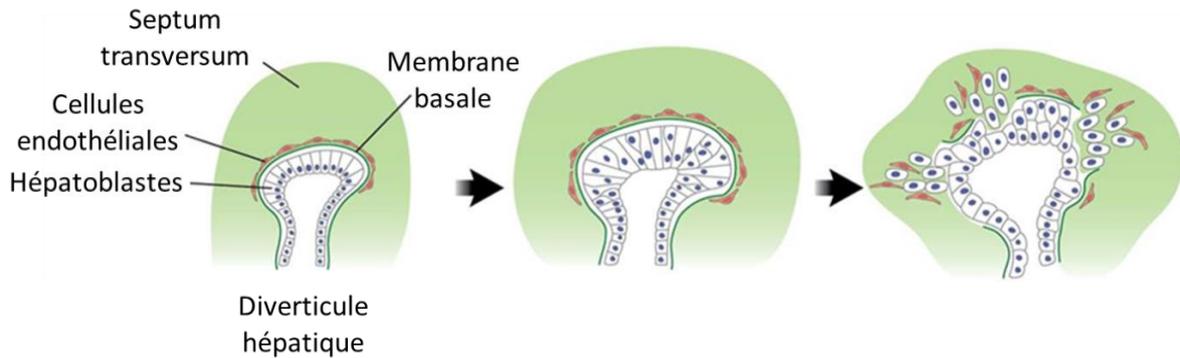
**Figure 11:** Induction de l'hépatogenèse par les signaux BMP et FGF (Zaret et al. - *Curr Opin Genet Dev* - 2001)

De nombreux autres signaux ont également un rôle important dans le développement embryonnaire du foie, comme par exemple la voie du TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ) qui restreint la spécification de l'endoderme vers la voie hépatique uniquement dans les premiers stades de développement<sup>257</sup>.

Le rôle de la voie Wnt/ $\beta$ caténine a été décrit à plusieurs stades du développement. A des stades précoces, il a été montré chez la grenouille, ainsi que dans un modèle *in vitro* utilisant des cellules embryonnaires de souris, que Wnt réprimait l'expression de Hhex (un régulateur du développement hépatique) et donc que la répression de la voie Wnt était nécessaire pour le devenir hépatique de l'endoderme<sup>258,259</sup>. Une étude sur le zebrafish<sup>260</sup> a montré qu'après la spécification de l'endoderme, la voie Wnt/ $\beta$ caténine jouait un rôle dans le développement du bourgeon hépatique mis en évidence par les problèmes de spécification hépatique chez les mutants *prt*, homologue de Wnt2b.

#### B. Formation du bourgeon hépatique et migration des hépatoblastes

La spécification hépatique de l'endoderme aboutit à la formation d'un bourgeon hépatique, au jour embryonnaire 9 chez la souris et 24 du développement chez l'homme. La formation de ce bourgeon est rendue possible par la migration des cellules de l'endoderme spécifié qui vont alors former un épithélium pluristratifié (fig.12). Une étude sur des embryons de souris *Hhex*<sup>-/-</sup> a permis de montrer le rôle de ce régulateur dans le développement du bourgeon hépatique, dont l'absence permet une initiation de la spécification de l'endoderme mais une morphogenèse incomplète du bourgeon hépatique<sup>251</sup>.



**Figure 12:** Formation du bourgeon hépatique et migration des hépatoblastes (Lemaigre et al. – *Gastroenterology* – 2009)

La migration des cellules de l'endoderme spécifié est régulée par plusieurs facteurs, comme *Gata6*<sup>261</sup>, ou encore *Prox-1*, dont l'absence dans des embryons de souris entraîne une accumulation d'hépatoblastes dans le bourgeon hépatique<sup>262</sup>. Des résultats similaires obtenus dans des embryons de souris déficients en *Hnf6* (appelé aussi *oncut-1* pour *Hnf6α* et *oncut-2* pour *Hnf6β*)<sup>263</sup>, ainsi que des études *in vitro* sur le rôle des MMP (Matrix Metallo-Proteases) dans la formation du bourgeon hépatique<sup>264</sup> ont permis de mettre en évidence un réseau de gènes impliqués dans la migration des cellules.

La formation de ce bourgeon est également contrôlée par l'expression de *Gata6* ou encore *Gata4*<sup>265</sup>, un facteur de transcription à doigts de zinc exprimé dans le septum transversum grâce à la voie *Activine/Nodal* et responsable de la décompaction de la chromatine<sup>266</sup> permettant à l'endoderme de répondre au stimuli du mésenchyme<sup>256,267</sup>.

Certains facteurs de transcription comme *FoxA* (Forkhead box proteins A) ont également un rôle très important dans cette étape, mis en évidence par l'absence de bourgeon hépatique dans des embryons de souris *FoxA1*<sup>-/-</sup> et *FoxA2*<sup>-/-268</sup>. Il a de plus été montré chez la souris que *FoxA* avait un rôle répresseur de l'albumine, marqueur des cellules hépatiques<sup>269</sup>, durant les stades précoces du développement<sup>270</sup>. Présent à ce stade en grande quantité, *FoxA* se fixe sur le promoteur de l'albumine, réprimant ainsi sa synthèse. Plus tard, la diminution en *FoxA* permettra la « libération » de ce promoteur et donc la synthèse de la protéine.

De plus, l'absence d'expression de marqueurs de cellules progénitrices du parenchyme dans le bourgeon hépatique d'embryon de souris *Hnf1b*<sup>-/-271</sup> a permis de montrer l'importance de ce facteur de transcription dans la spécification hépatique.

### C. Bipotence et prolifération des hépatoblastes

Après leur migration dans le septum transversum, les hépatoblastes continuent de proliférer afin de permettre une croissance du bourgeon hépatique. Cette prolifération est contrôlée et régulée par de nombreux facteurs. Parmi eux, le HGF (Hepatocyte Growth Factor), exprimé par les cellules mésenchymateuses du septum transversum, les cellules endothéliales et les hépatoblastes, et dont la fixation sur son récepteur *c-Met* entraîne une cascade de signalisation complexe médiée par

SEK1/MKK4<sup>272</sup> et c-JUN<sup>273</sup>. La voie TGF $\beta$  - Smad2/Smad3 permet également une stimulation de la prolifération mise en évidence par un arrêt du développement du foie chez les souris portant une mutation sur une copie de Smad2 et Smad3<sup>274</sup>. Ces deux voies (HGF et TGF $\beta$ ) interagissent d'ailleurs au niveau de l'intégrine  $\beta$ 1<sup>275</sup>. Un autre facteur impliqué dans la prolifération des hépatoblastes est l'acide rétinoïque, qui agit sur l'expression de Wt1 (Wilms' tumor suppressor gene), dont l'expression est nécessaire au développement du foie, comme l'a montré une étude chez la souris<sup>276</sup>.

Les hépatoblastes migrant et proliférant dans le septum transversum sont bipotents. Ils peuvent ainsi se différencier en hépatocytes ou en cholangiocytes. Nous développerons uniquement dans le paragraphe suivant la différenciation des hépatoblastes en hépatocytes.

#### D. Différenciation des hépatoblastes en hépatocytes et maturation

La différenciation des hépatoblastes en hépatocytes est un processus régulé par de nombreux facteurs, comme Hhex dont l'absence dans les hépatoblastes entraîne une perturbation de leur différenciation en hépatocytes<sup>277</sup>. De nombreuses études chez la souris ont permis de mettre en évidence l'existence d'un réseau complexe de facteurs de transcription nécessaires à la différenciation des hépatoblastes en hépatocytes. Parmi eux se trouvent de nombreux membres de la famille des HNF (Hepatocyte Nuclear Factor) comme Hnf1 $\alpha$ , Hnf1 $\beta$ , Hnf3 $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ , Hnf4 $\alpha$  ou encore HNF6<sup>278</sup>. En effet, des expériences de knock-out de chacun des gènes codant ces facteurs ont montré, chez la souris, un effet sur la différenciation en hépatocytes. Des études menées sur le rôle de HNF4 $\alpha$  par exemple, ont montré que l'absence de ce facteur n'influe pas sur la spécification hépatique, mais qu'elle entraîne un blocage de la différenciation des progéniteurs hépatiques<sup>279</sup> ainsi qu'un problème d'architecture du foie. La prolifération des hépatocytes est également régulée par plusieurs facteurs, comme c/EBP $\alpha$  (CCAAT enhancer-binding protein), dont l'absence entraîne une augmentation de la prolifération hépatocytaire<sup>280</sup>, ou encore par la voie  $\beta$ caténine, dont l'interruption entraîne une diminution de la prolifération des hépatocytes et une augmentation de l'apoptose pendant la régénération hépatique<sup>281</sup>.

La maturation dans le parenchyme hépatique des hépatocytes dépend par la suite de leur localisation dans le lobule hépatique. Ce phénomène, appelé zonation, permet l'expression restreinte de gènes dans certaines zones du lobule et ainsi la spécialisation des fonctions des hépatocytes en fonction de leur position dans le lobule<sup>282</sup>. En effet, les hépatocytes proches de l'espace porte vont être exposés à un environnement et donc à des signaux différents de ceux proches de la veine centrolobulaire. Cette zonation est régulée par la voie Wnt/ $\beta$ caténine<sup>283,284</sup> (fig.13), qui est activée dans les hépatocytes proches de la veine centrolobulaire et entraîne ainsi l'activation de la glutamine synthétase (GS) et de CYP1A1, de la famille des cytochromes p450. La GS ainsi activée permet l'élimination de l'ammonium toxique restant dans le sang avant qu'il ne rejoigne la circulation. Dans les hépatocytes périportaux, en revanche, aucun signal Wnt n'activant cette voie, la  $\beta$ caténine est alors dégradée.

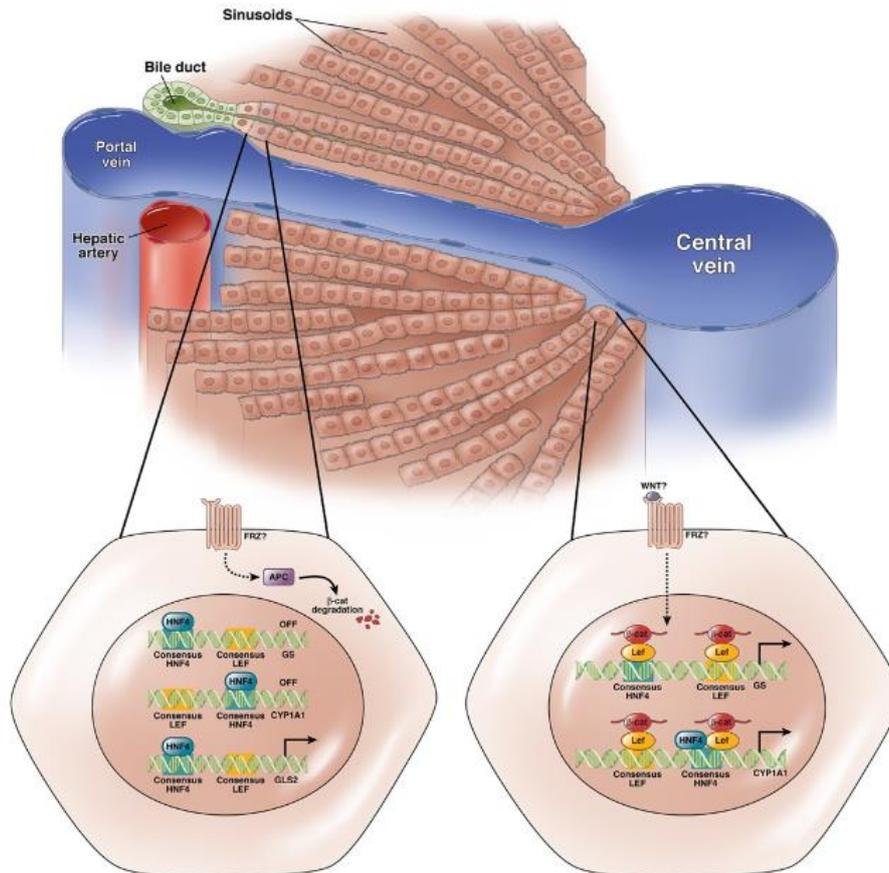


Figure 13: Impact de la zonation des hépatocytes sur leur métabolisme (Kaestner et al. – *Gastroenterology* - 2009)

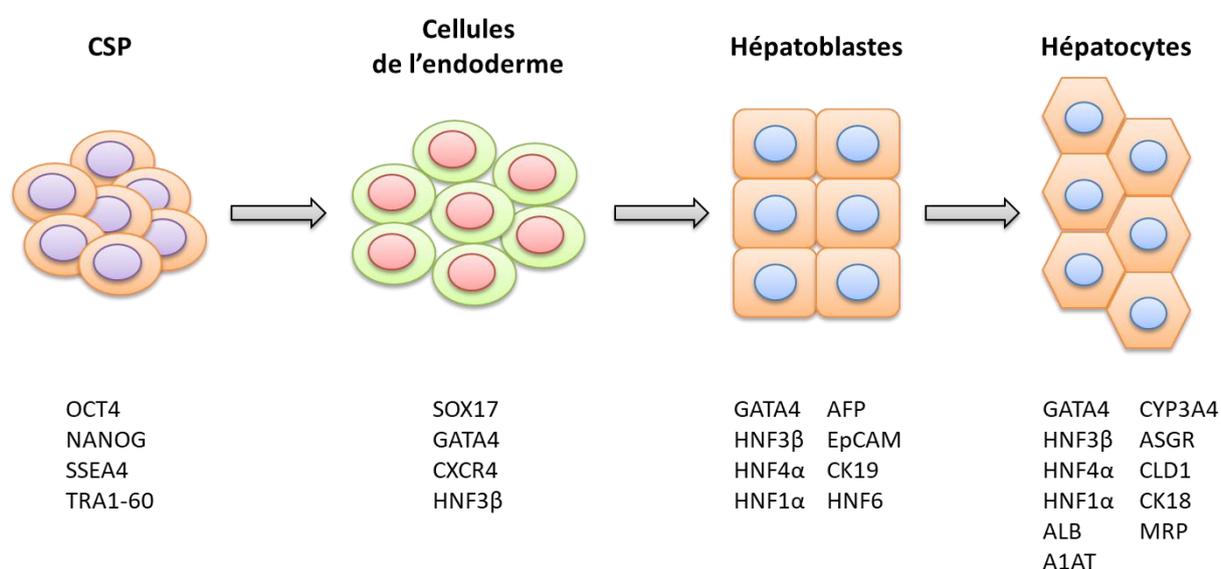
## II. Vue d'ensemble et protocoles existants

Comme nous l'avons vu précédemment, la différenciation des CSP a lieu de façon spontanée lorsque les cellules sont cultivées en agrégats appelés corps embryoides (EB, de l'anglais Embryoid Bodies) en absence de facteur d'auto-renouvellement comme LIF (Leukemia Inhibitory Factor) chez la souris ou FGF2 chez les cellules humaines.

C'est en 2002 que les travaux de Jones et al. ont montré que la culture de corps embryoides formés à partir d'ESC de souris permettait leur différenciation en hépatocytes, après 12 jours de culture<sup>285</sup>. Un an plus tard, Rambhatla et al. publiait la première différenciation de hESC en hépatocytes fonctionnels<sup>286</sup>.

Si la formation de corps embryoides permet la différenciation des CSP en cellules de l'endoderme, il en est de même pour les cellules de l'ectoderme et du mésoderme. Ainsi, la population cellulaire obtenue est très hétérogène, ce qui entraîne un très faible rendement de différenciation. L'addition de facteurs de croissance spécifiques permet d'orienter cette différenciation vers le type cellulaire choisi. Des facteurs de croissance comme l'activine ou le Wnt3a induisent par exemple une différenciation en cellules du mésendoderme<sup>287,288</sup>.

La plupart des protocoles de différenciation développés ont pour but de reproduire les premières étapes du développement embryonnaire puis de l'organogenèse du foie *in vitro*. A chacune de ces étapes, l'expression de marqueurs spécifiques par les cellules est vérifiée par RT-PCR ou RT-PCR quantitative et les protéines synthétisées par cytométrie de flux, immunofluorescence ou western blot (fig.14).



**Figure 14:** Etapes et marqueurs clés de la différenciation hépatocytaire de CSP

A. L'endoderme définitif : une étape clé

Tous les protocoles développés jusqu'à ce jour reposent sur une première étape d'activation de la voie Activine/Nodal, le plus souvent par une forte concentration en Activine A recombinante (100ng/ml), membre de la famille de TGFβ (tableau 3).

Cocktails de facteurs de croissance	Traitement
Activine A (+Sérum de Veau Foetal (SVF))	100ng/ml Activine A + 0.2% FBS <sup>289</sup> 100ng/ml Activine A + 0.5% FBS <sup>290</sup> 100ng/ml Activine A + 20% FBS <sup>291</sup>
Activine A + Wnt (+SVF)	100ng/ml Activine A + 25ng/ml Wnt3A + 0.2% FBS <sup>292,293</sup> 100ng/ml Activine A + 25ng/ml Wnt3A ou 3μM CHIR99021 + 0.2% FBS <sup>294</sup> 100ng/ml Activine A + 50ng/ml Wnt3A <sup>287</sup>
Activine A + inhibiteur de GSK3β (CHIR99021)	100ng/ml Activine A + 3μM CHIR99021 <sup>295</sup>
Activine A + BMP (±FGF)	50ng/ml Activine A + 50ng/ml BMP4 <sup>296</sup> 100ng/ml Activine A + 10ng/ml BMP4 + 20ng/ml FGF2 <sup>297</sup> 100ng/ml Activine A + 50ng/ml BMP4 + 100ng/ml FGF2 <sup>298</sup>
Activine A + BMP + FGF + inhibiteur de PI3K	100ng/ml Activine A + 10ng/ml BMP4 + 20ng/ml FGF2 + 10μM LY294002 <sup>44,299</sup>

**Tableau 3:** Liste non exhaustive des protocoles de différenciation en endoderme définitif publiés à ce jour

Pour les protocoles les plus robustes, on peut ainsi obtenir entre 80 et 90% de cellules exprimant CXCR4, un récepteur membranaire spécifique des cellules de l'endoderme. Certaines études ont montré que l'activation de la voie Wnt, en plus de la voie Activine/Nodal, durant les premiers jours permettait d'augmenter l'efficacité de différenciation<sup>287</sup>. Il a été montré que le niveau d'expression de l'ARNm de WNT3A dans les hESC non différenciées était un marqueur de l'efficacité de leur différenciation en endoderme définitif<sup>300</sup>. Certains protocoles utilisent également, au tout début de la différenciation, du CHIR99021, une petite molécule inhibitrice de GSK3 $\beta$  donc activatrice de la voie Wnt/ $\beta$ caténine<sup>301,295</sup>, ou un inhibiteur de la PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) comme Ly2904002<sup>302</sup>. L'étude de Matsuno et *al.* montre d'ailleurs l'importance du choix des conditions de différenciation afin de sélectionner dès les premiers jours la population cellulaire la plus appropriée pour la suite de la différenciation<sup>295</sup>.

Parmi les marqueurs les plus utilisés pour la caractérisation des cellules de l'endoderme définitif, on peut citer, outre CXCR4, SOX17, HNF3 $\beta$  ou encore GATA4<sup>289,287,45,303</sup>.

### B. Obtention et amplification des hépatoblastes

Plusieurs approches ont été développées afin de spécifier l'endoderme définitif vers le lignage hépatique. La plupart des protocoles utilisent des membres de la famille des BMP, sécrétés par le septum transversum au cours du développement embryonnaire, ainsi que du FGF2 à forte concentration, sécrété par le cœur en développement. L'ajout de certaines molécules comme l'acide rétinoïque par exemple a également été testé et semble améliorer la différenciation vers le lignage hépatique *in vitro*<sup>44</sup> et *in vivo*<sup>304</sup>. Son utilisation est cependant discutée dans d'autres papiers montrant des résultats différents<sup>299,305</sup>. L'ajout de DMSO a également été rapporté, mais il semblerait que si son utilisation dans certaines conditions améliore l'efficacité de différenciation, son action ne soit pas spécifique du lignage hépatique<sup>306</sup>. De plus, l'ajout à ce stade de la différenciation d'un inhibiteur de la voie TGF $\beta$  comme le SB431542, ou d'un inhibiteur de la voie Wnt/ $\beta$ caténine comme IWR-1 semble également améliorer l'efficacité de la différenciation<sup>299</sup>. Les protocoles les plus robustes permettent d'obtenir jusqu'à 90% de cellules exprimant l'AFP (Alpha-Foetoprotéine), la forme fœtale de l'albumine.

Enfin, l'étude de Touboul et *al.* de 2016 a montré que l'ajout d'une étape de prolifération des hépatoblastes, par l'inhibition de la voie TGF $\beta$  combinée à l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ caténine, avant leur différenciation en hépatocytes permettait d'améliorer la qualité de cette dernière<sup>299</sup>. La nécessité de cette étape n'est en soit pas nouvelle, elle correspond dans d'autres protocoles au passage réalisé autour du 10<sup>e</sup> jour de différenciation. L'induction du stimulus de prolifération par l'ajout de molécules chimiques présente cependant l'avantage de ne pas « stresser » les cellules ou de les détériorer lors de leur détachement mécanique ou enzymatique, qui peut entraîner une variabilité dans les expériences.

### C. Différenciation hépatocytaire et maturation des hépatocytes

La dernière étape du protocole consiste à différencier les progéniteurs bipotents que sont les hépatoblastes vers la voie hépatocytaire, et non cholangiocytaire, (les cholangiocytes étant les cellules qui bordent les voies biliaires), puis de permettre leur maturation. La différenciation des

hépatoblastes est régulée par deux voies centrales : la voie Notch<sup>307</sup> et la voie TGFβ<sup>308</sup>. Ainsi, l'activation de ces voies dirigera les hépatoblastes vers une différenciation en cholangiocytes, alors que leur inhibition entraînera la différenciation des cellules en hépatocytes. Ainsi, si les protocoles publiés jusqu'à ce jour utilisent plusieurs cocktails de facteurs de croissance, dont les cytokines les plus communément utilisées sont le HGF et l'oncostatine M, des études ont également montré l'amélioration de la différenciation par l'utilisation d'inhibiteurs de la voie Notch, comme le composé E<sup>299</sup>, ou d'inhibiteurs de la voie TGFβ comme le SB431542<sup>299,309</sup>. L'utilisation de SB431542 peut cependant également entraîner une prolifération des hépatoblastes non différenciés, comme nous l'avons vu précédemment, pouvant potentiellement entraîner l'apparition d'une population hétérogène composée d'hépatocytes et d'hépatoblastes.

Les cellules différenciées expriment des marqueurs hépatocytaires comme HNF4α, l'albumine, l'A1AT (Alpha-1-anti-trypsin), et CYP3A7. Une étude fonctionnelle de ces cellules est primordiale pour s'assurer de leur bonne différenciation. Parmi les fonctions les plus étudiées, on peut citer les fonctions de synthèse de l'albumine, ou les fonctions liées au métabolisme énergétique comme le stockage du glycogène évalué par une coloration PAS (Periodic Acid Schiff), ou encore les fonctions de détoxification comme l'induction des cytochromes P450 par différents agents comme la Rifampicine ou l'Oméprazole<sup>310</sup>.

Si de nombreuses équipes travaillent actuellement à l'amélioration des conditions de différenciation hépatocytaire, toutes s'accordent à dire que les hépatocytes obtenus après différenciation de CSP ressemblent davantage à des hépatocytes fœtaux ou nouveau-nés qu'adultes. En effet, les cellules différenciées présentent toujours des niveaux de marqueurs hépatocytaires inférieurs à ceux mesurés dans les hépatocytes adultes<sup>311</sup>. Ce manque de différenciation et de maturation des cellules en culture peut s'expliquer par le fait que les fonctions des hépatocytes nécessitent une organisation spatiale bien définie et des interactions avec les autres types cellulaires présents dans le foie, comme nous l'avons vu dans le chapitre 1. Une culture en monocouche au fond d'une boîte de culture n'est donc pas très représentative des conditions physiologiques. Pour pallier ce problème, certaines équipes développent des approches de co-culture, ou de culture en 3 dimensions.

### **III. Amélioration des protocoles « standard » de différenciation hépatocytaire**

La plupart des approches utilisées afin d'améliorer le protocole « standard » de différenciation hépatocytaire ont été en premier lieu développées afin d'améliorer la culture *in vitro* d'hépatocytes primaires. Nous aborderons donc ces différentes approches dans les paragraphes suivants en insistant sur leur impact sur les cellules différenciées obtenues.

#### **A. Amélioration des systèmes de culture en 2D**

##### **a. Co-culture des hépatocytes**

Comme évoqué précédemment, les hépatocytes primaires (HP) supportent très mal la culture *in vitro* au cours de laquelle on observe un rapide changement de morphologie cellulaire, ainsi que la diminution de leurs principales fonctions comme la sécrétion d'albumine ou leurs activités CYP. Des

études ont montré que la co-culture d'hépatocytes humains avec des cellules souches mésenchymateuses (MSC, pour Mesenchymal Stem Cell) permettait une amélioration de la production d'albumine et d'urée par les hépatocytes pendant 5 à 25 jours de culture, ainsi qu'une augmentation de 16% de la viabilité cellulaire<sup>312</sup>. Une autre étude a montré que la co-culture d'hépatocytes et de cellules endothéliales du foie (LSEC pour Liver Sinusoidal Endothelial Cells) permettait non seulement une stabilisation de l'activité métabolique des hépatocytes pendant 4 semaines, mais aussi une augmentation de la production d'albumine d'un facteur 10 à 15, et une activité du cytochrome CYP1A1/2 multipliée par 20<sup>313</sup>. Cet effet semble s'appliquer aussi aux cellules souches hépatiques et pluripotentes : plusieurs équipes ont également observé des résultats similaires au cours de leur protocole de différenciation hépatocytaire de hESC ou hiPSC. C'est le cas par exemple de l'étude menée par Lange et *al.* qui montre une accélération de la différenciation de cellules de foie fœtal de rat en présence de MSC de rat<sup>314</sup>. L'étude de Yu et *al.* en 2011 rapporte quant à elle la différenciation de hESC en présence de fibroblastes<sup>315</sup>. Enfin, celle de Javed et *al.* en 2014, porte sur la différenciation d'hiPSC en co-culture avec une lignée de cellules étoilées humaines (TWNT-1)<sup>316</sup>.

#### *b. Matrice extra-cellulaire*

Plusieurs études ont montré que la culture d'hépatocytes primaires humains (HPH) entre deux couches de matrice extracellulaire comme le collagène I<sup>317</sup> ou le Matrigel<sup>318</sup> permettait la formation de contacts cellule-cellule et cellule-matrice similaires à ceux observés *in vivo*<sup>319,320</sup>. Ces contacts sont très importants dans le maintien des fonctions hépatocytaires. En effet, il a été montré que les contacts cellule à cellule sont en grande partie responsables du maintien du métabolisme des xenobiotiques<sup>321</sup>, alors que les mécanismes de transport hépatiques sont dépendants en majorité de la polarisation des hépatocytes liée aux interactions cellule-matrice<sup>322</sup>.

Une étude publiée par Novik et *al.* en 2013 sur la différenciation hépatocytaire à partir de corps embryoïdes différenciés d'ESC de souris a permis de montrer que les résultats observés avec les HPH pouvaient être appliqués à la différenciation des CSP et permettre ainsi l'amélioration des protocoles établis<sup>323</sup>. Les auteurs rapportent une augmentation de l'expression de cytokératine 18 (CK18), une augmentation de la sécrétion d'albumine ainsi qu'une meilleure activité des cytochromes P450 dans les cellules entre deux couches de collagène par rapport à leur protocole « standard ».

Une autre étude a montré que l'utilisation d'un système de culture en sandwich entre deux couches de Matrigel permettait d'améliorer la différenciation des hESC en cellules de l'endoderme définitif<sup>324</sup>. Les auteurs rapportent que si le pourcentage de cellules SOX17 positives n'est pas significativement différent entre la différenciation en 2D classique et en sandwich (respectivement 37 et 44%), l'utilisation de cette double couche permet en revanche une très nette amélioration de la survie des cellules (6% de mort cellulaire dans le système de différenciation en sandwich contre 72% pour le système de différenciation « classique »).

Enfin, une étude publiée en 2015 sur la différenciation hépatocytaire d'hESC entre deux couches de collagène décrit une nette amélioration de la polarisation des hépatocytes dérivés des hESC ainsi que la formation de canalicules biliaires dans le système en sandwich<sup>325</sup>.

### c. Bio-impression

La bio-impression est l'impression en 2D ou 3D de tissus biologiques vivants. Elle consiste à déposer couche par couche, ou point par point, des cellules, des composants de la matrice extracellulaire, des facteurs de croissance ou des biomatériaux grâce à une technologie d'impression pilotée par ordinateur.

La première micro-impression d'éléments biologiques (à base de fibronectine) a été réalisée par impression jet d'encre en 1988<sup>326</sup>. 18 ans plus tard, en 2006, Boland *et al.* ont utilisé des imprimantes de bureau modifiées afin de réaliser la micro-impression de cellules<sup>327</sup>. Aujourd'hui, la société américaine Organovo commercialise des tissus de foie bio-imprimés composés d'hépatocytes, de cellules endothéliales et de cellules étoilées.

En 2013, l'équipe de Matsusaki *et al.* décrit la bio-impression de cellules d'hépatocarcinome HepG2, intercalées de couches de fibronectine-gélatine afin de permettre les interactions cellulaires<sup>328</sup>. Les auteurs rapportent une augmentation de l'activité CYP3A4 dans leur structure bio-imprimée, ainsi qu'une augmentation de la sécrétion d'albumine par les cellules. En 2015, les travaux de Faulkner *et al.* présentent la bio-impression d'hépatocytes différenciés à partir de hESC dans un hydrogel d'alginate<sup>329</sup>. Les résultats de cette étude sont cependant mitigés, puisque si les cellules bio-imprimées présentent bien des caractéristiques hépatocytaires, il semblerait que la différenciation soit retardée de plusieurs jours par rapport au système de différenciation classique. Enfin, une étude récente décrit la bio-impression d'hiPSC différenciées en hépatocytes dans un hydrogel de gélatine<sup>330</sup>. Le schéma d'impression est ici défini afin de reproduire la forme hexagonale d'un lobule hépatique. Comparativement à la différenciation en 2D, les cellules obtenues dans ce système présentent une sécrétion plus importante d'albumine ainsi qu'une plus grande production d'urée.

La bio-impression permet également de réaliser des systèmes de co-culture élaborés dans lesquels la position de chaque type cellulaire peut être contrôlée par ordinateur. On peut ainsi recréer par exemple des systèmes sandwich dans lesquels des cellules HepG2 sont imprimées entre deux couches de cellules endothéliales HUVEC<sup>328</sup>. Les résultats obtenus dans cette étude sont très encourageants, et montrent que l'impression de deux types cellulaires permet d'augmenter encore d'un facteur 4 la sécrétion d'albumine et d'un facteur 2,4 l'activité CYP3A4 par rapport à l'impression des HepG2 seules.

### d. Micro-puces

La technique des micro-puces permet de miniaturiser les systèmes traditionnels de culture, afin de réaliser des cultures cellulaires en grand nombre. Les puces sont généralement moulées dans un matériau transparent, hydrophobe et biocompatible, comme le PDMS (Polydiméthylsiloxane), que l'on peut par la suite traiter avec des polymères afin de modifier leurs propriétés de surface, comme avec du PVP (polyvinylpyrrolidone) afin de greffer des groupes hydrophiles en surface et ainsi permettre la pénétration de l'eau, ou de milieu de culture, dans les canaux de la micro-puce. Cette technique permet de nombreuses applications, comme la réalisation de modèles de co-culture de plusieurs types cellulaires, tel que le modèle neurone-peau développé pour des applications en

cosmétologie, ou encore des co-cultures de cellules de foie et de cellules endothéliales<sup>331</sup>, ou rénales<sup>332</sup> pour des applications en toxicologie.

Afin de mimer le plus fidèlement l'environnement des cellules *in vivo*, ces systèmes parfois complexes nécessitent de simuler un équivalent de la circulation sanguine afin de permettre les apports en oxygène dissous et en nutriments, ou encore l'évacuation des métabolites hépatocytaires. Ceci peut être simulé par des systèmes en microfluidique munis de vannes et de pompes miniatures<sup>333</sup>.

Cette approche a d'ailleurs été utilisée pour des cultures d'hépatocytes primaires en 2005, montrant des niveaux d'ARNm d'enzymes de phase 1 et 2 maintenus pendant 7 jours, ainsi qu'une augmentation de l'activité CYP pendant les 4 premiers jours de culture<sup>334</sup>. Une étude similaire a été réalisée en 2011, montrant une activité CYP supérieure dans les hépatocytes cultivés en micro-puce comparée à un système de culture 2D dit « classique »<sup>335</sup>.

Leclerc et coll. ont publié en 2016 une étude comparant la différenciation hépatocytaire d'iPSC humaines en 2D et dans un système de bio-puce microfluidisée<sup>336</sup>. Les auteurs ont montré une augmentation de l'activité CYP, ainsi que de nombreux marqueurs spécifiques comme l'albumine, HNF4 $\alpha$ , ou encore des acteurs de la voie de signalisation du VEGF dans le système en microfluidique. Cette étude semble indiquer que la culture des cellules en bio-puce apporte un micro-environnement spécifique favorable à la différenciation hépatocytaire, même si une augmentation des marqueurs immatures comme GATA4 et SOX17 a également été rapportée.

## B. Systèmes de culture en 3D

En plus des améliorations des systèmes 2D développés jusqu'à présent, de nombreuses études ont également porté sur la culture et la différenciation de cellules hépatocytaires en 3D. Les cellules sont dans des conditions plus proches de la situation physiologique *in vivo*. Parmi ces structures 3D, on trouve par exemple les agrégats, ou sphéroïdes, et les organoïdes.

### a. Agrégats

Comme pour les approches précédemment évoquées, les premières études sur la culture 3D ont été réalisées à partir d'hépatocytes primaires. Ainsi, plusieurs études ont montré que la culture de HP en agrégats, ou sphéroïdes, permettait de prolonger le temps de culture des cellules *in vitro* jusqu'à 5 semaines, tout en maintenant l'expression de marqueurs spécifiques comme l'albumine, ainsi qu'une activité CYP constante<sup>337</sup>. Ces agrégats ont par la suite été utilisés pour étudier le métabolisme de certains médicaments<sup>338,339</sup> ou pour étudier les interactions cellule-cellule à l'intérieur du micro-tissu formé<sup>340</sup>.

Ces agrégats ont également été utilisés dans des modèles plus complexes, couplés à des approches de bio-impression par exemple<sup>341</sup> ou encapsulés dans des hydrogels<sup>342,343</sup>.

Ces études ont permis de définir plusieurs paramètres nécessaires à la culture en 3D, comme par exemple la taille des agrégats, qui doit être inférieure à 200 $\mu$ m afin d'éviter l'apparition de zones nécrotiques liées à un manque d'oxygénation, ainsi que la compaction des agrégats, qui doit être

suffisamment forte pour permettre des interactions cellule-cellule, tout en restant suffisamment perméable afin de permettre le transport de grosses molécules.

Toutes ces observations ont permis de développer des approches de différenciation en 3D montrant que la formation d'agrégats permettait une meilleure production d'albumine ainsi qu'une plus grande activité CYP que dans les approches conventionnelles de différenciation en 2D. Ces études ont été réalisées avec des hépatocytes primaires, des cellules de la lignée HepaRG<sup>344</sup>, mais également avec des hépatocytes différenciés à partir de hESC<sup>345</sup> et de hiPSC<sup>345,346</sup>.

### *b. Organoïdes*

Si les termes sphéroïdes et organoïdes sont souvent confondus, on parle le plus souvent d'organoïde pour désigner un sphéroïde composé de plusieurs types cellulaires distincts. Cette approche permet de reconstruire des micro-organes comme des micro-cerveaux<sup>347</sup> ou des micro-foies<sup>348</sup> en associant des hépatocytes avec des cellules non parenchymateuses du foie comme des cellules endothéliales, ou des cellules de Kupffer.

Plusieurs études ont montré l'utilisation de micro-tissus hépatiques composés d'hépatocytes primaires de rat, et de cellules étoilées<sup>349,350,351</sup>. Les auteurs présentent une auto-organisation des cellules composant les organoïdes, entraînant une polarisation des cellules, la formation de canalicules biliaires, ainsi qu'une production d'albumine supérieure à celle observée dans les systèmes de culture conventionnels en 2D, maintenus pendant 5 semaines.

En 2014, Takebe et *al.* publièrent une très jolie étude, montrant la formation d'organoïdes composés de trois types cellulaires : des cellules de l'endoderme différenciées à partir d'hiPSC, des cellules endothéliales de cordon (HUVEC pour Human Umbilical Vein Endothelial Cells) ainsi que de cellules mésenchymateuses (MSC)<sup>352</sup>. Les auteurs montrent la formation, après auto-organisation des différentes populations cellulaires en 4 à 6 jours, d'un bourgeon hépatique vascularisé (fig.15). De plus, après transplantation du bourgeon hépatique formé chez la souris, les auteurs rapportent une néovascularisation permettant une connexion rapide des sphéroïdes à l'animal. Cette étude est la première à démontrer la faisabilité de transplanter des mini-foies générés à partir d'iPSC, se connectant à la vascularisation de l'animal.

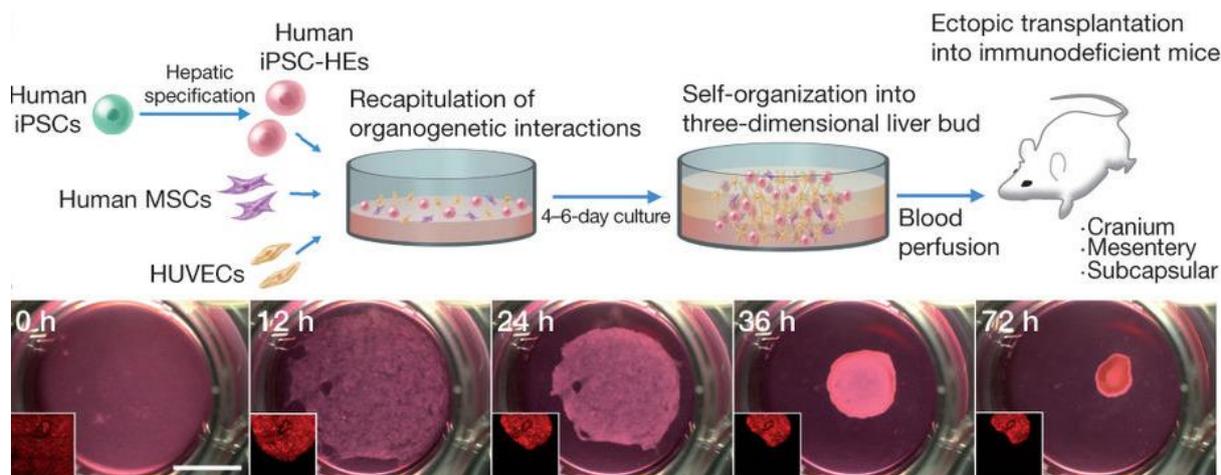


Figure 15: Génération d'un bourgeon hépatique à partir de cellules dérivées d'iPSC (Takebe - Nature - 2014)

#### IV. Utilisation des hépatocytes dérivés de CSP

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 2, les hiPSCs peuvent être utilisées dans plusieurs applications comme la thérapie cellulaire, le criblage pharmacologique, ou encore la modélisation de maladie. Ici nous reviendrons plus en détails sur certaines applications des hépatocytes différenciés à partir des CSP.

Dans le cadre de la thérapie cellulaire, il a été montré que les cellules différenciées à partir de CSP transplantées dans des foies de souris étaient capables de greffer et de poursuivre leur différenciation dans le foie de l'animal<sup>290</sup>. Plusieurs modèles animaux ont été développés afin d'augmenter la prise de greffe des cellules, comme par exemple le modèle de souris BALB/c Rag2<sup>-/-</sup>IL-2R $\gamma$ <sup>-/-</sup> NOD.sirpa uPA<sup>tg/tg</sup> (BRGS-uPA)<sup>353</sup>. Ce modèle murin présente une mort progressive des hépatocytes résidents via l'activation de l'uPA (urokinase-type plasminogen activator) sous le contrôle du promoteur *Alb*, et donc un avantage sélectif des cellules transplantées et une amélioration de la prise de greffe. La transplantation de cellules différenciées à partir de hESC a également permis de rétablir les fonctions hépatiques dans un modèle de souris intoxiquées au paracétamol, en colonisant environ 10% du foie de l'animal<sup>354</sup>.

L'obtention de cellules hépatocytaires différenciées à partir de CSP permet également de réaliser des criblages pharmacologiques afin d'évaluer les mécanismes d'action de composés médicamenteux<sup>120</sup>. Même si la plupart des hépatocytes obtenus actuellement dans les protocoles de différenciation présentent plus les caractéristiques de cellules fœtales que celles d'hépatocytes matures adultes, les améliorations évoquées dans le paragraphe précédent laissent à penser que les cellules obtenues à l'avenir feront de meilleurs modèles, même s'il faudra bien sûr s'assurer qu'elles possèdent l'ensemble des fonctions de détoxification nécessaires.

Enfin, l'obtention d'hépatocytes différenciés à partir d'iPSC spécifiques de patients atteints de maladies génétiques hépatiques a permis d'établir des modèles de ces pathologies, comme par exemple le déficit en alpha 1-antitrypsine<sup>355</sup>, l'hypercholestérolémie familiale<sup>356</sup>, ou encore la glycogénose de type Ib<sup>357</sup>. Les auteurs de ces différentes études ont montré que les hépatocytes dérivés d'iPSC reproduisaient le phénotype de la maladie à savoir l'accumulation de l'alpha 1-

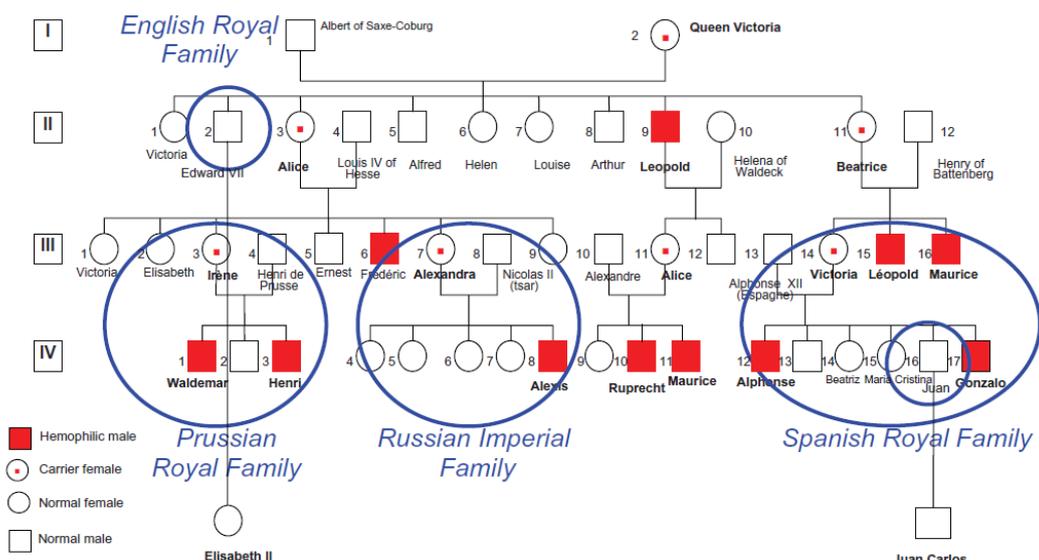
antitrypsine mutée dans le réticulum endoplasmique, le défaut d'internalisation des LDL ou l'accumulation de glycogène.

C'est dans cette optique que s'inscrit la partie de mon projet de thèse, qui consiste à modéliser puis corriger le défaut génétique de l'hémophilie B grâce aux hiPSC spécifiques d'un patient hémophile.

## Chapitre 4 : L'hémophilie B

### I. Historique de la maladie

L'hémophilie est une maladie génétique caractérisée par un défaut de la coagulation sanguine. Même si son nom ne lui avait pas encore été donné, le caractère héréditaire de la maladie a été décrit très tôt. En effet, des écrits religieux judaïques datés du II<sup>ème</sup> siècle après J.C. rapportent des cas dans lesquels la circoncision d'un jeune garçon était proscrite si deux de ses frères étaient décédés à cause de cette procédure<sup>358</sup>. La première description de l'hémophilie dans la littérature médicale moderne date de l'article du médecin américain J.C. Otto, paru dans la revue *Medical Repository* en 1803<sup>359</sup>. Dans celui-ci, il décrit une disposition hémorragique existant dans certaines familles et affectant tout particulièrement les garçons. Plus tard, en 1820, C.F. Nasse introduit la notion de transmission génétique de la maladie<sup>360</sup>. Schoenlein et son étudiant Hopff lui donneront en 1828 le nom « Haemorrhaphilia », qui deviendra finalement « Hémophilie » en 1839. Mais ce n'est qu'en 1947 que l'argentin Pavlovsky découvrit l'existence de deux hémophilies distinctes, lorsqu'il corrigea le problème de coagulation d'un patient hémophile grâce au sang d'un autre patient hémophile<sup>361</sup>. L'hémophilie a par la suite été rendue célèbre par l'intermédiaire de la reine Victoria au XIX<sup>e</sup> siècle qui, porteuse saine, a transmis cette maladie à sa descendance<sup>362</sup> (fig.16). De nombreuses familles royales européennes s'unirent aux descendants de la reine, répandant la maladie dans les familles royales prusse, russe et espagnole, donnant ainsi à l'hémophilie le nom de « maladie royale ». Certains auteurs se sont même penchés sur les potentiels liens pouvant exister entre l'état de santé des membres de ces familles royales et les faits historiques observés à l'époque. Par exemple, le tsar Nicolas II, marié à Alexandra, la petite fille de la reine Victoria, a fait appel à un certain Grigori Lefimovitch Novykh, dit Raspoutine, guérisseur spécialiste de l'hypnose, afin de soulager son fils Alexis. L'influence de ce dernier sur le tsar pourrait, selon certains, avoir entraîné l'abdication de celui-ci, la révolution russe et ainsi l'assassinat de la famille royale<sup>363</sup>. Pour d'autres, l'abdication d'Alphonse II, roi d'Espagne marié à une autre petite fille de la reine Victoria, pourrait être liée à la perte de ses deux jeunes fils atteints d'hémophilie.



**Figure 16:** Arbre généalogique de la reine Victoria montrant la transmission de l'hémophilie à travers les différentes grandes familles royales (Lannoy – *Haemophilia* - 2010)

En 1991, des analyses ADN réalisées sur des ossements découverts dans un tombeau à Iekaterinbourg en Russie permirent d'identifier les corps comme étant ceux des Romanov. C'est en 2007 que fut découverte une seconde tombe contenant les restes du corps du tsarévitch Alexis. Le séquençage des gènes *F8* et *F9*, à partir de ses ossements et de ceux de sa sœur Maria, permit de mettre en évidence la présence d'une mutation dans l'intron 3 du facteur IX de la coagulation, appelée depuis la « mutation royale », entraînant une anomalie d'épissage responsable de la sévérité de la maladie.

## II. Présentation de la maladie

L'hémophilie est donc une maladie héréditaire liée à l'X se manifestant par une anomalie de la coagulation sanguine entraînant un syndrome hémorragique. On dénombre aujourd'hui plus de 400 000 personnes souffrant de cette maladie dans le monde. Comme évoqué précédemment, il existe deux types majeurs d'hémophilie. La plus répandue, touchant 1/6 000 individus masculins, est l'hémophilie A, due à un déficit en facteur VIII (FVIII) de la coagulation. L'hémophilie B, plus rare, touche en moyenne 1/30 000 individus masculins et est due à un défaut d'activité du facteur IX (FIX) de la coagulation<sup>364</sup>. Nous nous concentrerons par la suite sur l'hémophilie de type B.

### A. Génétique de l'hémophilie

L'hémophilie B est causée par une mutation dans le gène *F9*, codant pour le FIX, situé sur le bras long du chromosome X (Xq27). Du fait de sa localisation, les femmes ne sont généralement pas atteintes, sauf dans de rares cas de biais d'inactivation du chromosome X par exemple, et elles ne représentent que 3,2% des patients hémophiles B dans le monde<sup>365,366</sup>.

Le gène *F9* a été cloné en 1982<sup>367</sup>, permettant ainsi une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine de la maladie. Il est composé de 8 exons et 7 introns et mesure 33.5kb<sup>368</sup>. Plus de 1 000 mutations de ce gène ont été enregistrées dans une base de données internationale ([www.factorix.com](http://www.factorix.com)) regroupant les données de plus de 3 700 patients. La plupart des patients ont hérité de la mutation transmise par l'un des parents. Cependant, dans 30% des cas, la mutation apparaît *de novo*. Ces mutations ont été répertoriées dans toutes les régions du gène mais il semblerait qu'il existe des sites plus fréquemment mutés que d'autres<sup>369</sup>. 64% des mutations sont des mutations ponctuelles dont les 2/3 sont des mutations faux-sens et 16% des mutations répertoriées sont des délétions plus larges. Les mutations comme les polymorphismes, les insertions ou les duplications sont des mutations bien moins fréquentes<sup>370</sup>.

### B. Symptômes et gravité de la maladie

On distingue cliniquement 3 types d'hémophilie B selon le degré de sévérité de la maladie, inversement proportionnel au pourcentage d'activité résiduelle du FIX chez ces patients. Ainsi, par rapport à un individu non hémophile dont l'activité du FIX est de 100%, on distingue :

- L'hémophilie B sévère (taux FIX < 1%), qui se manifeste dès l'enfance et provoque des saignements spontanés intracrâniens et abdominaux, qui peuvent mettre la vie des patients

en danger, et articulaires qui peuvent à long terme provoquer des arthropathies très invalidantes. Cette forme touche près de 60% des patients.

- L'hémophilie B modérée ( $1\% < \text{taux FIX} < 5\%$ ), souvent diagnostiquée plus tardivement dont les saignements sont rarement spontanés mais apparaissent le plus souvent après un traumatisme ou une intervention chirurgicale.
- L'hémophilie B mineure ( $5\% < \text{taux FIX} < 40\%$ ), dont les saignements sont provoqués uniquement par un accident grave ou une intervention chirurgicale.

### III. Le rôle du facteur IX

Afin de comprendre le rôle du facteur IX dans l'hémophilie B, il est nécessaire d'évoquer le processus de l'hémostase.

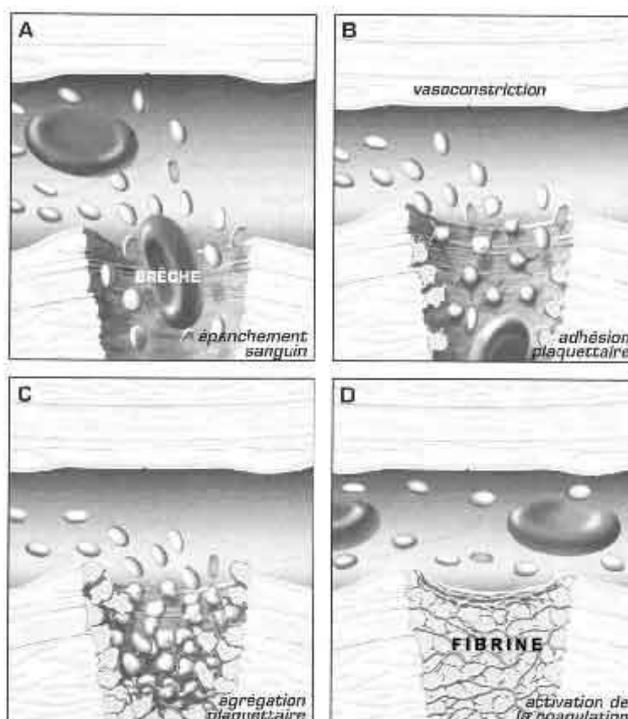
#### A. L'hémostase et la coagulation

L'hémostase est l'ensemble des mécanismes permettant d'interrompre un saignement lors d'une blessure vasculaire.

Elle est composée de 2 étapes : l'hémostase primaire et la coagulation.

##### *a. L'hémostase primaire*

Immédiatement déclenchée lors d'une blessure vasculaire, elle permet de combler la brèche vasculaire par un clou plaquettaire, appelé également « thrombus blanc », et d'arrêter les hémorragies ou au moins de réduire le flux sanguin par vasoconstriction localisée (fig.17). Elle fait intervenir les cellules endothéliales, qui tapissent l'ensemble des vaisseaux sanguins et produisent le facteur Von Willebrand, qui va agir comme un ciment afin de fixer les plaquettes, qui dès leur sortie du vaisseau au niveau de la brèche vasculaire, vont s'activer et adhérer, formant une première couche monocellulaire. D'autres plaquettes vont ensuite venir se fixer sur cette monocouche, grâce au fibrinogène, qui établit un pont entre ces plaquettes. C'est ce qu'on appelle l'agrégation plaquettaire et qui conduit à la formation d'un premier thrombus fragile, le clou plaquettaire. Celui-ci va ensuite se solidifier en caillot insoluble grâce à la transformation du fibrinogène en fibrine, qui résulte de l'activation de la cascade de la coagulation.



**Figure 17:** Formation du clou plaquettaire (B. Boneu, J-P. Cazenave - *Introduction à l'étude de l'Hémostase et de la thrombose* - 1997)

### b. La coagulation

La deuxième étape de l'hémostase, appelée coagulation, permet la transformation du fibrinogène soluble dans le plasma en fibrine insoluble qui va consolider le caillot formé lors de l'hémostase primaire. La coagulation est une cascade de réactions enzymatiques complexes permettant l'activation de proenzymes inactifs circulant dans le plasma, appelés facteurs de coagulation (comme le facteur IX), en enzymes activés (facteur IXa) (tableau 4).

N° Facteur	Nom	Particularité	Demi-vie
Facteur I	Fibrinogène	Absent du sérum	4-6 jours
Facteur II	Prothrombine	Vit K dépendant	3-4 jours
Facteur V	Proaccélérine	Absent du sérum	12-36 h
Facteur VII	Proconvertine	Vit K dépendant	4-6 h
Facteur VIII	Anti-hémoph A	Absent du sérum	10-16 h
<b>Facteur IX</b>	<b>Anti-hémoph B</b>	<b>Vit K dépendant</b>	<b>24 h</b>
Facteur X	Stuart	Vit K dépendant	1-2 jours
Facteur XI	Rosenthal		
Facteur XII	Hageman		
Facteur XIII	Stabilisant fibrine		

Tableau 4: les facteurs de coagulation

Tous les facteurs de coagulation, à l'exception du facteur VIII, sont synthétisés par les hépatocytes dans le foie. De plus, la maturation de certains de ces facteurs nécessite la présence de vitamine K. Ils sont alors appelés facteurs « vitamine K-dépendants ».

Il existe deux voies de la coagulation *in vitro* : la voie intrinsèque et la voie extrinsèque qui se rejoignent au niveau de l'activation du facteur X (fig.18).

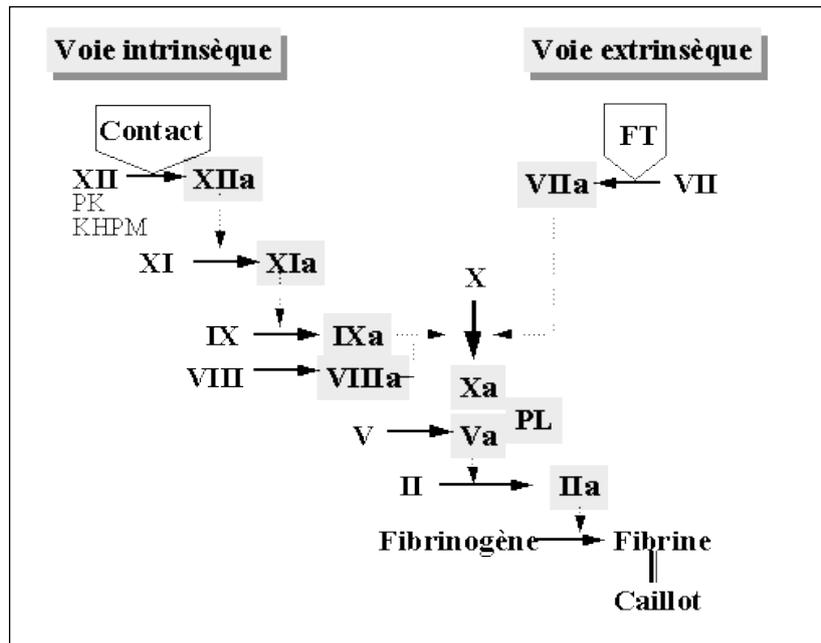


Figure 18: Schéma d'activation de la coagulation *in vitro*

La voie intrinsèque est la voie dans laquelle tous les éléments nécessaires à la coagulation sont présents dans le sang, sans apport extérieur.

La voie appelée extrinsèque nécessite la présence d'éléments tissulaires appelés facteur tissulaire (FT), un récepteur glycoprotéique transmembranaire présent dans les couches subendothéliales des vaisseaux sanguins<sup>371</sup>. Lors d'une brèche vasculaire causée par une blessure, le FT, exprimé au niveau des cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire et des fibroblastes, entre en contact avec le sang et active le facteur VII circulant (FVIIa)<sup>372</sup>. En fonction de la quantité de FT présent, le complexe FT-FVIIa pourra ensuite activer directement, ou indirectement via l'activation du FIX, le FX qui formera le complexe FVIIIa-FIXa, activateur du FX. La formation du complexe FXa-FVa activera à son tour le FII (prothrombine) en FIIa, appelé thrombine. En plus de son rôle dans la transformation du fibrinogène en fibrine, la thrombine entretient et renforce également son activation en favorisant la production de FVIIIa, FVa et FXIa (fig.19). Elle a enfin un rôle régulateur sur le FXIII permettant la stabilisation du caillot formé.

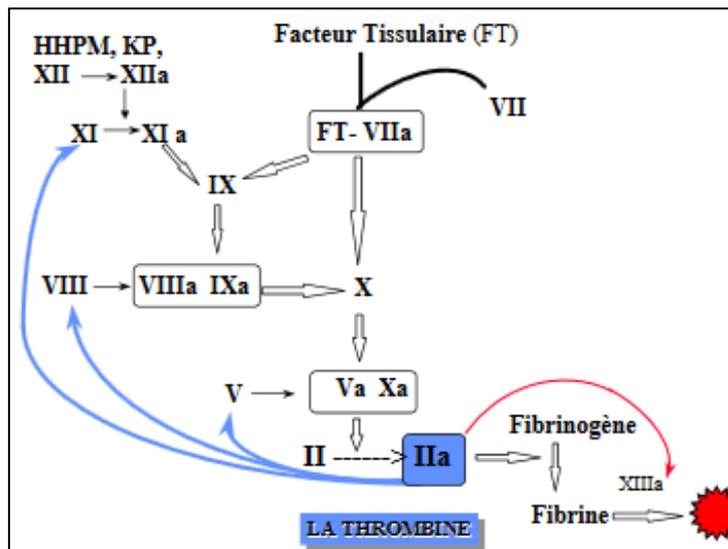


Figure 19: Schéma de la coagulation *in vivo* (Schved - 2007)

Un défaut d'activité en facteur de la coagulation, comme le facteur IX, peut donc entraîner une dérégulation de l'ensemble de la cascade de la coagulation provoquant des pathologies comme l'hémophilie B.

#### B. Le gène du FIX

Le facteur IX est codé par un gène d'environ 34kb, situé sur le chromosome X à la position Xq27.1. Il est composé de 8 exons et 7 introns<sup>373</sup> (fig.20):

- Exon 1 : code pour un peptide signal hydrophobe qui permet la sécrétion du FIX par les hépatocytes dans la circulation sanguine
- Exons 2 et 3 : codent respectivement pour un propeptide de 18 résidus et un domaine GLA (acide  $\gamma$ -carboxyglutamique). L'exon 3 est composé de 12 résidus  $\gamma$ -carboxyglutamyl qui permettent la modification transcriptionnelle nécessaire à la bonne conformation de la protéine et à la fixation du calcium sur le FIX.
- Exon 4 : code pour le premier domaine EGF-like (EGF1), contenant une séquence similaire à l'épidermal growth factor (EGF) humain, qui permet la fixation de haute affinité avec un ion Calcium  $Ca^{2+}$
- Exon 5 : code pour le deuxième domaine EGF-like (EGF2)
- Exon 6 : code pour le domaine d'activation du FIX en FIXa
- Exons 7 et 8 : codent respectivement pour la serine protéase et le domaine catalytique, responsable de la protéolyse du FIX en FIXa

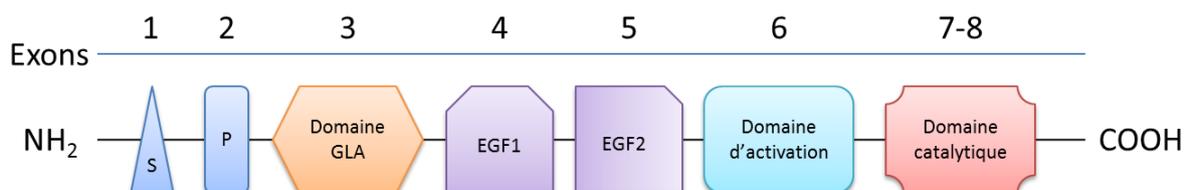


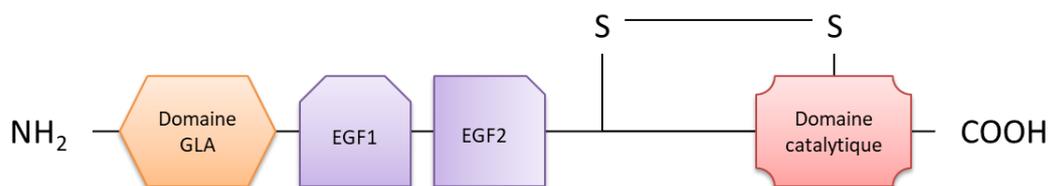
Figure 20: Schéma de la structure du FIX (S : signal peptide ; P : propeptide).

Les mutations observées dans le gène du FIX peuvent être de plusieurs types mais la mutation la plus fréquente est une mutation faux sens, dans 68% des cas, située le plus souvent dans les exons 4 ou 8<sup>374</sup>.

### C. La protéine du FIX et le rôle de la vitamine K

Le FIX est une protéine de 52kDa, dont la concentration moyenne dans le plasma est 5µg/ml<sup>375</sup>. Le FIX est initialement synthétisé dans le foie comme précurseur inactif de 461 acides aminés contenant un peptide signal de 28 acides aminés et un propeptide de 18 acides aminés. Plusieurs étapes interviennent avant sa sécrétion dans la circulation sanguine et son activation.

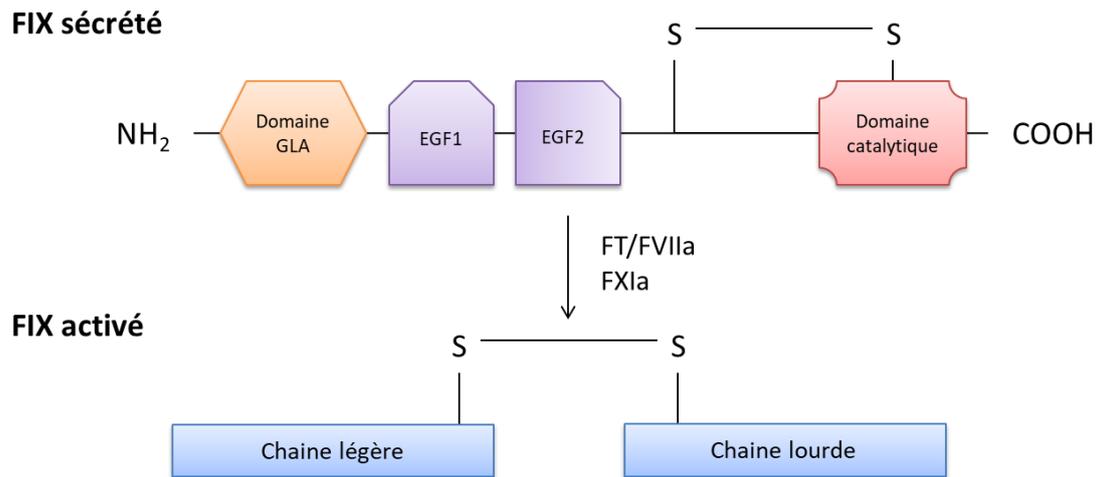
En effet, le FIX possède, en plus du peptide signal présent dans toutes les protéines sécrétées par la cellule, un propeptide qui permet la fixation de la  $\gamma$ -carboxylase vitamine K-dépendante<sup>376</sup>. Celle-ci va modifier, par  $\gamma$ -carboxylation, les douze résidus N-terminaux du domaine GLA du propeptide, permettant la liaison de celui-ci avec le calcium, entraînant un changement de conformation indispensable à l'activité enzymatique de la protéine<sup>377</sup>. La fixation du calcium permet également la fixation de la protéine aux phospholipides présents à la surface des plaquettes et des cellules endothéliales afin de localiser la réaction de coagulation. Le propeptide est ensuite clivé. Le FIX subit également d'autres modifications, comme des O-glycosylations (sur Ser<sup>53</sup>, Ser<sup>61</sup>, Thr<sup>159</sup> et Thr<sup>169</sup> et Thr<sup>172</sup>), des N-glycosylations (sur Asn<sup>157</sup> et Asn<sup>167</sup>), une  $\beta$ -hydroxylation (sur Asp<sup>64</sup>), une sulfatation (sur Tyr<sup>155</sup>), et une phosphorylation (sur Ser<sup>158</sup>). Le FIX est par la suite sécrété dans la circulation sanguine sous forme enzymatiquement inactive (zymogène) (fig.21).



**Figure 21** : Schéma représentant la séquence du FIX sécrété dans la circulation sanguine

Le FIX contient aussi dans sa séquence deux domaines EGF1 et EGF2. Le domaine EGF1 lie les ions calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) en présence de phospholipides, ce qui permettra de créer la liaison FIXa/FVIIIa dans le processus de coagulation. Le domaine EGF2 quant à lui se lie au FVIIIa et aux phospholipides à la surface des plaquettes activées.

Après sa sécrétion dans la circulation sanguine, le FIX est activé par le complexe FT/FVIIa. Le FIXa obtenu est divisé en deux chaînes : une chaîne légère (constituée des domaines GLA, EGF1 et EGF2) et une chaîne lourde (contenant le site protéase), reliées par un pont disulfure (Cys178 – Cys335)<sup>373</sup> (fig.22).



**Figure 22** : Schéma représentant la séquence du FIX plasmatique avant et après activation de la coagulation (FIX sécrété et FIX activé)

#### IV. Traitements de l'hémophilie B

##### A. Historique

Au début des années 1900, la cryopréservation du sang n'était pas une technique disponible et les patients hémophiles recevaient le plus souvent, quand cela était nécessaire, des transfusions à partir d'un membre de leur famille. A cette époque, l'espérance de vie d'un jeune garçon hémophile était d'environ 13 ans. C'est à partir des années 1920 que des transfusions de plasma ont été disponibles dans les hôpitaux. Dans les années 1930, on utilisait parfois du venin de serpent dilué afin d'améliorer la coagulation sanguine. Par la suite, des plasmas congelés ont pu être utilisés, mais malheureusement, des quantités très importantes devaient être utilisées afin d'apporter la quantité nécessaire de facteur de coagulation. Au début des années 1960, l'espérance de vie des patients était d'environ 20 ans. En 1965, JG Pool découvrit que les précipitats présents dans les poches de sang décongelé étaient très riches en facteurs de la coagulation. Ces « concentrés » pouvaient alors être conservés et utilisés dans les cas les plus graves. Dans les années 1970, le traitement de la maladie fut révolutionné par des formulations sous forme de poudre de facteur IX permettant ainsi aux patients de se soigner chez eux et non plus à l'hôpital.

Au milieu des années 80, la transmission du VHC (virus de l'hépatite C) et du VIH (virus de l'immunodéficience humaine) par le sang et les produits sanguins fut confirmée et de nombreux patients hémophiles furent contaminés. C'est la tristement célèbre affaire du « sang contaminé ». Ces injections de produits sanguins entraînèrent également la contamination de nombreux patients par le virus de l'hépatite C, jusqu'à ce que des tests plus sensibles et le procédé de chauffage soient appliqués aux produits sanguins utilisés, à partir de 1992.

En 1997, le premier facteur IX produit par génie génétique, appelé « recombinant » (FIXr), fut approuvé par la Food and Drug Administration (FDA), l'administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments ayant le pouvoir de rendre un médicament ou un aliment

commercialisable aux Etats-Unis. Ce produit, appelé aujourd'hui BeneFIX et commercialisé par Pfizer, est le produit le plus utilisé pour traiter l'hémophilie B.

Depuis, d'autres approches ont été développées comme la thérapie génique sur laquelle nous reviendrons plus en détails par la suite.

## B. Traitements disponibles

Le traitement actuel de l'hémophilie B est substitutif, symptomatique ou prophylactique, mais en aucun cas curatif. Il consiste à injecter des concentrés protéiques de FIX d'origine plasmatique, ou recombinant, à la demande en cas d'hémorragie ou d'intervention chirurgicale programmée, ou désormais le plus souvent préventivement. C'est ce qu'on appelle un traitement prophylactique. Ces injections permettent une réduction efficace des saignements et une nette amélioration de la qualité de vie des patients en évitant les complications articulaires des hémarthroses, même si la courte durée de vie du FIX (24 heures) nécessite des injections intraveineuses 2 à 3 fois/semaine dans les cas les plus graves<sup>378</sup>. En 2013, aux Etats-Unis, 33% des patients atteints d'hémophilie B sévère utilisaient ces traitements prophylactiques<sup>379</sup>. On estime cependant que seulement 1/3 des patients atteints d'hémophilie B est diagnostiqué et traité dans le monde.

Le traitement le plus souvent administré est le BeneFIX, approuvé dans 77 pays, avec un revenu annuel de 213 millions de dollars dans le monde dont 97 millions aux Etats Unis<sup>379</sup>. Produit *in vitro* dans des cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO pour Chinese hamster ovary), des études cliniques ont montré qu'il empêchait, en préventif, l'apparition de saignements dans les 48h suivant l'injection chez 84% des patients et que 75% des saignements étaient réduits à la suite d'une seule injection<sup>380</sup>.

Le développement de traitements administrables à domicile dans les années 70 a révolutionné le traitement des patients, leur permettant en cas d'hémorragies de s'injecter eux-mêmes leur FIXr, ou de se le faire injecter par un proche. Les parents peuvent administrer le traitement à leur enfant à partir de l'âge de 4 ou 5 ans. A partir de 12 ans, les patients peuvent apprendre à s'injecter leur traitement eux-mêmes. Des stages ouverts aux parents et aux enfants sont pour cela organisés par les centres de traitement de l'hémophilie ainsi que par l'Association Française des Hémophiles.

En plus des injections de FIX afin de traiter les saignements, la kinésithérapie est également préconisée pour prévenir l'apparition de séquelles articulaires à la suite des hémorragies intra articulaires et musculaires à répétition. Dans les cas les plus graves une intervention chirurgicale peut être nécessaire afin d'évacuer un hématome trop volumineux ou pour traiter une hémorragie interne. L'administration de FIX recombinant avant l'intervention est bien sûr nécessaire.

Si des prises répétées de FIXr permettent de réduire les saignements, elles présentent cependant certaines limites comme la forte contrainte que représentent ces injections répétées ainsi que leur coût, estimé aujourd'hui en France à 200 000 €/patient/an dans les cas d'hémophilie sévère<sup>381</sup>. En 2013, le marché mondial des traitements de l'hémophilie B représentait plus de 1,2 billion de dollars<sup>379</sup>. De plus, l'apparition d'anticorps neutralisants qui se fixent sur la protéine injectée et l'inactivent (appelés inhibiteurs) est une complication rare (1 à 3% des patients), mais très problématique, qui nécessite un lourd traitement de tolérisation qui n'est pas sans risque surtout

dans le cas de l'hémophilie B<sup>382</sup>. On considère cependant que 9 à 23% des hémophiles B sévères développent des anticorps anti-facteur IX<sup>383</sup>. Dans près de 80% des cas, les inhibiteurs disparaissent après un traitement intensif consistant à administrer de hautes doses de FIX en vue d'habituer le système immunitaire à leur présence.

Certaines approches sont développées afin d'améliorer la stabilité et la durée d'efficacité des FIXr, augmentant dans certains cas la demie vie de la protéine de 24h à 5 jours<sup>384</sup>. C'est le cas par exemple de l'ALPROLIX®, une protéine recombinante couplée à une région constante (Fc) des immunoglobulines (Ig). Le domaine Fc permet de protéger la protéine grâce aux mécanismes naturels protégeant les Ig de la dégradation<sup>385,386</sup>. Commercialisé par Biogen Idec, ce produit a été approuvé en 2014 par la FDA<sup>387</sup>.

D'autres systèmes comme la PEGylation de la protéine ont également été développés<sup>388,389</sup>. La société Novo Nordisk a en effet couplé la protéine du FIX à du PolyEthylène Glycol (PEG), au niveau du peptide d'activation de la protéine, qui sera par la suite détaché du FIX lors de son activation. Cette PEGylation permet de préserver l'activité biologique de la protéine tout en prolongeant de 5 fois son temps de vie dans la circulation sanguine.

Une étude menée en 2016 a cependant comparé l'efficacité de l'utilisation du BeneFIX et de l'Alprolix dans un modèle de souris hémophiles B et les résultats indiquent que si seul l'Alprolix est détecté dans le sérum des animaux, les deux produits permettent de façon étonnante une efficacité hémostatique similaire 7 jours après injection<sup>390</sup>. Les auteurs expliquent ces résultats par la présence de FIX extra-vasculaire se fixant au collagène IV<sup>391</sup> précédemment décrite par la même équipe dans un modèle de souris<sup>392</sup>. Les auteurs proposent ainsi de s'intéresser davantage aux conséquences cliniques des FIXr développés plutôt qu'à la simple mesure de leur concentration plasmatique qui ne reflète pas toujours leur activité hémostatique, tout en rappelant que ces résultats ont été obtenus chez la souris et peuvent donc différer chez l'homme. Les auteurs suggèrent également une augmentation d'un facteur 3 de la dose de FIX utilisée en traitement prophylactique, s'appuyant sur leurs résultats chez la souris ainsi que sur l'étude de Kavakli *et al.* chez des patients HB traités à forte dose<sup>393</sup>.

#### A. Nouveaux traitements en cours de développement

Quelles que soient la nature de la protéine utilisée et la fréquence à laquelle le traitement doit être pris, son mode d'administration actuel est l'injection en intraveineuse. D'autres voies d'administration sont en cours d'étude afin de faciliter les prises à répétition du traitement, comme l'administration par voie orale. Cependant, la prise par voie orale d'une substance chimique nécessite de prendre en compte deux paramètres. Tout d'abord, la fonction de la molécule doit être maintenue dans l'estomac et donc l'intégrité de sa structure préservée, malgré la présence des enzymes gastriques. Le second paramètre est la biodisponibilité, c'est-à-dire la capacité de la molécule à passer dans la circulation sanguine au niveau de l'intestin. Les mêmes problématiques se posent pour la prise de l'insuline par les diabétiques par exemple. Dans ce domaine, des hydrogels « pH-dépendants » ont été développés afin de protéger la protéine dans le pH très acide de l'estomac (pH2), et de la libérer lors de l'augmentation du pH dans l'intestin (pH 5-7)<sup>394</sup>. Cette même approche a été testée pour le FIX, même si les résultats sont pour l'instant trop préliminaires pour envisager une quelconque approche thérapeutique chez l'homme<sup>395</sup>.

## V. Thérapie génique de l'hémophilie B

### A. Intérêts de la stratégie

Face aux inconvénients des traitements actuellement disponibles, des essais de thérapie génique ont été entrepris. Cette technique consiste à introduire du matériel génétique dans les cellules pour y corriger une anomalie génétique en exprimant un allèle fonctionnel du gène concerné. Plusieurs facteurs doivent être pris en compte dans une telle approche. Tout d'abord, l'expression du transgène doit persister à un niveau thérapeutique et le vecteur utilisé ne doit évidemment pas présenter de toxicité pour le patient, ni provoquer de réaction immune.

Deux approches peuvent être utilisées dans le cadre d'une thérapie génique :

- La thérapie *ex vivo* consiste à isoler et purifier une population cellulaire ciblée, le plus souvent des cellules souches, afin de les modifier génétiquement de façon stable. Les cellules issues de ces cellules souches modifiées porteront ainsi également le transgène utilisé. Pour cela, des vecteurs intégratifs comme les vecteurs lentiviraux ou rétroviraux sont souvent utilisés.

Des essais cliniques ont d'ailleurs été menés en utilisant cette approche et ont montré des résultats convaincants, dans le cas par exemple de la leucodystrophie métachromatique, où des cellules souches hématopoïétiques ont été transduites avec un vecteur lentiviral portant le gène ARSA<sup>396</sup>, ou dans le cas de patients atteints du syndrome de Wiskott-Aldrich, dont les cellules souches hématopoïétiques ont été transduites avec un vecteur lentiviral portant le gène WAS<sup>397</sup>.

- On peut également cibler directement des cellules post-mitotiques à longue durée de vie, comme des cellules musculaires par exemple, *in vivo*. Les vecteurs AAV (Adenovirus-associated virus) sont particulièrement efficaces pour ce type d'approche. Une étude clinique a d'ailleurs été menée sur une quarantaine de patients souffrant d'insuffisance cardiaque sévère traités par l'injection intracardiaque d'AAV1-SERCA2a<sup>398</sup>.

L'hémophilie B se prête bien à la thérapie génique<sup>399</sup>. En effet, c'est une maladie monogénique, l'ADNc du FIX est de petite taille (1389pb) ce qui lui permet d'être inséré dans la plupart des vecteurs utilisés en thérapie génique. Enfin, même une légère augmentation de la concentration plasmatique en FIX suffit à améliorer le phénotype, et les risques de surdosages en FIX sont faibles.

### B. Essais cliniques

La plupart des essais cliniques actuels utilisent des vecteurs viraux de type AAV qui ont l'avantage de transduire des cellules en divisions mais aussi en quiescence et de ne pas s'intégrer dans le génome, n'entraînant donc pas de risque de toxicité génomique. Les premiers essais cliniques de thérapie génique comme traitement de l'hémophilie B utilisant des vecteurs AAV ont été réalisés en 2000<sup>400</sup>, puis 2003<sup>401</sup>, par injection intramusculaire d'un vecteur de sérotype 2 (AAV2-hFIX). Malheureusement, si l'expression du transgène a pu être confirmée par immunohistologie jusqu'à 10 mois après injection, le niveau de FIX dans le sérum des patients n'a pas augmenté, n'apportant ainsi aucune amélioration du phénotype hémorragique. Par la suite, une équipe a réalisé l'injection

directement dans le foie des patients, notant cette fois une amélioration de la concentration plasmatique en FIX chez les patients traités à forte dose<sup>402</sup>. En revanche, ce taux de FIX a rapidement décliné pour finalement revenir sous des niveaux thérapeutiques après 8 semaines. De plus, l'utilisation à forte dose de vecteurs nécessaire à l'élévation du niveau de FIX a provoqué une toxicité hépatique caractérisée par une augmentation des transaminases liée à l'élimination des hépatocytes produisant le FIX par les lymphocytes T cytotoxique du système immunitaire<sup>403</sup>.

D'autres approches ont par la suite utilisées des vecteurs AAV8, ou des hybrides AAV2/8, connus pour transduire plus efficacement le foie que le sérotype AAV2<sup>404</sup>. Testé tout d'abord chez la souris<sup>405</sup> puis sur les primates non-humains<sup>406</sup>, le premier essai clinique chez l'homme a eu lieu en 2011<sup>407</sup>. Dans cette étude, 6 patients atteints d'hémophilie B sévère ont reçu une injection unique, en intraveineuse, de vecteur AAV8-hFIX. Après 4 mois, les patients présentaient une activité FIX dose-dépendante comprise entre 1 et 6% par rapport à la normale. 4 patients supplémentaires ont été traités en 2012, recevant la plus forte dose de vecteur. Après 3 ans de suivi, les résultats publiés montrent une augmentation du taux de FIX plasmatique de plus de 5% chez tous les patients ayant reçu la plus forte dose de vecteur, résultant dans une diminution de plus de 90% des épisodes hémorragiques<sup>408</sup>. De plus, 4 de ces patients suivaient un traitement prophylactique qu'ils ont pu stopper après l'injection. Cependant, tous les patients de cette étude ont développé des anticorps dirigés contre la capsid du vecteur, empêchant toute possibilité de ré-injection si leur taux de FIX devenait insuffisant.

Si les premiers essais réalisés chez l'homme montrent donc des résultats prometteurs, les critères d'inclusion dans ces essais cliniques ne permettront pas à tous les patients d'accéder à ces thérapies. En effet, il est important de noter que cette approche ne sera pas applicable chez des patients atteints de maladie hépatique par exemple, ou présentant des anticorps contre les AAV. De plus, ces essais de thérapie génique ont montré l'apparition de certaines complications, comme les réactions immunitaires, qui doivent être contrôlées<sup>409</sup>. Enfin, il est nécessaire de poursuivre l'étude de l'efficacité de ces approches à long terme pour s'assurer que l'expression de la protéine thérapeutique ne décroît pas au cours du temps, les vecteurs AAV utilisés étant non intégratifs.

### C. Approches de thérapie génique *ex vivo*

Comme nous l'avons vu précédemment, la thérapie génique peut également s'appliquer *ex vivo*. Une des premières approches de ce genre a été publiée en 1996, dans un article rapportant la transplantation dans des souris de microbilles d'alginate contenant des myoblastes recombinants sécrétant du FIX humain (hFIX)<sup>410</sup>. Les auteurs rapportent la détection dans le plasma des souris d'approximativement 4ng/ml de hFIX pendant plus de 14 jours.

La même année, un essai a été réalisé sur deux patients atteints d'hémophilie B, ayant reçu une transplantation autologue de fibroblastes génétiquement modifiés pour produire du hFIX<sup>411</sup>. Cependant, si aucun effet secondaire n'a été détecté, les résultats à long terme n'ont pas montré de résultats satisfaisants en termes de production de FIX.

En 2013, l'étude de Watanabe et *al.* a montré la possibilité de transduire des cellules souches dérivées de tissus adipeux à l'aide d'un lentivirus permettant une expression de FIX pendant 28 jours<sup>412</sup>. L'année suivante, une équipe a rapporté la transduction de cellules souches

hématopoïétiques avec un vecteur lentiviral contenant l'ADNc du F9 sous le contrôle d'un promoteur spécifique des plaquettes<sup>413</sup>. Après transplantation dans la moelle osseuse de souris F9KO, les cellules génétiquement modifiées ont permis une sécrétion de FIX suffisante pour corriger le phénotype de la maladie chez la souris.

## VI. Utilisation des CSP pour la modélisation et le traitement de l'hémophilie B

Afin de mieux comprendre les mécanismes moléculaires de l'hémophilie, quelques équipes se sont penchées sur l'utilisation de cellules souches pluripotentes induites spécifiques de patients pour modéliser la maladie *in vitro*. Cependant, la plupart des articles traitant de ce sujet concernent l'hémophilie A.

Une étude concernant le déficit en FIX dans un modèle de souris a cependant été publiée en 2005<sup>414</sup>. Le FIX étant synthétisé par les hépatocytes dans le foie, les auteurs rapportent la transplantation de progéniteurs endodermiques différenciés à partir de cellules souches embryonnaires murines et injectés dans des souris hémophiles B, montrant une prise de greffe dans le foie et une production de FIX dans le sang des souris.

Récemment, une équipe chinoise a publié un article sur l'étude de l'inactivation/réactivation de l'X dans des iPSC dérivées de cellules de sang d'une patiente atteinte d'hémophilie B<sup>415</sup>. C'est la première publication décrivant l'utilisation d'iPSC humaines pour modéliser l'hémophilie B.

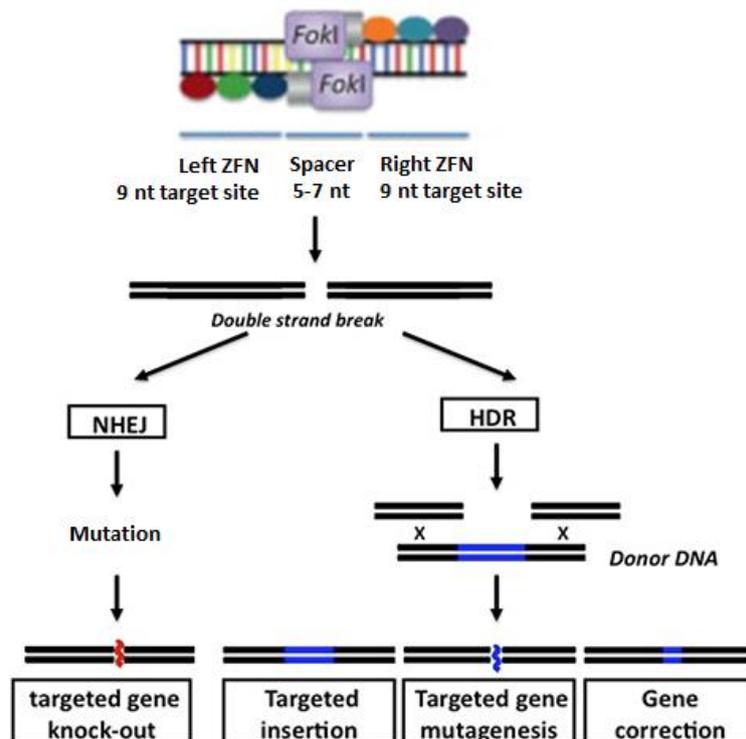
Depuis plusieurs années, des techniques de modification ciblée du génome ont été développées, permettant de modifier certains gènes d'une cellule *in vitro*. L'application de ces méthodes sur des iPSC porteuses d'une mutation responsable de l'hémophilie B représenterait une nouvelle voie vers le développement d'une thérapie cellulaire et génique.

## VII. Correction génétique : développement d'endonucléases artificielles

L'utilisation de nucléases artificielles permet d'inactiver un gène, de réparer une mutation ou de réaliser une insertion ciblée dans le génome. C'est sur cette dernière application que nous nous concentrerons dans les paragraphes suivants. En effet, ces nucléases, comme les nucléases à doigts de zinc (*Zinc Finger Nucleases*, ZFNs), les *Transcription Activator-Like Effector Nucleases* (TALEN), ou le système *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-associated/Cas9* (CRISPR/Cas9), permettent une coupure double brin de l'ADN au niveau d'une séquence ciblée. L'ajout d'une cassette d'expression, bornée de séquences homologues à celles encadrant le site de coupure, permet à la cellule cible d'intégrer cette cassette par recombinaison homologue (RH). La RH est des deux systèmes de réparation de l'ADN, qui utilise une matrice d'ADN comme modèle pour la réparation après une cassure double brin, à la différence de la ligature d'extrémités non homologues (NHEJ, pour Non Homologous End Joining) qui ne nécessite pas de matrice. En l'absence de coupure ciblée, la fréquence spontanée de la RH est de  $10^{-6}$ , insuffisante pour obtenir un effet thérapeutique. L'utilisation de nucléases artificielles permet d'augmenter cette fréquence<sup>416</sup> jusqu'à 5 000 fois pour les ZFN par exemple<sup>417</sup>.

## A. Zinc Finger Nucleases (ZFN)

Les ZFN sont des nucléases à doigts de zinc génétiquement modifiées pour permettre une coupure double brin de l'ADN au niveau d'un site ciblé du génome. Développées à partir de 1996<sup>418</sup>, leur spécificité est due à leurs domaines protéiques à doigt de zinc, couplés à une nucléase, souvent l'enzyme de restriction de type IIS FokI, qui permet la coupure double brin de l'ADN. Chaque domaine à doigt de zinc reconnaît 3 bases consécutives de l'ADN. Deux ZFN sont dessinés pour se fixer spécifiquement de chaque côté du site de coupure ciblé. On considère que l'utilisation de ZFN à 3 motifs en doigt de zinc, permettant la reconnaissance de 9 nucléotides consécutifs, est suffisante pour assurer une bonne spécificité de coupure. L'ajout, lors de ce processus, d'une matrice ADN, comportant des bras d'homologies de part et d'autre du site de coupure double brin, permet la réparation de l'ADN par recombinaison homologue et ainsi l'intégration à un site précis du génome d'une séquence d'ADN exogène, appelée « cassette thérapeutique » (fig.23). L'ajout d'une séquence exogène ne permet cependant pas une réparation de l'ADN par HR exclusivement. La population cellulaire finale contiendra donc un mélange de cellules dont l'ADN aura été réparé par HR, et ayant donc potentiellement intégré la séquence exogène, mais aussi par NHEJ.



**Figure 23:** Technologie des nucléases à doigts de zinc (ZFN) (adapté de Pollock – *Trends in neurosciences* – 2014)

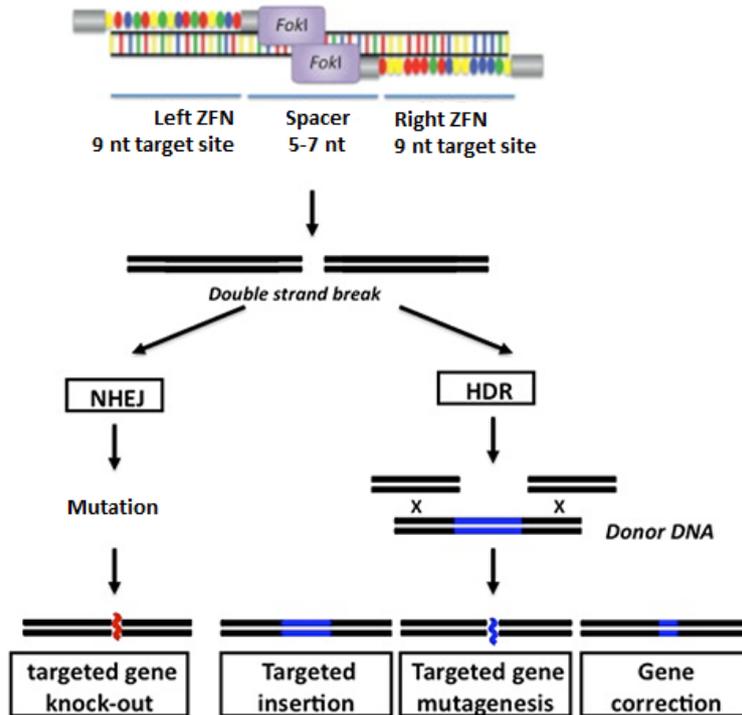
En 2011, une équipe a montré qu'il était possible de corriger le phénotype d'un modèle murin d'hémophilie B en utilisant ces nucléases artificielles directement injectées dans le foie de l'animal grâce à un vecteur AAV8<sup>419</sup>. Une autre étude montrant des résultats similaires a été publiée en 2013<sup>420</sup>.

Cependant, si cette technique offre de nombreuses possibilités, des études *in vitro* ont montré une potentielle toxicité due au risque de « off-target », c'est-à-dire de coupure non spécifique de l'ADN au niveau d'autres sites que le site ciblé, pouvant potentiellement endommager certains gènes. En effet, la nucléase FokI ne possède pas de spécificité de coupure, seul le choix des séquences des domaines de fixation des ZFN, en positionnant la nucléase, permet la spécificité du site de coupure. Une coupure non spécifique de l'ADN peut donc être due soit à une mauvaise reconnaissance du site de fixation par les domaines des ZFN, soit à une homodimérisation du domaine de coupure de FokI, entraînant sa fixation sur un autre site que le site choisi. Certaines modifications ont ainsi été apportées au système, comme le remplacement de FokI par un de ces variants, *Sharkey*, permettant une augmentation d'un facteur 15 de son activité catalytique par rapport aux ZFN « traditionnels »<sup>421</sup>, ou encore en remplaçant FokI par une enzyme de restriction spécifique, PvuII<sup>422</sup>. Cette approche ne peut en revanche être utilisée que pour le clivage de séquence contenant un site PvuII. Les différentes contraintes à respecter dans le choix des séquences ciblées rendent cependant le développement de cette technique assez lourde, sans compter la difficulté de clonage de la nucléase avec ses 2 composants comportant chacune 3 ZFN à assembler.

#### B. Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALEN)

En 2010, un autre système, plus efficace et moins laborieux à mettre en œuvre, de coupure double brin ciblée du génome a été développé : les TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases)<sup>423</sup>.

Les TALEN, fonctionnant de manière similaire aux ZFN, combinent les propriétés de liaison à l'ADN des TALE, des facteurs de transcription identifiés chez certaines bactéries des plantes<sup>424</sup> et de clivage de l'ADN par l'endonucléase FokI (fig.24). Contrairement aux domaines de 30 acides aminés des ZFN, qui reconnaissent chacun un triplet de séquence précise sur l'ADN, chaque TALE, constitué de 34 acides aminés, reconnaît une base unique, ce qui, par assemblage modulaire de segments répétés contenant les résidus variables appropriés, facilite la création de domaines de liaison à l'ADN spécifiques de n'importe quelle séquence<sup>425</sup>. La spécificité de chaque TALE est déterminée par 2 acides aminés en positions 12 et 13. Ainsi, la succession de TALE spécifiquement choisis permet la reconnaissance d'une séquence précise de l'ADN afin de cibler l'activité de la nucléase FokI.



**Figure 24:** Technologie des Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALEN) (adapté de Pollock – *Trends in neurosciences* – 2014)

Une étude publiée en 2014 a montré qu'il était possible d'utiliser cette technique afin d'inverser un segment de 140kpb dans le gène *F8* codant pour le facteur VIII (FVIII) de la coagulation, permettant ainsi de réaliser un modèle hiPSC de l'hémophilie A (HA-hiPSC)<sup>426</sup>. Les auteurs ont par la suite utilisé ces mêmes TALEN afin de remettre ce fragment du *F8* dans sa position initiale. Plus récemment, l'utilisation des TALEN a permis de corriger le déficit en FVIII dans des cellules endothéliales différenciées à partir de HA-hiPSC génétiquement corrigées<sup>427</sup>.

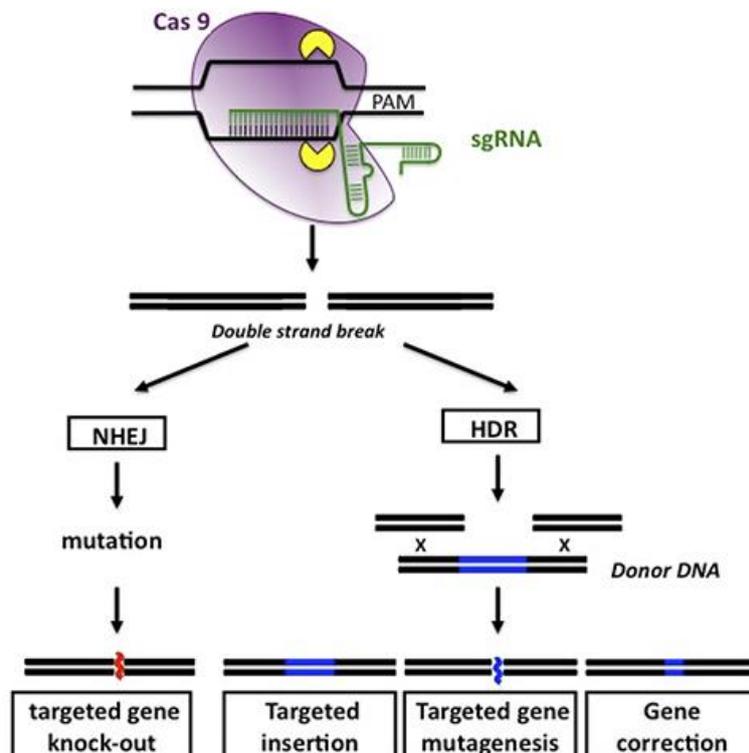
Même si ce système semble moins contraignant que les ZFN<sup>428</sup>, il présente cependant certaines restrictions, comme la nécessité de la présence d'une thymidine en début de séquence cible<sup>425</sup>. De plus, il a été montré que les TALEN avait une forte affinité pour certaines méthylcytosines, très fréquentes dans le génome, pouvant potentiellement influencer sur leur spécificité d'action<sup>429</sup>.

Un essai clinique de phase I a cependant été lancé en juin 2016 par la société Sangamo Therapeutics. 12 patients au total seront intégrés à cet essai qui s'achèvera en 2021. Celui-ci est basé sur les résultats d'une étude publiée chez la souris en 2015, dans laquelle 2 vecteurs AAV8, l'un pour le système ZFN ciblant l'intron 1 de l'albumine et l'autre pour une séquence codant les exons 2 à 8 du *F9*, ont été injectés dans des souris HB<sup>430</sup>. Les résultats montrent que si peu d'hépatocytes ont été modifiés (l'ARN hybride *mAlb-hF9* ne représentant que 0.5% de l'ARN total sauvage *mAlb*), la concentration plasmatique en FIX restait élevée jusqu'à 1 an après injection.

### C. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-associated/Cas9 (CRISPR/Cas)

Le système CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-associated/Cas9) a été décrit à partir des mécanismes de défenses de certaines bactéries<sup>432</sup>. La

protéine Cas9 est une endonucléase aspécifique reconnaissant une séquence d'ADN d'une vingtaine d'acides nucléiques suivie du motif « NGG » en 3'. Un ARN guide synthétique (sgRNA) qui par hybridation sur l'ADN permet de positionner la Cas9, permet de cibler l'action de l'endonucléase à un site choisi de l'ADN (fig.25).



**Figure 25:** System Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-associated/Cas9 (CRISPR/Cas9) (Pollock – *Trends in neurosciences* – 2014)

Ce système, adapté aux cellules eucaryotes, permet de créer des coupures double brin de l'ADN avec une efficacité allant jusqu'à 33%<sup>433</sup>. Une étude a également montré une amélioration de l'efficacité de réparation de l'ADN avec le système des CRISPR par rapport aux TALEN dans plusieurs systèmes cellulaires<sup>434</sup>, dont les iPSC humaines<sup>435</sup>.

En 2016, Guan et *al.* ont publié une étude dans laquelle ils ont utilisé le système CRISPR/Cas9 pour corriger *in vivo* la mutation responsable de la maladie dans un modèle de souris HB<sup>436</sup>. Ils ont tout d'abord injecté, dans la queue des animaux, des plasmides codant pour la caspase 9, l'ARN guide, et une séquence « corrigée » de l'ADN. Ils montrent ainsi une correction de l'hémostasie avec 1.5% des hépatocytes corrigés. Les auteurs ont par la suite utilisé des vecteurs adénoviraux : l'un codant pour la caspase, le second pour l'ARN guide et la séquence corrigée de l'ADN. Les résultats indiquent que si 5.5% des hépatocytes ont été corrigés par cette technique, aucune amélioration de l'hémostasie n'a été notée, probablement en raison d'une réponse immunitaire ayant causé la mort des hépatocytes corrigés. Cette étude a permis de montrer le fort potentiel des approches de modification ciblée du génome *in vivo*, tout en mettant en relief la nécessité de prendre en compte les vecteurs utilisés afin de limiter la réponse immunitaire dans une perspective d'application thérapeutique.

Très récemment, une équipe japonaise a rapporté la correction du phénotype de l'hémophilie B par le système CRISPR/Cas9 injecté à l'aide de vecteurs AAV8 dans un modèle de souris<sup>437</sup>. Les auteurs rapportent une augmentation de la concentration en FIX plasmatique après injection de deux vecteurs AAV8 contenant la Cas9 et l'ARN guide dans un premier, et la séquence homologue dans un second.

Ce système de modification ciblée du génome est donc encore en pleine évolution et n'a pas révélé tout son potentiel mais il est déjà très prometteur en ce qui concerne son application à la thérapie génique, même si des études approfondies sur sa fiabilité et sa sécurité d'utilisation sont bien sûr nécessaires avant de passer à des applications cliniques.

## OBJECTIFS

---

Mon projet de thèse intitulé « Hépatocytes différenciés à partir de cellules souches pluripotentes induites : modèle pour la thérapie cellulaire et génique autologue de l'hémophilie B et modèle préclinique chez le primate » comporte deux grands volets complémentaires.

Le premier volet a consisté à modéliser l'hémophilie B à l'aide d'hépatocytes dérivés d'iPSC spécifiques de patients afin, dans un premier temps, d'étudier au niveau moléculaire les mécanismes responsables du défaut de FIX, grâce à l'étude d'un clone iPSC reprogrammé à partir d'un patient porteur de la mutation royale<sup>438</sup> évoquée dans l'introduction, puis en développant un modèle de thérapie cellulaire et génique à partir d'hépatocytes dérivés d'iPSC de patients, après correction génétique, validée *in vitro* puis *in vivo* dans un modèle de souris hémophiles afin de démontrer l'efficacité thérapeutique de cette approche. Enfin, le deuxième volet de ce projet s'est intéressé à la transplantation autologue d'hépatocytes dérivés d'iPSC de singe, pour montrer sa faisabilité et sa sécurité sur un modèle de gros animal.

Plus précisément, ce projet a consisté, pour la première partie à reprogrammer des cellules de patients atteints d'hémophilie B, différencier ces cellules en hépatocytes pour modéliser la maladie, corriger le déficit génétique dans les iPSC en insérant une cassette thérapeutique codant le facteur IX de la coagulation, appliquer le protocole de différenciation mis au point sur ces iPSC corrigées, valider la correction phénotypique *in vitro*, et enfin transplanter ces hépatocytes dans un modèle de souris déficientes en facteur IX (F9KO) afin de valider la correction du phénotype *in vivo*.

Enfin, avant son utilisation en thérapeutique chez l'homme, l'efficacité et la sécurité d'une approche de thérapie génique et cellulaire doivent être étudiées dans un modèle de gros animal. Pour cela, j'ai travaillé sur un modèle de transplantation autologue d'hépatocytes dérivés d'iPSC simiennes (siPSC). Cette partie du projet a consisté à reprogrammer des cellules de singe en siPSC, différencier ces siPSC en hépatocytes, valider leur fonctionnalité *in vivo* chez la souris, transduire les hépatocytes dérivés à l'aide d'un lentivirus GFP afin de les marquer avant la transplantation chez le singe, établir une banque de cellules différenciées congelées, puis réaliser la transplantation autologue des hépatocytes différenciés dans le foie du singe.

Ce projet avait été amorcé par une précédente doctorante de l'équipe et j'ai poursuivi ses travaux afin d'établir un protocole de différenciation des iPSC de singe. L'étape de transduction de ces hépatocytes a également été mise au point et je continue actuellement à réaliser la banque de cellules différenciées. Cependant, l'élevage de souris dans lesquelles nous devons valider leur fonctionnalité *in vitro* avant la transplantation chez le singe a rencontré quelques soucis et nous n'avons malheureusement pas pu transplanter nos cellules à ce jour.

## RESULTATS

### Chapitre 1 : Modélisation de l'hémophilie B : cas d'un patient porteur de la « mutation royale »

#### I. Présentation de l'article publié dans *Journal of Thrombosis and Haemostasis*

Comme évoqué dans l'introduction, la génération de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) à partir de cellules de patients permet de modéliser certaines maladies afin de mieux comprendre leurs mécanismes moléculaires. Cependant, en ce qui concerne l'hémophilie, les modèles iPSC décrits à ce jour concernent l'hémophilie A à l'exception d'un article, très récent, qui décrit la génération d'iPSC à partir de cellules d'une patiente atteinte d'hémophilie B (HB) afin d'étudier les mécanismes de l'inactivation du chromosome X<sup>415</sup>.

La mutation la plus « célèbre » responsable de l'hémophilie B est la « mutation royale », portée par la reine Victoria au XIXe siècle qui l'a par la suite transmise à sa descendance. Des études menées sur les ossements des descendants de la famille royale ont identifié la mutation *F9* c.278-3A>G<sup>439</sup>. Des analyses bio-informatiques ont d'abord prédit que cette substitution A>G, située 3 paires de base avant l'exon 4 du *F9*, entraînait la formation d'un nouveau site d'épissage induisant la formation d'environ 99% d'ARN messagers anormaux, ainsi que l'apparition d'un codon stop 11 codons plus loin, cohérent avec une forme sévère de l'hémophilie B<sup>362</sup> (fig.26).

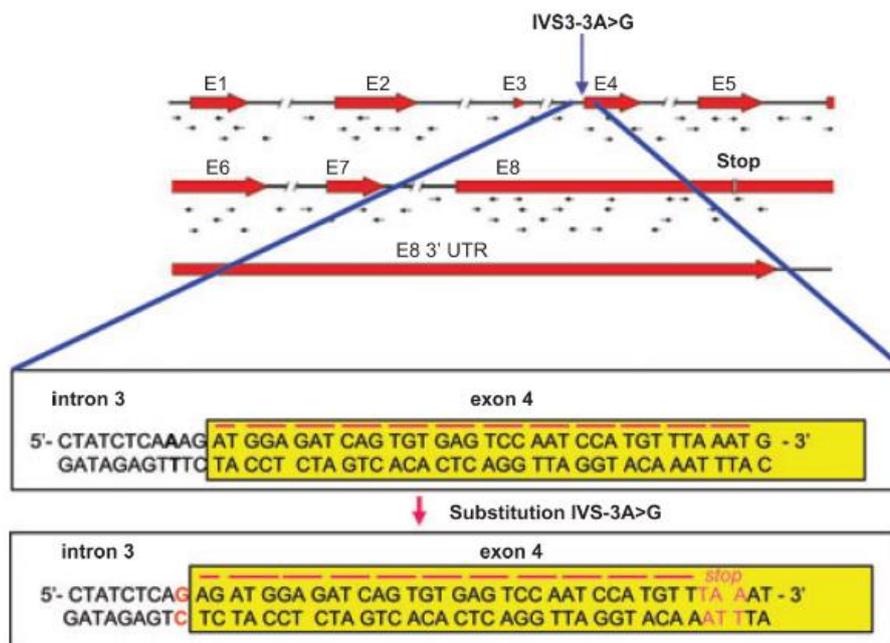


Figure 26: Représentation de la « mutation royale » à la jonction intron/exon de l'exon 4 (Lannoy – *Haemophilia* - 2010)

Même si les résultats de ces analyses bio-informatiques ont été confirmés par la suite dans un modèle de cellules de rein de singe (COS7) par transfection d'une construction exprimant un mini-gène *F9*, aucune approche directe n'avait été développée dans des cellules humaines.

Le cas d'un patient porteur de cette même mutation, sans lien avec la famille royale, a été rapporté en Espagne en 2010<sup>438</sup>. Un projet européen collaboratif E-RARE, dans lequel notre équipe était impliquée, a ensuite permis de réaliser un modèle physiologique de la maladie et d'étudier l'expression de l'ARN du *F9* par séquençage à haut débit (NGS pour Next Generation Sequencing). Des iPSC ont alors été dérivées, à l'aide de vecteurs rétroviraux, à partir de fibroblastes de ce patient et de sa mère, porteuse de la mutation. Mon rôle au sein de ce projet a été d'adapter notre protocole de différenciation en hépatocytes à ces deux clones iPSC, de caractériser les cellules différenciées obtenues en tant qu'hépatocytes, par RT-PCR et immunofluorescence, puis d'envoyer des échantillons d'ARN au laboratoire de Jordi Barquinero à Barcelone pour séquençage NGS.

Les résultats de ce travail sont publiés dans *Journal of Thrombosis and Haemostasis* et sont présentés dans la suite de ce chapitre.

## **II. Article**

## ORIGINAL ARTICLE

# Advanced cell-based modeling of the royal disease: characterization of the mutated *F9* mRNA

L. MARTORELL,<sup>\*†‡</sup> E. LUCE,<sup>§¶\*\*</sup> J.L. VAZQUEZ,<sup>††</sup> Y. RICHAUD-PATIN,<sup>††</sup> S. JIMENEZ-DELGADO,<sup>††</sup> I. CORRALES,<sup>†</sup> N. BORRAS,<sup>†</sup> S. CASACUBERTA-SERRA,<sup>\*</sup> A. WEBER,<sup>§¶\*\*</sup> R. PARRA,<sup>‡‡‡</sup> C. ALTISENT,<sup>‡‡</sup> A. FOLLENZI,<sup>§§</sup> A. DUBART-KUPPERSCHMITT,<sup>§¶\*\*</sup> A. RAYA,<sup>††¶¶\*\*\*</sup> F. VIDAL<sup>†‡‡†††</sup> and J. BARQUINERO<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Gene and Cell Therapy Laboratory, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona; <sup>†</sup>Congenital Coagulopathies Laboratory, Blood and Tissue Bank (BST); <sup>‡</sup>Molecular Diagnosis and Therapy Unit, VHIR-UAB, Barcelona, Spain; <sup>§</sup>INSERM Unité Mixte de Recherche (UMR\_S) 1193; <sup>¶</sup>Université Paris-Sud; <sup>\*\*</sup>Département Hospitalo-Universitaire Hépatinov, Paul Brousse Hospital, Villejuif, France; <sup>††</sup>Center of Regenerative Medicine in Barcelona (CMRB); <sup>‡‡</sup>Hemophilia Unit, Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain; <sup>§§</sup>University of Piemonte Orientale, Novara, Italy; <sup>¶¶</sup>Catalan Institution for Research and Advanced Studies (ICREA), Barcelona; <sup>\*\*\*</sup>Biomedical Research Networking Center on Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN), Madrid, Spain; and <sup>†††</sup>Biomedical Research Networking Center on Cardiovascular Diseases, Madrid, Spain

**To cite this article:** Martorell L, Luce E, Vazquez JL, Richaud-Patin Y, Jimenez-Delgado S, Corrales I, Borrás N, Casacuberta-Serra S, Weber A, Parra R, Altisent C, Follenzi A, Dubart-Kupperschmitt A, Raya A, Vidal F, Barquinero J. Advanced cell-based modeling of the royal disease: characterization of the mutated *F9* mRNA. *J Thromb Haemost* 2017; doi: <https://doi.org/10.1111/jth.13808>.

## Essentials

- The Royal disease (RD) is a form of hemophilia B predicted to be caused by a splicing mutation.
- We generated an iPSC-based model of the disease allowing mechanistic studies at the RNA level.
- *F9* mRNA analysis in iPSC-derived hepatocyte-like cells showed the predicted abnormal splicing.
- Mutated *F9* mRNA level was very low but we also found traces of wild type transcripts.

**Summary.** *Background:* The royal disease is a form of hemophilia B (HB) that affected many descendants of Queen Victoria in the 19th and 20th centuries. It was found to be caused by the mutation *F9* c.278-3A>G. *Objective:* To generate a physiological cell model of the disease and to study *F9* expression at the RNA level. *Methods:* Using fibroblasts from skin biopsies of a previously identified hemophilic patient bearing the *F9* c.278-3A>G mutation and his mother, we generated induced pluripotent stem cells (iPSCs). Both the patient's and mother's iPSCs were differentiated into hepatocyte-

like cells (HLCs) and their *F9* mRNA was analyzed using next-generation sequencing (NGS). *Results and Conclusion:* We demonstrated the previously predicted aberrant splicing of the *F9* transcript as a result of an intronic nucleotide substitution leading to a frameshift and the generation of a premature termination codon (PTC). The *F9* mRNA level in the patient's HLCs was significantly reduced compared with that of his mother, suggesting that mutated transcripts undergo nonsense-mediated decay (NMD), a cellular mechanism that degrades PTC-containing mRNAs. We also detected small proportions of correctly spliced transcripts in the patient's HLCs, which, combined with genetic variability in splicing and NMD machineries, could partially explain some clinical variability among affected members of the European royal families who had lifespans above the average. This work allowed the demonstration of the pathologic consequences of an intronic mutation in the *F9* gene and represents the first *bona fide* cellular model of HB allowing the study of rare mutations at the RNA level.

**Keywords:** factor IX; hemophilia B; high-throughput nucleotide sequencing; induced pluripotent stem cells; RNA splicing.

Correspondence: Jordi Barquinero, Gene & Cell Therapy Laboratory, Vall d'Hebron Research Institute (VHIR), Psg. Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain  
Tel. +34 932746726  
E-mail: [jordi.barquinero@vhir.org](mailto:jordi.barquinero@vhir.org)

Received: 3 May 2017

Manuscript handled by: P. H. Reitsma

Final decision: P. H. Reitsma, 3 August 2017

## Introduction

The royal disease (RD) is a form of hemophilia B most famously transmitted from Queen Victoria (1819–1901) to the European royal families during the 19th and 20th centuries. Because of its historical impact, it has attracted the

attention of historians and biomedical researchers for decades. The mutation (F9 c.278-3A>G) was identified in DNA from bone remains of members of the Russian royal family. It was predicted to create an abnormal splicing site two nucleotides ahead of the wild-type (wt) site in the *F9* transcript, resulting in the inclusion of two additional nucleotides at the exon 3/exon 4 boundary, a frameshift and a premature termination codon (PTC) in the mature mRNA [1]. This was functionally validated in a model based on COS7 cells transfected with a minigene construct (truncated intron 3 – exon 4 – truncated intron 4). However, this approach did not allow the capture of the complexity of splicing of the full-length *F9* transcript in hepatocytes, thus limiting the impact of this study. Because of the strict tissue specificity of the *F9* promoter, a more precise analysis of the molecular mechanism leading to the bleeding phenotype would require studying *F9* mRNA in the hepatocytes of patients carrying this mutation.

We previously identified an 18-year-old Spanish patient with severe hemophilia B (HB), unrelated to the royal family, carrying this mutation [2]. The basal levels of coagulant factor (F) IX were < 1% in the patient and in the range of 30–40% in the carrier mother. A detailed description of the clinical history of this patient was previously reported [2]. The carrier has a history of hematomas, menorrhagia and bleeding episodes after minor surgeries, for which she has received replacement therapy with recombinant FIX. In the patient, a more sensitive quantification of his endogenous FIX plasma levels was not possible because he has been on prophylactic treatment since the age of 3 years and a liver biopsy to study *F9* mRNA was precluded for ethical reasons. To circumvent these limitations, we took advantage of the induced pluripotent stem cell (iPSC) technology to create a cellular model that captured the patient's genomic complexity and to study a more physiological *F9* expression upon *in vitro* differentiation into hepatocyte-like cells (HLCs).

## Materials and methods

### Human subjects

Diagnosis of the patient's HB and of the mother's carrier status was clinically and genetically confirmed at the Hemophilia Unit of Vall d'Hebron University Hospital [2]. Both mother and son agreed to undergo a skin biopsy

for this study and signed a written informed consent previously approved by our institutional Ethics Committee and Review Board, which also approved the study.

### Generation and maintenance of HB-patient-specific iPSCs (HB-iPSCs)

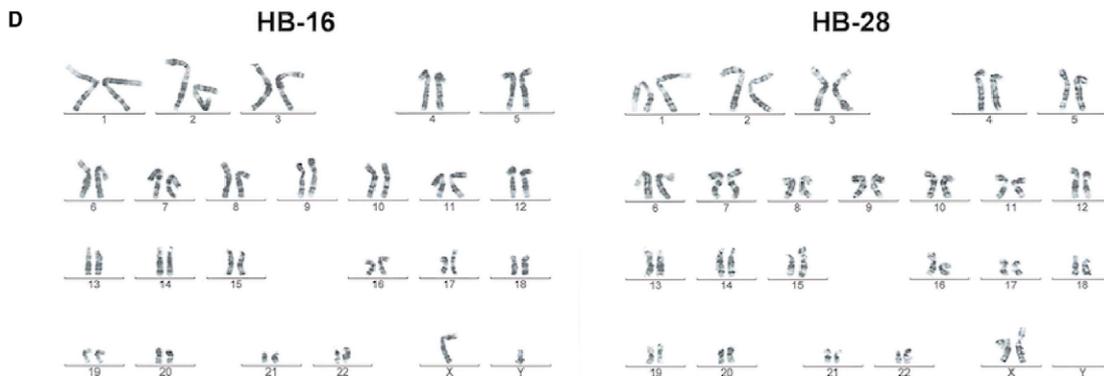
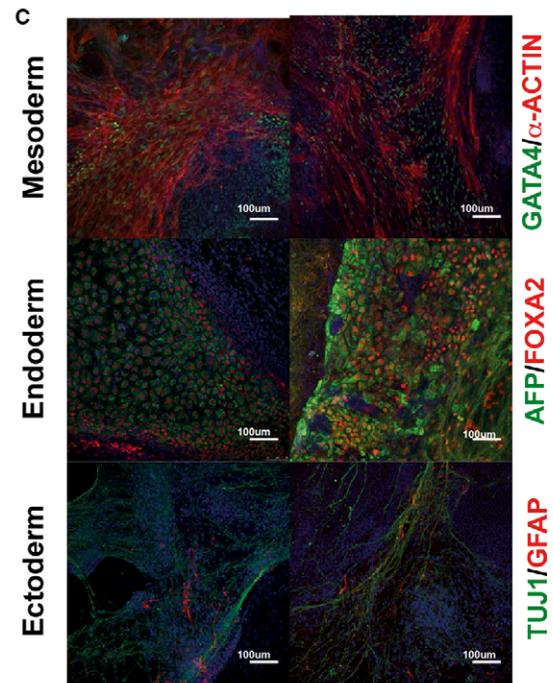
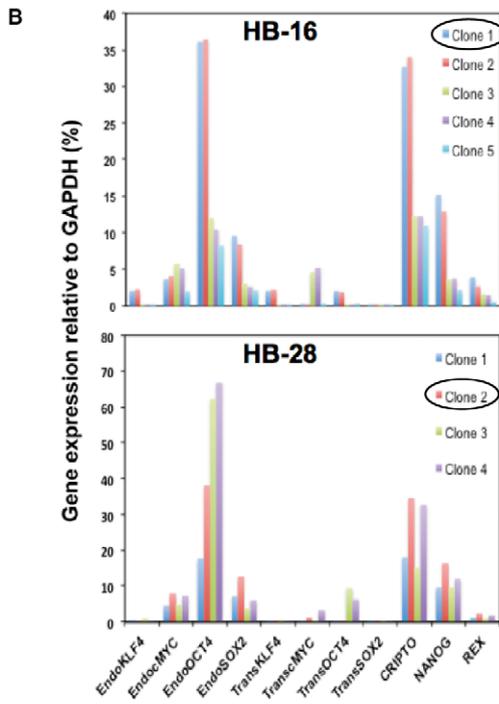
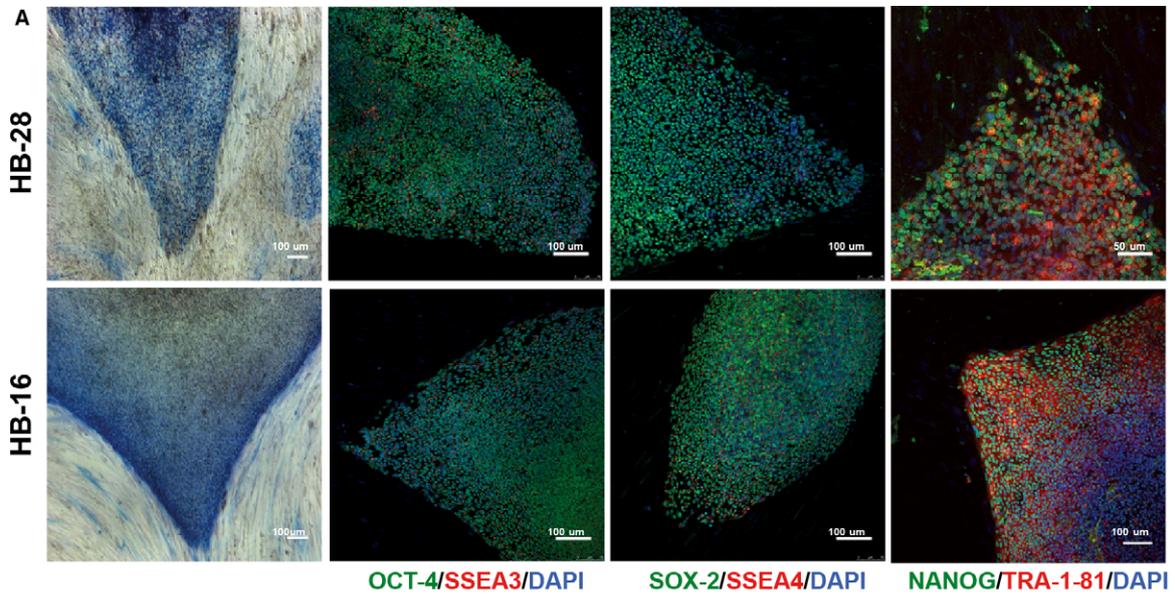
A 3-mm full-thickness skin punch biopsy was obtained from the volar surface of the forearm. The biopsy specimen was cut into 30–40 ~0.5-mm pieces and plated in HDF medium (DMEM containing 10% fetal bovine serum [FBS], 2 mM GlutaMAX, 50 U mL<sup>-1</sup> penicillin and 50 mg mL<sup>-1</sup> streptomycin [all from Gibco/Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA]). Primary cultures of fibroblasts were reprogrammed to pluripotency by retroviral transduction with a 1 : 1 : 1 : 1 mixture of retroviruses encoding FLAG-tagged Oct4, Sox2, Klf4 and c-Myc, as previously described [3]. Transduced cells were trypsinized and seeded onto irradiated CCD1112Sk (ATCC CRL2429) human foreskin fibroblasts (irrHFF) 2–3 days after infection. One day later, the medium was replaced with hESC medium (KO-DMEM supplemented with 20% KO-serum replacement, 2 mM Glutamax, 50 mM 2-mercaptoethanol, non-essential amino acids [all from Gibco/Thermo Fisher Scientific] and 10 ng mL<sup>-1</sup> of human FGF-basic [Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA]). Cells were maintained at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> and the medium was changed daily until iPSC colonies appeared. These patient-specific iPSC lines were maintained and passed by mechanical dissociation of the colonies, at a 1 : 3 ratio, and cultured on a feeder layer of irrHFF with hESC medium. Alternatively, the colonies were subjected to limited trypsin digestion and passaging onto Matrigel-coated plates with hESC medium pre-conditioned by irradiated mouse embryonic fibroblasts (MEFs).

### Characterization of HB-iPSC lines

The patient-specific iPSC lines were characterized as previously described [3]. Briefly, the iPSC lines were selected based on colony morphology, growth characteristics, and the capacity to sustain long-term passaging (> 20 passages) while maintaining a normal karyotype. Alkaline phosphatase (AP) activity was measured using an AP blue/red membrane substrate solution kit (Sigma, St Louis, MO, USA) according to the manufacturer's

---

**Fig. 1.** Characterization of royal disease (RD) patient's and mother's induced pluripotent stem cells (iPSCs). (A) Alkaline phosphatase (AP) staining of representative iPSC colonies hemophilia B (HB)-28 (mother) and HB-16 (patient) (left), and immunofluorescence images showing expression of the pluripotency markers OCT4, SOX2, SSEA3 and 4, NANOG and TRA-1-81. (B) Relative expression of endogenous and exogenous pluripotency genes detected by RT-qPCR using specific primers (Table S3). iPSC clones were selected based on the activation of endogenous (endo) genes associated with pluripotency and the silencing of (exogenous) transgenes. (C) iPSCs could be differentiated into the three germ layers, as confirmed by the expression of specific markers detected using immunofluorescence (endoderm, AFP and FOXA2; mesoderm, smooth muscle  $\alpha$ -actin (SMA) and GATA4; ectoderm, TUJ1 and GFAP) (see Table S1 for the antibodies used). (D) Normal karyotype of HB-16 (46XY, left) and HB-28 iPSCs (46XX, right), analyzed at passages 15 and 7, respectively.



guidelines. The expression of pluripotency-associated nuclear factors (OCT4, SOX2 and NANOG) and surface markers (SSEA3, SSEA4, TRA1-60 and TRA1-81), and the *in vitro* pluripotent differentiation ability of the cells to endoderm, mesoderm and neuroectoderm were analyzed by immunofluorescence as previously described [4] (Fig. 1). Briefly, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) at room temperature (RT) for 10 min, permeabilized for 15 min in 0.5% Triton in PBS, and then blocked for 2 h in Triton-X100 with 3% donkey serum (Millipore, Darmstadt, Germany). The primary antibodies used in all immunophenotypic studies are listed in Table S1. Secondary antibodies were of the Alexa Fluor series from Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA, USA), and used at a 1 : 250–1 : 500 dilution. Images were taken using a Leica SP5 confocal microscope. Cell nuclei were counterstained with 0.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole).

Silencing of the reprogramming transgenes (Oct4, Sox2, Klf4 and c-Myc) and activation of the endogenous pluripotency-associated genes (OCT4, NANOG, CRIP1 and REX1) in HB-iPSCs were confirmed as follows. Trizol-extracted total RNA and the SuperScript III Reverse Transcriptase kit (Life Technologies/Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA) were used for first-strand cDNA synthesis. A qPCR was then performed using SYBR Green PCR Mastermix (Life Technologies/Thermo Fisher Scientific) and the following thermocycling parameters: initial denaturation for 10 min at 95 °C and then 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min, ending with a dissociation curve stage. Non-transduced primary cells served as the negative control, and GAPDH as the endogenous control. The regulatory sequences of interest were amplified by two subsequent PCRs using the primer pairs indicated in Table S2. The resulting amplified products were cloned using the Dual Promoter TA Cloning kit (Life Technologies/Thermo Fisher Scientific), amplified in DH5 $\alpha$  cells, purified and sequenced. A minimum of two iPSC clones from each of the patient and his mother were selected that fulfilled all these criteria. Frozen stocks of early (< 10) and late (> 20) passage cells were stored in liquid N<sub>2</sub>.

#### Short tandem repeat (STR) analysis

To confirm that the iPSCs originated from the patient and his mother, DNA from PBMCs, fibroblasts and iPSC samples was subjected to STR analysis using the AmpFLSTR Identifier PCR amplification kit (Applied Biosystems, Foster, CA, USA) as previously described [2].

#### Hepatic differentiation of HB-iPSCs

Hepatic differentiation was induced using a protocol that mimics liver development *in vivo* [5], with a few

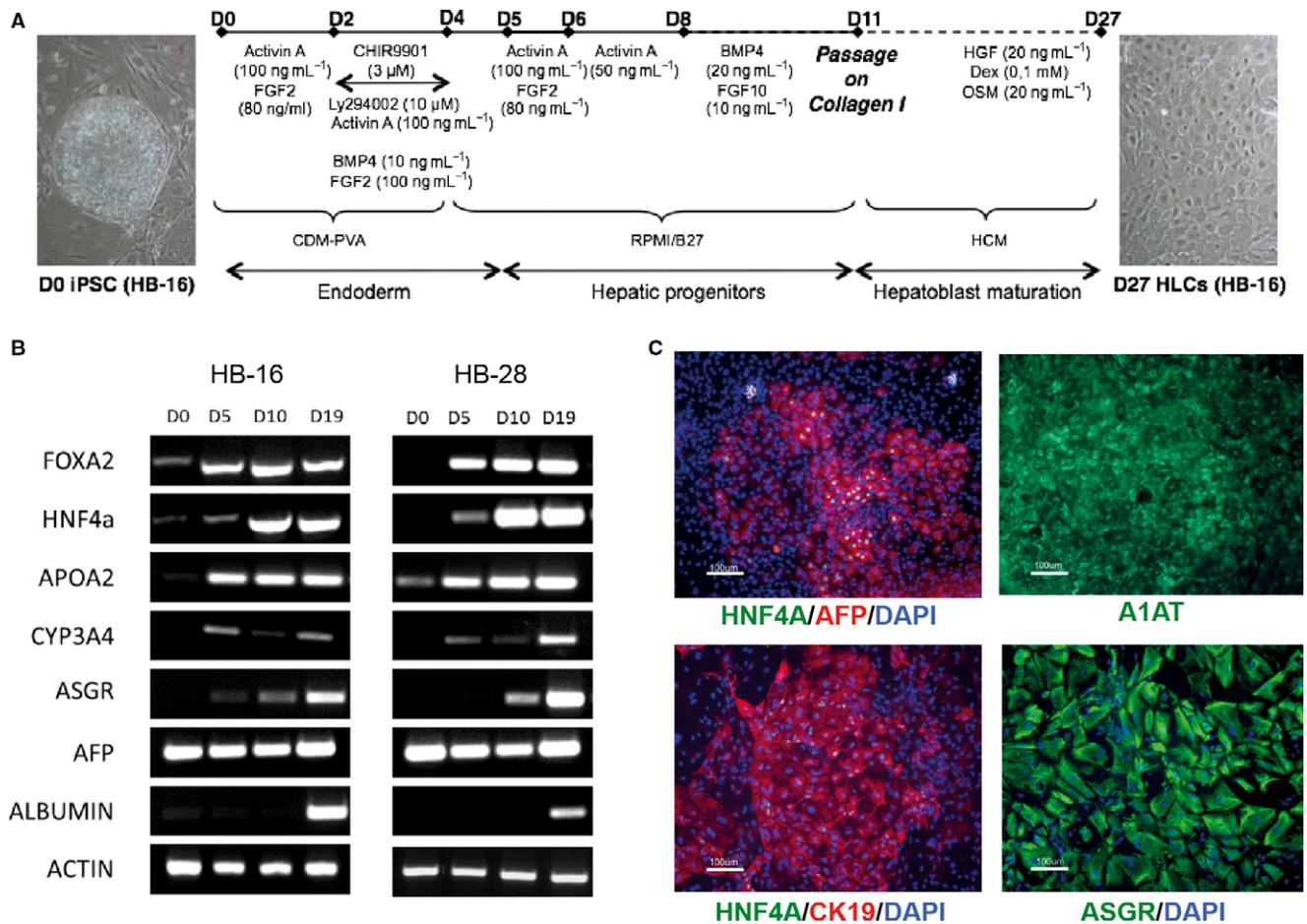
modifications (Fig. 2A). Briefly, iPSC clones were cultured for 2 days in chemically defined medium supplemented with polyvinyl alcohol (CDM-PVA) (50% F12 GlutaMAX [Gibco] + 50% IMDM [Gibco] supplemented with 1% concentrated lipid + 450  $\mu\text{M}$  thioglycerol + 7  $\mu\text{g mL}^{-1}$  insulin + 15  $\mu\text{g mL}^{-1}$  transferrin [Roche, Basel, Switzerland] + 1% Pen/Strep + polyvinyl alcohol [Sigma, Saint Louis, MO, USA] + 100 ng mL<sup>-1</sup> Activin A [Peprotech] + 80 ng mL<sup>-1</sup> fibroblast growth factor [FGF] 2 [R&D Systems, Minneapolis, MN, USA]), 2 days in CDM-PVA medium + 100 ng mL<sup>-1</sup> Activin A + 80 ng mL<sup>-1</sup> FGF2 + 10 ng mL<sup>-1</sup> bone morphogenetic protein (BMP) 4 (R&D Systems) + 10  $\mu\text{M}$  Ly294002 (Calbiochem, Merck Millipore, Billerica, MA, USA) + 3  $\mu\text{M}$  Chir99021 (Stemgent, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) and 1 day without Chir99021. Definitive endoderm differentiation was then specified by incubation with RPMI1640/B27 (Life Technologies) + 100 ng mL<sup>-1</sup> Activin A + 80 ng mL<sup>-1</sup> FGF2 for 1 day and RPMI/B27 + 50 ng mL<sup>-1</sup> Activin A for 2 additional days. Finally, the differentiation of hepatoblasts was driven by incubation in RPMI1640/B27 + 20 ng mL<sup>-1</sup> BMP4 + 10 ng mL<sup>-1</sup> FGF10. Cells were passaged on collagen I-coated plates on day 11 and cultured in a hepatocyte culture medium (Lonza, Levallois, France) + 20 ng mL<sup>-1</sup> hepatocyte growth factor (HGF) (Peprotech) + 20 ng mL<sup>-1</sup> Oncostatin M (Peprotech) + 0.1 mM dexamethasone (Sigma) until day 27.

#### Immunofluorescence of iPSC-derived HLCs

iPSC-derived cells were washed twice with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde (Euromedex, Souffelweyersheim, France) for 15 min at room temperature (RT) followed by three washes with PBS. The fixed cells were permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 15 min and blocked for 1 h with 3% bovine serum albumin (BSA) (Sigma) in PBS. The cells were then incubated with the primary antibodies (Table S1) overnight at 4 °C in the presence of 1% BSA in PBS. After three washes with PBS, they were incubated with the secondary antibodies (1 : 1000) in the dark with agitation for 1 h at RT. Cell nuclei were visualized by DAPI staining (0.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (Sigma), mounting the cells on glass slides with Faramount Aqueous mounting medium (Dako/Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Images were obtained using the EVOS FL Auto microscope and its software (Thermo Fisher Scientific).

#### RNA isolation, RT-PCR and qPCR

Total RNA was isolated using the RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) or Trizol (Invitrogen, Rockville, MD, USA) according to the manufacturers' recommendations. HB-iPSCs and iPSC-derived HLCs were also tested by RT-PCR to analyze the expression of specific markers



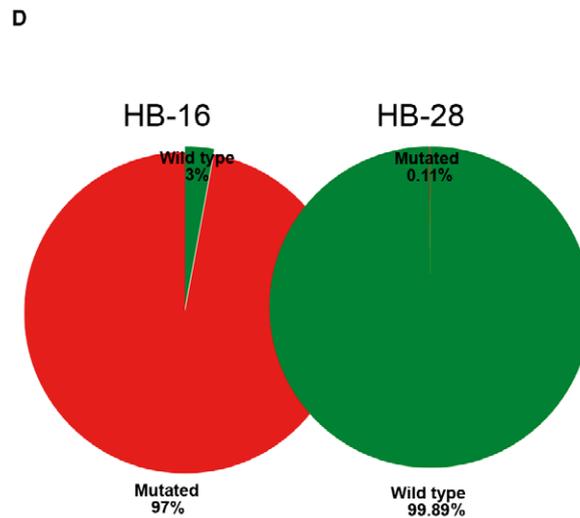
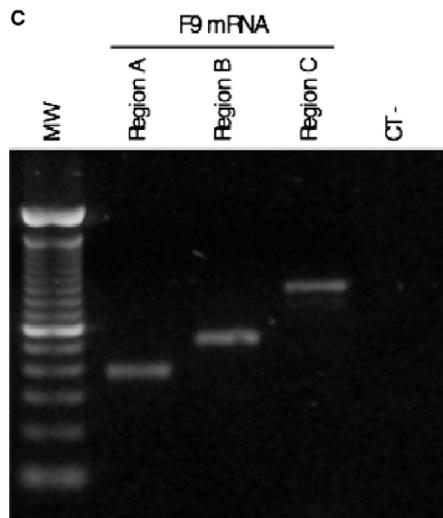
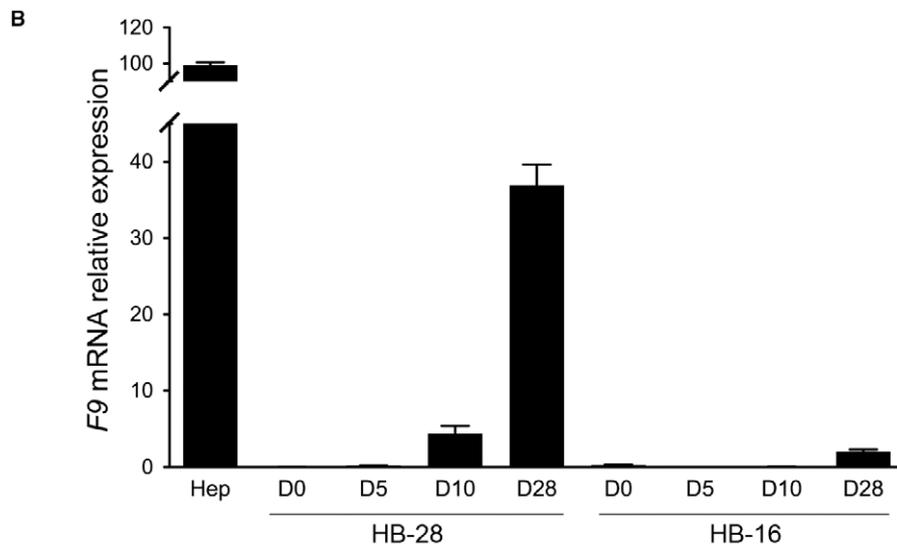
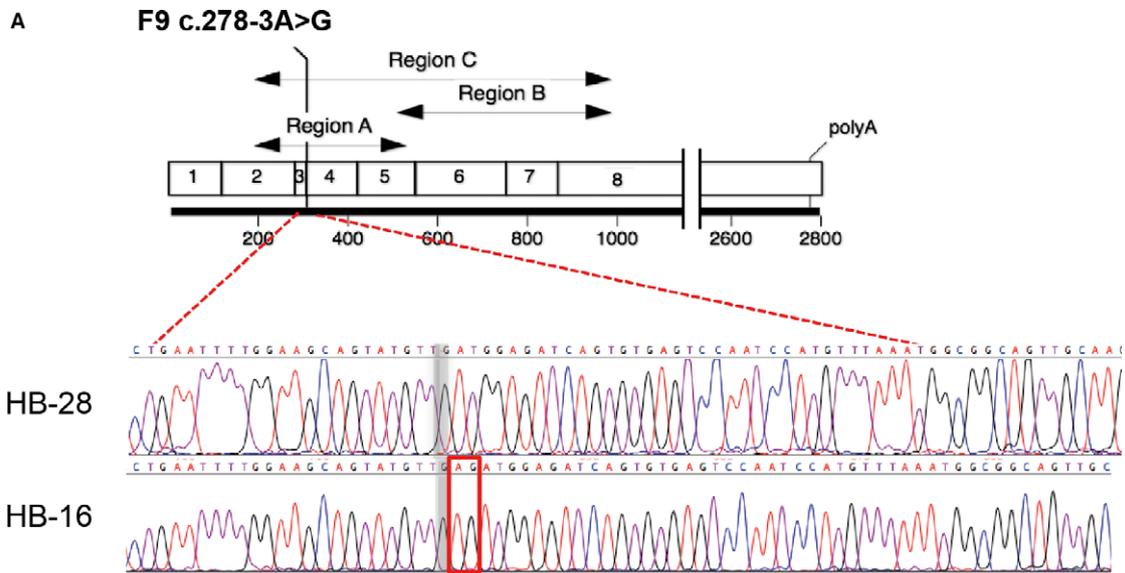
**Fig. 2.** Characterization of hepatocyte-like cells (HLCs) derived from hemophilia B (HB)-16 and HB-28 induced pluripotent stem cell (iPSC) clones. (A) Protocol used for iPSC differentiation into HLCs. Phase-contrast microscopy shows the morphology of the cells at days 0 (left) and 27 (right) of differentiation. (B) RT-PCR analyses showing the expression pattern during hepatic differentiation of both HB-16 and HB-28 iPSC clones. (C) Expression of hepatocyte markers analyzed by immunofluorescence in patient's (HB-16-derived) HLCs. The same hepatocyte markers were observed with HB-28 HLCs (data not shown). AFP,  $\alpha$ -fetoprotein; APOA2, apolipoprotein A2; ASGR, asialoglycoprotein receptor; A1AT,  $\alpha$ 1-anti-trypsin; CK19, cytokeratin 19; CYP3A4, cytochrome P450 3A4; FOXA2 and HNF4a, hepatocyte transcription factors.

during hepatic differentiation (days 0, 5, 11 and 21, corresponding to the pluripotent state, endoderm, hepatic progenitors and mature hepatocytes, respectively). A total of 500 ng of total RNA extracted with the RNeasy Mini Kit (Qiagen) in a final volume of 25  $\mu$ L were retrotranscribed using the High-Capacity cDNA reverse transcription kit (Thermo Fisher Scientific), according to the manufacturer's recommendations. An equal amount of cDNA was used to establish the expression of OCT4, NANOG, GATA4, SOX17, FOXA2, AFP, HNF4, ALB, CK18, CK19, CYP3A4 and F9 (primers listed in Table S2).

For quantitative analyses of factor F9 mRNA in HLCs, RT-qPCR was performed using TaqMan Universal Master Mix II, with uracil n-glycosylase (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. GAPDH (4333764F) served as the endogenous control and F9 mRNA was detected in a Taqman assay (Hs\_01592597\_m1).

#### F9 mRNA sequencing

Total RNA was retrotranscribed using the High Capacity cDNA reverse transcription kit (Thermo Fisher Scientific) as described above. The primers for massive sequencing were designed using the F9 cDNA (GenBank no. NM\_000133.3) to amplify the affected region of F9 mRNA, resulting in a 340-bp amplicon (A region) (Fig. 3A and Table S2). Cells from the human hepatocellular carcinoma cell line Huh-7 or adult primary hepatocytes (obtained from liver biopsies) served as positive controls. After cDNA synthesis, the three amplicons described in Fig. 3A were amplified using the FastStart High Fidelity PCR system (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) with an initial denaturation at 94  $^{\circ}$ C for 3 min, 30 cycles at 94  $^{\circ}$ C for 30 s, 65  $^{\circ}$ C for 30 s, and 72  $^{\circ}$ C for 1 min, followed by a final extension at 72  $^{\circ}$ C for 3 min. The PCR products were specifically indexed,



**Fig. 3.** *F9* mRNA expression in induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived hepatocyte-like cells (HLCs). (A) Location of the mutation (*F9* c.278-3A>G) and the regions amplified by RT-PCR (region A, from exons 2–5: 340 bp; region B, from exons 5–8: 478 bp; region C, exons 2–8: 797 bp), and Sanger sequencing showing inclusion of the AG dinucleotide (red box) at the exon 3/exon 4 boundary, as a result of an abnormal splicing. (B) Relative *F9* mRNA levels were measured by RT-qPCR during cell differentiation using the Taqman assay (Hs\_01592597\_m1) and GAPDH (4333764F) as the endogenous control. The results are expressed as the mean percentages of the control levels, measured in primary human hepatocytes ( $n = 3$ ). *F9* mRNA expression level in hemophilia B (HB)-16 HLCs was  $2.05\% \pm 0.65$  ( $n = 5$ ) on day 27 of differentiation, whereas in HB-28 HLCs expression was first detectable on day 10 and reached  $36.9\% \pm 2.71$  ( $n = 5$ ) on day 27. Error bars represent standard deviations. (C) Representative *F9* mRNA amplification in HB-16 HLCs on day 27. (D) *F9* mRNA massive sequencing. Illumina GA analysis of sequences spanning the affected exons of the *F9* mRNA provided relatively uniform sequence coverage, with a sequencing depth for each nucleotide position in the range of ~6000 to 30000 reads. The abnormal dinucleotide inclusion in the *F9* mRNA resulting from the *F9* c.278-3A>G mutation was the only unambiguous genetic variant identified in the analysis. The reads containing the exon 3 and 4 joining were extracted and aligned with the *F9* reference sequence. Pie charts show the percentages of mutated (red) and wt (green) amplicons from *F9* mRNA transcripts in HB-16 and HB-28 HLCs. Hep, primary human hepatocytes; MW, molecular weight, 100 bp ladder; CT-, negative control.

separated on a 1% agarose gel, and visualized by Syber<sup>®</sup> Safe staining (Thermo Fisher Scientific). They were then quantified with the Qubit<sup>®</sup> dsDNA BR assay kit in a Qubit fluorometer, normalizing the amounts using the SequelPrep<sup>™</sup> normalization plate kit (Thermo Fisher Scientific). The normalized products were sequenced in a Miseq sequencer using a Miseq reagent Nano kit v2 (Illumina, San Diego, CA, USA). The obtained sequences were assembled and aligned with the consensus wt *F9* cDNA sequence using the software CLC Genomics Workbench (Qiagen).

#### X chromosome inactivation analysis

The pattern of X inactivation was determined using the HUMARA assay with some modifications [6]. Briefly, genomic DNA was digested overnight with the methylation-sensitive Hpa II endonuclease, coupled with PCR analysis using FAM-fluorescently labeled primers. The amplified products were separated using an ABI 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems) as previously described [7]. The fragment size was estimated by comparison with the internal size standard Gene Scan ROX (Applied Biosystems).

## Results

#### Patients, iPSC generation and characterization

Skin biopsies were taken from the patient and his mother and the subsequently isolated fibroblasts were reprogrammed using  $\gamma$ -retroviral vectors encoding the four Yamanaka factors. Among all the colonies that were generated and isolated, representative colonies from the patient and the mother were selected, amplified and fully characterized as iPSC clones [3,4].

The stemness of the iPSCs was confirmed by (i) positive staining for AP (Fig. 1A); (ii) immunofluorescence-based detection of the expression of stem cell markers (Fig. 1A, Table S1); (iii) silencing of the transduced genes and induction of endogenous pluripotency genes (Fig. 1B); and (iv) the presence of early derivatives of the three germ layers after spontaneous differentiation *in vitro*

(Fig. 1C). HB-iPSCs maintained a normal karyotype (Fig. 1D) and short tandem repeat (STR) analysis confirmed the origin of the iPSC clones (Table S3). One iPSC clone for the patient and one for the mother, named HB-16 and HB-28, respectively, were selected for further studies.

#### iPSC differentiation into HLCs

Hepatocytes are the only cells of the body that express full-length *F9* mRNA and produce functional FIX. HB-16 and HB-28 iPSCs were thus differentiated into HLCs by adapting a protocol mimicking normal liver development, as previously described [5], (Fig. 2A). During this process, cells were first differentiated into definitive endoderm cells expressing FOXA2 at day 5 (Fig. 2B); then they were committed into bipotent hepatic progenitors co-expressing hepatocytic and biliary markers (HNF4a, AFP, APOA2 and CK19) at day 10 (Fig 2B, C, left panels). Finally, at day 27, cell morphology closely resembled that of hepatocytes (Fig. 2A, right picture) and HLCs expressed mature hepatocyte markers such as CYP3A4, ASGR, albumin and A1AT (Fig 2B, C, right panels). We thus amplified exons 2–8 of *F9* RNA, a region that can only be amplified using hepatocyte- or HLC-derived RNA that covers the patient's mutation, from both HB-16 and HB-28-HLC RNA.

#### Molecular analyses of *F9* mRNA

RT-qPCR of *F9* mRNA from HLCs and comparisons with primary hepatocyte *F9* mRNA levels showed a relative expression level of  $36.9\% \pm 2.7$  in the mother's and  $2.1\% \pm 0.7$  in the patient's HLCs (Fig. 3B). The incomplete differentiation/maturation into hepatocytes may account for the low level of *F9* mRNA expression in the HB-28 HLCs compared with primary hepatocytes, but it does not explain its much lower expression in the HB-16 HLCs. Indeed, HLCs from both the patient and the mother exhibited the same pattern of differentiation markers with no striking differences between them. However, nonsense-mediated decay (NMD), a cellular mechanism that degrades PTC-containing mRNAs, could

explain the very low level of *F9* mRNA observed in the HB-16 HLCs that express only the mutated transcript. Nevertheless, the interpretation of the level of *F9* mRNA expression in HB-28 HLCs must take into account from which X chromosome the *F9* transcripts are issued. Indeed, the X-chromosome inactivation pattern (XCIP) could have been modified during reprogramming of the mother's skin fibroblasts into HB-28 iPSCs [8]. Thus, depending on the actual XCIP pattern, either or both of the normal and mutated *F9* transcripts could be expressed in the HB-28 HLCs. To elucidate this point and to deeply analyze the sequence of the mutated transcript, we performed NGS analysis. We used three different sets of primers to amplify *F9* mRNA by RT-PCR in the HLCs (Fig. 3A, C).

Amplicon sequencing showed the creation of an abnormal splicing site in the vast majority of the transcripts from HB-16 HLCs that resulted in the inclusion of two additional nucleotides to *F9* mRNA in the exon 3/exon 4 boundary, leading to a frameshift and the generation of a PTC (Fig. 3A), as previously predicted [1]. However, the remaining 2.9% of the reads displayed the wt sequence (Table 1, Fig. 3D), suggesting some normal splicing of the mutated transcript and the existence of a residual FIX expression, although very limited if we take into account that the *F9* mRNA expression was very low in HB-16 HLCs. *F9* mRNA analysis of HB-28 HLCs indicated an extremely low percentage (0.1%) of mutated transcripts (Table 1), which led us to investigate the XCIP in the HB-28 iPSCs and the derived HLCs. Analyses using the HUMARA assay showed that the X-chromosome carrying the mutation was inactivated in the HB-28-iPSC clone and in all derived HLCs (Figure S1). This result explains the nearly exclusive presence of wt *F9* mRNA in HB-28 HLCs. Moreover, this result supports the hypothesis of the degradation of the mutated transcript by NMD in the HB-16 HLCs to explain the reduced level of *F9* mRNA in those cells compared with HB-28 HLCs. Finally, by combining the proportion of *F9* mRNA detected in HB-16 HLCs with respect to the levels observed in primary hepatocytes (about 2%) and the percentage of this mRNA that we found correctly spliced (about 3%), despite the limitations of this cellular model in mimicking the RD, we can roughly estimate that the total wt *F9* mRNA level in these RD HLCs is around 0.06% (3% of correctly spliced mRNA out of the 2% of

the total *F9* mRNA level with respect to that of normal hepatocytes; see Table 1), which is consistent with the patient's severe phenotype.

## Discussion

The present work describes the creation of a cellular model of HB, based on the iPSC paradigm. In this case, it allowed us to generate patient-specific HLCs carrying the RD mutation, to isolate hepatocyte-specific *F9* mRNA and to fully characterize the splicing mutation by NGS in a more physiological context. It also represents the first definitive demonstration, in the absence of currently living descendants, that the *F9* c.278-3A>G mutation is truly responsible for the hemophilic syndrome in the affected members of the European royal families. In addition, these results represent advances in two fields: first, it is the first time that HB has been modeled using patient-specific iPSCs, and second, it allows a more physiological (and thus more relevant) characterization of this mutation in comparison with that of a previous report that could only predict some of the consequences of this splicing mutation at the RNA level, as it was based on an artificial minigene-based system. The present work, which relies on the use of HLCs expressing *F9* mRNA, confirms the previously predicted consequences of the mutation at the RNA level, and provides novel information that could not be anticipated with the previously used approach. Indeed, in the case of intronic splicing mutations such as this one, *F9* transcripts must be analyzed, and this requires either primary cells of the relevant tissue (e.g. hepatocytes) or HLCs generated from the patient's iPSCs. However, in our case, because primary hepatocytes could not be obtained, the only way to get a real and meaningful picture of what occurs in the patient's hepatocytes was to differentiate the patient's iPSCs into HLCs. It is not possible to draw definitive conclusions on the reality of the abnormal splicing unless the entire mutated *F9* gene is expressed in hepatocytes or HLCs.

These results also provide new knowledge that may help in understanding the long-discussed issue of the unexpectedly high longevity (given the severity of the RD and the absence of existing replacement therapies at that time) of certain affected members of the European royal families. Indeed, one of the most intriguing aspects of the disease is that the average life expectancy of some

**Table 1** NGS analysis of *F9* mRNA amplicons

	% of <i>F9</i> mRNA (with respect to HPHs)	Total # of reads	# of mutated reads	% of mutated reads	# of wild-type reads	% of wild-type reads	% of wild-type <i>F9</i> mRNA/HPHs (column 2 × column 7)
HB-16 (patient)	2.1 ± 0.7	434225	421546	97.1	12679	2.9	0.06
HB-28 (mother)	36.9 ± 2.7	1049194	1049	0.1	1038702	99.9	36.86

HPHs, human primary hepatocytes.

affected European royalty members was clearly longer than that of contemporary or even more recently documented untreated patients with severe HB, estimated to be 11–25 years [9,10]. Indeed, although some affected members died at a very early age, others lived for several decades, such as Prince Leopold (1853–1884), Prince Waldemar of Prussia (1889–1945) or Alfonso and Gonzalo de Borbon (1907–1933 and 1914–1934, respectively, who were killed in car accidents).

These observations of historical records, along with previous reports showing a correlation between residual expression of *F8* mRNA and hemophilia A (HA) severity [11], suggest the possibility that some affected individuals might have suffered a less severe form of the disease. However, considering (i) the FIX activity (< 1%) at the time of diagnosis in the HB-16 patient and (ii) the fact that the F9 c.278-3A>G mutation was also reported by others as severe [12–14], it seems unlikely that the very low residual level of wt *F9* mRNA that we detect could have resulted in a moderate phenotype in the affected members of the royal families, unless there are other sources of variability. The confirmation of the predicted splicing mutation and the finding that mutated *F9* mRNA could be targeted by NMD, represent novel variables supporting this notion, as it has been shown that variability in the efficiencies of splicing [15,16] and NMD [17] machineries (e.g. in the expression levels or the existence of more or less active variants of the involved proteins) can result in huge inter-individual phenotypic differences. Indeed, a study carried out on 10 patients with cystic fibrosis and the 3849 + 10 kb C>T mutation showed a high percentage of variability (0–28%) in the levels of aberrantly spliced RNA transcribed in their nasal epithelia [15]. Thus, it is tempting to speculate, although this is merely theoretical, that these and/or other additional genetic traits might have attenuated the bleeding phenotype in some affected individuals of the royal families, although other socio-economic considerations, including special care received by these privileged individuals, may also have played an important role.

In summary, we report the first iPSC-based cellular model of HB. This technology allowed us to establish a *bona fide* HB model to characterize rare mutations, such as the one causing the RD, and we propose its use as a powerful tool to elucidate mutational mechanisms at the RNA level and to investigate correction strategies by gene therapy, genome editing and/or drugs targeting specific mutations.

## Addendum

L. Martorell performed differentiation experiments and molecular analyses and co-wrote the manuscript. J. L. Vazquez, Y. Richaud-Patin, S. Jimenez-Delgado and A. Raya generated and characterized iPSCs. E. Luce, A. Weber and A. Dubart-Kupperschmitt developed the

HLCs differentiation protocols, generated and characterized the HLCs and contributed to the writing of the manuscript. I. Corrales contributed to the NGS experiments. N. Borrás contributed to the lyonization experiments. S. Casacuberta-Serra contributed to the differentiation experiments. R. Parra and C. Altisent recruited the patients and contributed to data analysis. A. Follenzi participated in the design of the study and in the discussion of the results. A. Dubart-Kupperschmitt, A. Raya, F. Vidal and J. Barquinero equally contributed to the design, obtaining of funding and supervision of the different parts of the study. J. Barquinero co-wrote the manuscript and coordinated the study.

All authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgements

We thank the persons who agreed to participate in this study. We also thank V. Garcia Patos (Dermatology Service, Vall d'Hebron University Hospital) for performing the skin biopsies and I. Papadopoulos for help in characterizing patient-specific iPSCs. This study is part of the HEMO-iPS project (e-Rare-2 Programme, ERANET, European Union). Funding for this study was provided by the Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)/FEDER (refs. PI11/03024 and PI11/03029) and by the French National Research Agency (ANR) under the e-Rare-2 Programme 'Hemo-iPS' (ERANET, European Union). Additional funding was provided by ISCIII/FEDER (Ter-Cel RD16/0011/0024), ANR (2010-RFCS-004 'Liv-iPS'), MINECO (SAF2015-69706-R), AGAUR (2014-SGR-1460), CERCA Programme/Generalitat de Catalunya, and the European ASPIRE Awards in Hemophilia.

## Disclosure of Conflict of Interests

The authors state that they have no conflict of interest.

## Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Table S1.** List of primary antibodies used for iPSC and differentiated cell characterization.

**Table S2.** List of primers used for amplification of pluripotency-associated mRNAs, liver-specific mRNAs, *F9* mRNA, and DNA methylation analyses.

**Table S3.** STR analysis.

**Fig. S1.** X-chromosome inactivation (XCI) analysis.

## References

- 1 Rogaev EI, Grigorenko AP, Faskhutdinova G, Kittler EL, Moliaka YK. Genotype analysis identifies the cause of the "royal disease". *Science* 2009; **326**: 817.

- 2 Ramirez L, Altisent C, Parra R, Vidal F. The 'royal disease' mutation in a Spanish patient. *J Thromb Haemost* 2010; **8**: 2316–7.
- 3 Raya A, Rodriguez-Piza I, Navarro S, Richaud-Patin Y, Guenechea G, Sanchez-Danes A, Consiglio A, Bueren J, Izpisua Belmonte JC. A protocol describing the genetic correction of somatic human cells and subsequent generation of iPS cells. *Nat Protoc* 2010; **5**: 647–60.
- 4 Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, Vassena R, Bilic J, Pekarik V, Tiscornia G, Edel M, Boue S, Izpisua Belmonte JC. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* 2008; **26**: 1276–84.
- 5 Yang G, Si-Tayeb K, Corbinau S, Vernet R, Gayon R, Dianat N, Martinet C, Clay D, Goulinet-Mainot S, Tachdjian G, Tachdjian G, Burks D, Vallier L, Bouille P, Dubart-Kupferschmitt A, Weber A. Integration-deficient lentivectors: an effective strategy to purify and differentiate human embryonic stem cell-derived hepatic progenitors. *BMC Biol* 2013; **11**: 86.
- 6 Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet* 1992; **51**: 1229–39.
- 7 Cram DS, Ma K, Bhasin S, Arias J, Pandjaitan M, Chu B, Audrins MS, Saunders D, Quinn F, deKretser D, McLachlan R. Y chromosome analysis of infertile men and their sons conceived through intracytoplasmic sperm injection: vertical transmission of deletions and rarity of de novo deletions. *Fertil Steril* 2000; **74**: 909–15.
- 8 Pasque V, Plath K. X chromosome reactivation in reprogramming and in development. *Curr Opin Cell Biol* 2015; **37**: 75–83.
- 9 Konkle BA, Huston H, Nakaya Fletcher S. Hemophilia B. *GeneReviews® [Internet]* In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, Wallace SE, Amemiya A, Bean LJH, Bird TD, Ledbetter N, Mefford HC, Smith RJH, Stephens K, eds. Seattle, WA: University of Washington, 1993–2017.
- 10 Miguelino MG, Powell JS. Clinical utility and patient perspectives on the use of extended half-life rFIXFc in the management of hemophilia B. *Patient Prefer Adherence* 2014; **8**: 1073–83.
- 11 Liang Q, Xiang M, Lu Y, Ruan Y, Ding Q, Wang X, Xi X, Wang H. Characterisation and quantification of F8 transcripts of ten putative splice site mutations. *Thromb Haemost* 2015; **113**: 585–92.
- 12 Ketterling RP, Drost JB, Scaringe WA, Liao DZ, Liu JZ, Kasper CK, Sommer SS. Reported in vivo splice-site mutations in the factor IX gene: severity of splicing defects and a hypothesis for predicting deleterious splice donor mutations. *Hum Mutat* 1999; **13**: 221–31.
- 13 Kwon MJ, Yoo KY, Kim HJ, Kim SH. Identification of mutations in the F9 gene including exon deletion by multiplex ligation-dependent probe amplification in 33 unrelated Korean patients with haemophilia B. *Haemophilia* 2008; **14**: 1069–75.
- 14 Miller CH, Benson J, Ellingsen D, Driggers J, Payne A, Kelly FM, Soucie JM, Craig Hooper W, Hemophilia Inhibitor Research Study I. F8 and F9 mutations in US haemophilia patients: correlation with history of inhibitor and race/ethnicity. *Haemophilia* 2012; **18**: 375–82.
- 15 Chiba-Falek O, Kerem E, Shoshani T, Aviram M, Augarten A, Bentur L, Tal A, Tullis E, Rahat A, Kerem B. The molecular basis of disease variability among cystic fibrosis patients carrying the 3849 + 10 kb C→T mutation. *Genomics* 1998; **53**: 276–83.
- 16 Nissim-Rafinia M, Kerem B. The splicing machinery is a genetic modifier of disease severity. *Trends Genet* 2005; **21**: 480–3.
- 17 Nguyen LS, Wilkinson MF, Geicz J. Nonsense-mediated mRNA decay: inter-individual variability and human disease. *Neurosci Biobehav Rev* 2014; **46**(Pt 2): 175–86.

**Table S1. List of primary antibodies used for iPSC and differentiated cell characterization.**  $\alpha$ 1AT,  $\alpha$ 1 anti-trypsin; AFP,  $\alpha$ -fetoprotein; CK19, cytokeratin 19; HLC, hepatocyte-like cell; SMA, smooth muscle actin.

	<b>Antibody</b>	<b>Commercial Source</b>	<b>Reference</b>	<b>Dilution</b>	<b>Host</b>
Pluripotency	Anti-Tra-1-81	Millipore	MAB4381	1:200	Mouse
	Anti-Sox2	Pierce Antibodies/Thermo Fisher Scientific	PA1-16968	1:100	Rabbit
	Anti-SSEA-4	Developmental Studies Hybridoma Bank (U. of Iowa)	MC-813-70	1:3	Rat
	Anti-SSEA-3	"	MC-631	1:3	Rat
	Anti-Oct-3/4	Santa Cruz	sc-5279	1:60	Mouse
	Anti-Nanog	R&D Systems	AF1997	1:25	Goat
Mesoderm	Anti-SMA	Sigma	A5228	1:400	Mouse
	Anti-GATA-4	Santa Cruz	sc-9053	1:50	Rabbit
Endoderm	Anti-AFP	Dako	A0008	1:400	Rabbit
	Anti-FoxA2	R&D Systems	AF2400	1:50	Goat
Ectoderm	Anti-Tuj1	BioLegend	MMS-435P	1:500	Mouse
	Anti-GFAP	Dako	Z0334	1:500	Rabbit
HLC differentiation	Anti-Oct-4	Santa Cruz	sc-5273	1:200	Mouse
	Anti-Gata 4	"	sc-1237	1:200	Goat
	Anti-FoxA2	"	sc-6554	1:200	Goat
	Anti-AFP	"	sc-8399	1:200	Mouse
	Anti-CK19	Dako	M0888	1:200	Mouse
	Anti-HNF4 $\alpha$	Santa Cruz	sc-8987	1:200	Rabbit
	Anti- $\alpha$ 1AT	Dako	A0012	1:200	Rabbit

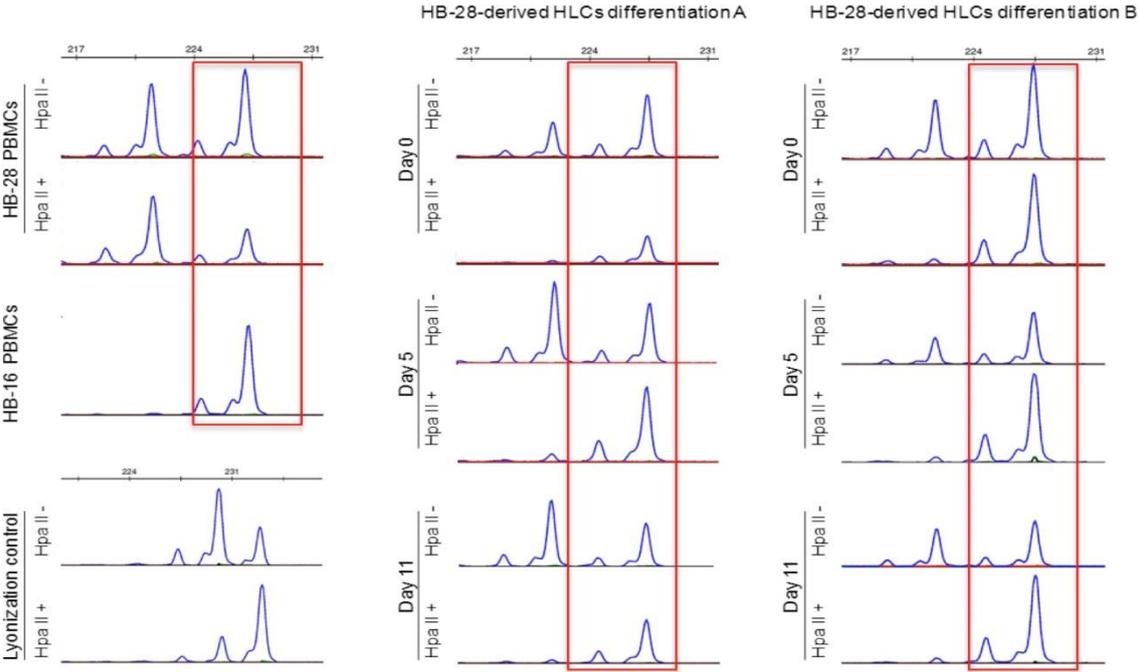
**Table S2. List of primers used for amplification of pluripotency-associated mRNAs, liver-specific mRNAs, F9 mRNA, and DNA methylation analyses.**

	<b>Primer name</b>	<b>Primer Sequence 5'-3'</b>	
<b>Exogenous and endogenous pluripotency genes</b>	Oct4TotalF	GGAGGAAGCTGACAACAATGAAA	
	Oct4TotalR	GGCCTGCACGAGGGTTT	
	Sox2TotalF	TGCGAGCGCTGCACAT	
	Sox2TotalR	TCATGAGCGTCTTGGTTTTCC	
	Klf4TotalF	CGAACCCACACAGGTGAGAA	
	Klf4TotalR	GAGCGGGCGAATTTCCAT	
	MycTotalF	AGGGTCAAGTTGGACAGTGTCA	
	MycTotalR	TGGTGCATTTTCGGTTGTTG	
	TransOct4F	TGGACTACAAGGACGACGATGA	
	TransOct4R	CAGGTGTCCC GCCATGA	
	TransSox2F	GCTCGAGGTTAACGAATTCATGT	
	TransSox2R	GCCCGGCGGCTTCA	
	TransKlf4F	TGGACTACAAGGACGACGATGA	
	TransKlf4R	CGTCGCTGACAGCCATGA	
	TransMycF	TGGACTACAAGGACGACGATGA	
	TransMycR	GTTCTGTGGTGAAGCTAACGT	
	NanogF	ACAACCTGGCCGAAGAATAGCA	
	NanogR	GGTTCCCAGTCGGGTTTCCAC	
	CriptoF	CGGAAGTGTGAGCACGATGT	
	CriptoR	GGGCAGCCAGGTGTCATG	
	Rex1F	CCTGCAGGCGGAAATAGAAC	
	Rex1R	GCACACATAGCCATCACATAAGG	
	GapDHF	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	
	GapDHR	AGGGATCTCGCTCCTGGAA	
	Oct4_BSS_F	GGATGTTATTAAGATGAAGATAGTTGG	
	Oct4_BSS_R	CCTAAACTCCCCTTCAAATCTATT	
	Nanog_BSS_F	AGAGATAGGAGGGTAAGTTTTTTTT	
	Nanog_BSS_R	ACTCCCACACAACTAACTTTTATTC	
<b>Liver-specific genes</b>	FOXA2.1	AACACCACTACGCCCTTCAACCA	
	FOXA2.2	GCAACACCGTCTCCCCAAAGTC	
	HNF4 $\alpha$ .1	CGGGTGTCCATACGCATCCTTG	
	HNF4 $\alpha$ .2	GACCCTCCCAGCAGCATCTCCT	
	APOA2.1	GGAGAAGGTCAAGAGCCCAGAG	
	APOA2.2	AGCAAAGAGTGGGTAGGGACAG	
	CYP3A4.1	CAGAACTTCTCCTTCAAACCTTGT	
	CYP3A4.2	CAATGCATGTACAGA ATCCCCGGT	
	ASGR.1	TAGGAGCCAAGCTGGAGAAA	
	ASGR.2	ACCTGCAGGCAGAAGTCATC	
	AFP.1	TTTTGGGACCCGAACCTTCC	
	AFP.2	CTCCTGGTATCCTTTAGCAACTCT	
	ALB.1	CCTTTGGCACAATGAAGTGGGTAACC	
	ALB.2	CAGCAGTCAGCCATTACCATAGG	
	ACTIN.1	GCACTCTTCCAGCCTTCCCTTCC	
	ACTIN.2	CTGCTGTCACCTTACCGTTCC	
	<b>F9</b>	F9RNA-1.1-1	GTTTGTTC AAGGGAACCTTG
		F9RNA-2.1.2	CTGGTTTTCTGCAAGTCGATA
F9RNA-2.1.2-1		TATCGACTTGCAGAAAACCAG	
F9RNA-2.2bis		CCAGAAGGGCAATGTCATGG	

**Table S3. STR analysis.** Tabulated results of 15 autosomal TR loci (AmpFLSTR Identifier Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Genetic profiles were obtained using an ABI Prism 3100-Avant genetic analyzer (Applied Biosystems). Data collection and analysis were performed using GenMapper software, version 3.7 (Applied Biosystems).

STR Locus	STR Analysis						
	Relative carrier (mother)			HB/RD patient			
	PBMCs	Fibroblast	iPSC clone 2	PBMCs	Fibroblast	iPSC clone 1	iPSC clone 2
D8S1179	10/15	10/15	10/15	12/15	12/15	12/15	12/15
D21S11	29/30	29/30	29/30	30/30	30/30	30/30	30/30
D7S820	11/11	11/11	11/11	8/11	8/11	8/11	8/11
CSF1PO	10/12	10/12	10/12	10/11	10/11	10/11	10/11
D3S1358	16/17	16/17	16/17	15/16	15/16	15/16	15/16
TH01	6/9	6/9	6/9	9/9	9/9	9/9	9/9
D13S317	13/14	13/14	13/14	13/14	13/14	13/14	13/14
D16S539	11/12	11/12	11/12	11/11	11/11	11/11	11/11
D2S1338	18/23	18/23	18/23	18/19	18/19	18/19	18/19
D19S433	13/13	13/13	13/13	13/13	13/13	13/13	13/13
vWA	19/20	19/20	19/20	18/19	18/19	18/19	18/19
TPOX	8/11	8/11	8/11	11/11	11/11	11/11	11/11
D18S51	14/15	14/15	14/15	14/17	14/17	14/17	14/17
D5S818	10/11	10/11	10/11	11/13	11/13	11/13	11/13
FGA	20/22	20/22	20/22	20/22	20/22	20/22	20/22
Amelogenin	XX	XX	XX	XY	XY	XY	XY

**Figure S1. X-chromosome inactivation (XCI) analysis.** Lyonization analyses using the HUMARA assay of PBMCs, undifferentiated iPSCs (day 0) and HB-28-HLCs. Whereas the primary PBMCs have the expected random XCIP, the iPSC clone used in the differentiation experiments and all the derived HLCs (n=3, shown n=2) exhibit the same pattern of XCI (the 227 sized X-chromosome) which was the X-chromosome carrying the RD mutation as shown by the pattern from patient’s PBMCs.



### III. Conclusion

Ce travail nous a permis d'étudier l'une des plus célèbres mutations responsables de l'hémophilie B, *F9* c.278-3A>G, plus communément appelée « mutation royale » car transmise par la reine Victoria à sa descendance, et ainsi à de nombreuses familles royales européennes aux XIX<sup>e</sup> et XX<sup>e</sup> siècles. La découverte en 2010 d'un patient porteur de cette même mutation, mais ne descendant pas de la famille royale, nous a permis d'obtenir un modèle d'iPSC de la maladie après reprogrammation des fibroblastes du patient. Ces iPSC, ainsi que celles obtenues à partir des cellules de sa mère, ont par la suite été caractérisées et la présence de la mutation a été confirmée dans les cellules du patient. Après différenciation de ces iPSC en hépatocytes et caractérisation des cellules différenciées, nous avons étudié l'ARNm du *F9* par séquençage haut débit. Nous avons ainsi pu confirmer l'épissage anormal prédit par le modèle bio-informatique de 2009 défini à partir des prélèvements réalisés sur les ossements du Tsarévitch Alexis, fils du tsar Nicolas II, ainsi que par le modèle développé dans les cellules COS7. Nous avons détecté un très faible niveau d'ARNm du *F9* muté dans les hépatocytes différenciés à partir des iPSC du patient par rapport aux cellules obtenues à partir des iPSC de sa mère. Ces résultats nous ont permis d'émettre l'hypothèse de la dégradation de ces ARNm par NMD (Nonsense Mediated Decay), un mécanisme de « contrôle qualité » des ARNm de la cellule eucaryote qui permet d'éliminer les ARN présentant un codon stop prématuré afin d'éviter la formation de protéines tronquées.

## Chapitre 2 : Modélisation et correction de l'hémophilie B

Dans ce chapitre, je commencerai par présenter certains résultats obtenus par ou avec Clara Steichen qui m'a précédée au laboratoire et qui a amorcé le projet de modélisation de l'hémophilie B grâce aux iPSC. Je développerai ensuite les résultats que j'ai moi-même obtenus. L'article, dont la soumission est prévue prochainement, sera présenté en fin de chapitre.

### I. Obtention des cellules de patients

#### A. Précédents prélèvements et essais de reprogrammation

Lors de mon arrivée au laboratoire, j'ai contribué au travail de Clara Steichen, comparant l'impact de la méthode de reprogrammation utilisée sur l'intégrité génomique des cellules iPSC : méthode intégrative à l'aide de vecteurs lentiviraux, ou non intégrative à l'aide d'ARNm modifiés (ARNmm) codant les facteurs de transcription décrits par Yamanaka. J'ai ainsi caractérisé les différents clones iPSC qu'elle a obtenus et participé à l'analyse des résultats bruts obtenus par nos collaborateurs sur les études génomiques. Ce travail, que je signe en deuxième auteur et qui figure en annexe, a été publié dans *Stem cells translational medicine*<sup>239</sup>. Cette technique ne nous a cependant pas permis d'obtenir de clones iPSC à partir de fibroblastes de patients hémophiles suivis par le Dr. Thierry Lambert, du Centre de Référence pour le Traitement des Hémophilies (CRTH) à l'Hôpital Bicêtre.

En parallèle de ses tentatives de reprogrammation à l'aide des ARNmm, Clara a tenté de reprogrammer ces mêmes fibroblastes de patients atteints d'hémophilie B sévère par des vecteurs lentiviraux polycistroniques OSKM. Elle a ainsi obtenu, avec les cellules de l'un d'entre eux, une lignée d'iPSC, appelée HB-iPSC dans la suite de ce document.

C'est à cette étape que j'ai intégré l'équipe et pris part à ce projet en participant d'abord à la caractérisation des HB-iPSC dont les résultats sont présentés dans l'article, en fin de chapitre.

En résumé, nous avons ainsi étudié l'expression de marqueurs de cellules souches, par immunofluorescence et par cytométrie en flux, comme OCT4, NANOG, SSEA4 (92% de cellules positives) et TRA1-80 (75%). Nous avons également vérifié la pluripotence de ces cellules 1) *in vitro* en étudiant l'expression de marqueurs de différenciation par RT-PCR après formation de corps embryoides et 2) *in vivo* en les injectant à des souris immunodéficientes puis en montrant, par analyse histologique, dans les tératomes formés, des tissus différenciés issus des trois feuillets embryonnaires.

Nous avons également vérifié la normalité du caryotype. Enfin, nous avons confirmé par séquençage la présence de la mutation responsable de la maladie dans les HB-iPSC. Le patient présente la mutation g.31280 G>A (c.1297G>A, p.E433K) dans l'exon 8 du facteur 9. Les résultats obtenus montrent la présence d'un triplet AAA correspondant à une lysine en lieu et place d'un triplet GAA correspondant à l'acide glutamique.

Nous n'avons cependant pu obtenir qu'un seul clone iPSC lors de cet essai de reprogrammation. J'ai donc par la suite réalisé d'autres expériences sur de nouveaux prélèvements.

## B. Nouveaux prélèvements

Toujours en collaboration avec le Dr. Thierry Lambert, nous avons obtenu 3 nouveaux prélèvements de patients hémophiles entre avril et septembre 2014. Les premiers prélèvements de patients disponibles au laboratoire étaient issus de biopsies de peau, mais les interventions chirurgicales au cours desquelles sont obtenus ces prélèvements étant peu fréquentes, nous avons demandé à obtenir des prélèvements de sang.

### a. Tentative de reprogrammation à partir d'ECFC

A la réception du premier prélèvement de sang, nous avons tenté avec Clara d'isoler les ECFC (Endothelial Colony Forming Cells), qui sont des cellules de type Progéniteurs Endothéliaux Circulants (PEC) qui ont une grande capacité de prolifération clonale et sont particulièrement susceptibles à la reprogrammation<sup>440</sup>. Nous avons tout d'abord isolé les cellules mononuclées adhérentes (PBMC pour Peripheral Blood Mononuclear Cells) par une étape de Ficoll (fig.27). Nous avons ensuite réalisé un tri CD34+ par billes magnétiques afin d'isoler les cellules souches hématopoïétiques et de congeler les cellules CD34- dont nous pourrions isoler plus tard les lymphocytes ou les érythroblastes, qui sont des cellules potentiellement utilisables pour la reprogrammation. Nous avons ensuite ensemencé les cellules mononuclées, après plusieurs lavages, sur des boîtes précoatées au collagène I, dans un milieu de culture spécifique aux cellules endothéliales.

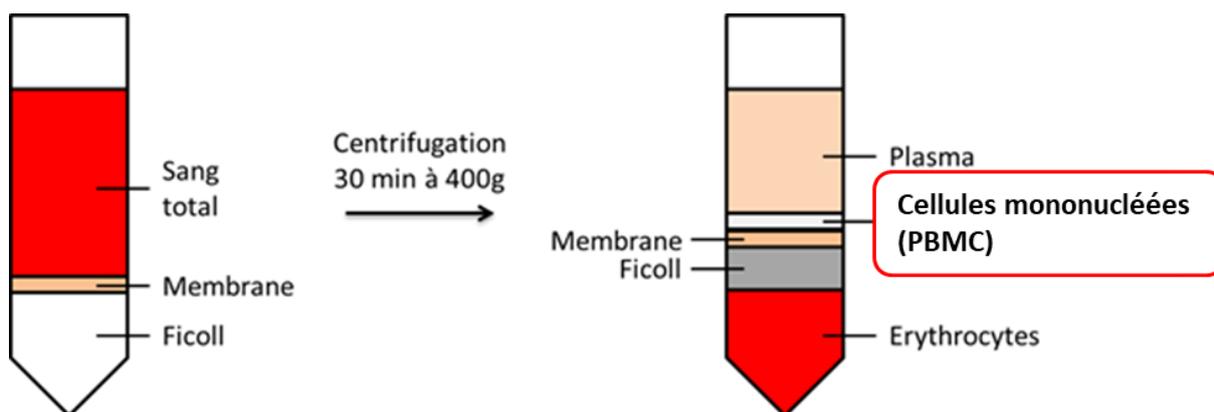


Figure 27: Principe d'isolement des PBMC à partir d'un prélèvement de sang total.

En théorie, l'isolement d'ECFC est assez simple, mais les chances de succès sont souvent faibles car le nombre d'ECFC est estimé à 0.05-0.2 cellules/ml dans le sang périphérique adulte. Dans cette expérience par exemple, nous n'avons pas obtenu d'ECFC.

Afin de maximiser nos chances de réussite, nous avons décidé d'utiliser d'emblée les PBMC, sans isolement des ECFC, pour nos futures expériences de reprogrammation.

### *b. Tentatives de reprogrammation à partir de PBMC*

J'ai reçu en juillet 2014 un second prélèvement de sang de patient à partir duquel j'ai réalisé un ficoll, comme présenté précédemment, et isolé les PBMC. J'ai ainsi obtenu  $80 \times 10^6$  PBMC à partir de 40ml de sang. J'ai congelé une grande partie de ces cellules et gardé une autre partie en culture pendant 2 à 3 jours dans un milieu spécifique complété en cytokines pour l'expansion des cellules hématopoïétiques. J'ai réalisé le même isolement/congélation sur un dernier prélèvement fin septembre 2014, après obtention de  $164 \times 10^6$  PBMC dans 60ml de sang.

Les premiers essais de reprogrammation à l'aide des ARNm n'ayant pas été concluants, j'ai tenté de reprogrammer ces cellules par deux techniques en parallèle, en utilisant :

- une méthode intégrative, avec des vecteurs lentiviraux polycistroniques OSKM fournis par Vectalys
- une méthode non intégrative, avec des pseudo-particules virales (en anglais Virus-like Particles, VLP) OSKM

#### *i. Essai de reprogrammation par des vecteurs lentiviraux OSKM*

J'ai donc utilisé un vecteur lentiviral polycistronique à une multiplicité d'infection (MOI pour Multiplicity Of Infection) de 30 afin de transduire 100.000 PBMC en culture dans du milieu sans sérum SynH, de chez ABCell-Bio complété en SCF (c-kit Ligand) (50ng/ml), IL-3 (Interleukine 3) (10ng/ml), EPO (érythropoïétine) (2U/ml), Dexamethasone (1 $\mu$ M) et IGF-1 (insulin-like growth factor-1) (40ng/ml). J'ai réalisé deux transductions de 6 heures, à 24h d'intervalle puis transféré, après 48h de culture, 50.000 cellules transduites sur geltrex et 50.000 sur des cellules nourricières de souris appelées MEF (pour Mouse embryonic fibroblasts). J'ai ensuite séquentiellement changé le milieu de culture SynH pour du milieu de culture pour cellules souches (Nutristem pour les cellules sur Geltrex et milieu KOSR pour les cellules sur MEF).

J'ai pu observer durant les semaines suivantes quelques clusters de cellules débutant un changement morphologique mais le processus n'a pas évolué jusqu'au bout et je n'ai obtenu aucune colonie iPSC.

#### *ii. Essai de reprogrammation par des VLP OSKM*

Les VLP, ou pseudo-particules virales, sont des particules virales sans génome, donc incapables de se multiplier et de faire un cycle infectieux complet, mais toujours capables d'entrer dans les cellules avec la même efficacité qu'un virus. Elles sont obtenues par l'assemblage spontané de protéines de la capsid d'un virus et pouvant encapsuler des protéines synthétisées par la cellule productrice si ces dernières ont des signaux d'adressage. Elles sont, jusqu'à présent, le plus souvent utilisées en clinique pour la vaccination car elles permettent la libération de leur contenu protéique au sein des cellules sans transfert de matériel génétique.

Afin de mettre au point les conditions de reprogrammation et surtout l'efficacité de transduction des VLP, je disposais de VLP-GFP que j'ai donc utilisées en transduisant des PBMC avec des MOI

croissantes (10, 20, 40 et 80) de VLP-GFP. En me basant sur le protocole mis au point au laboratoire pour la reprogrammation avec les ARNm, j'ai réalisé une série de trois transductions de VLP tous les deux jours. Après 1, 3 et 6 jours de transduction avec les VLP-GFP, j'ai analysé les cellules en cytométrie en flux. Les résultats sont présentés dans la figure 28. J'ai pu observer que le pourcentage de cellules GFP positives n'était pas proportionnel à la MOI, mais que les MOI 10 et MOI20 ne semblaient pas suffisantes, seulement 10 à 15% des cellules étant positives pour la GFP après 6 jours.

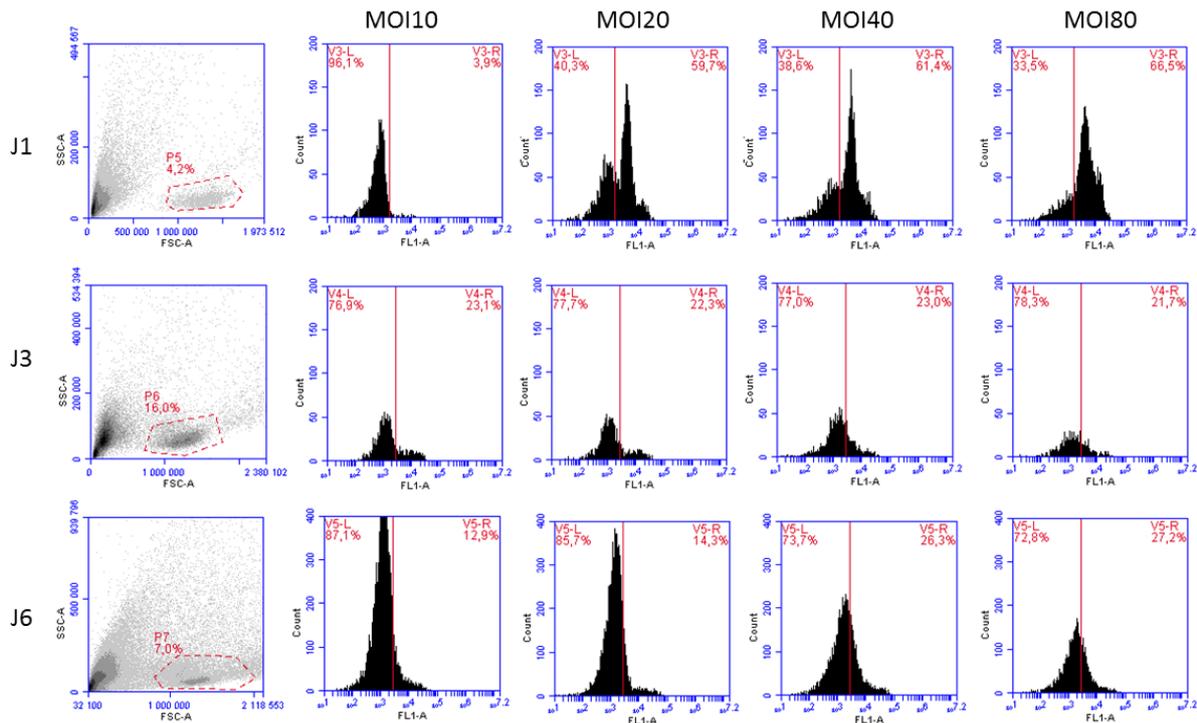
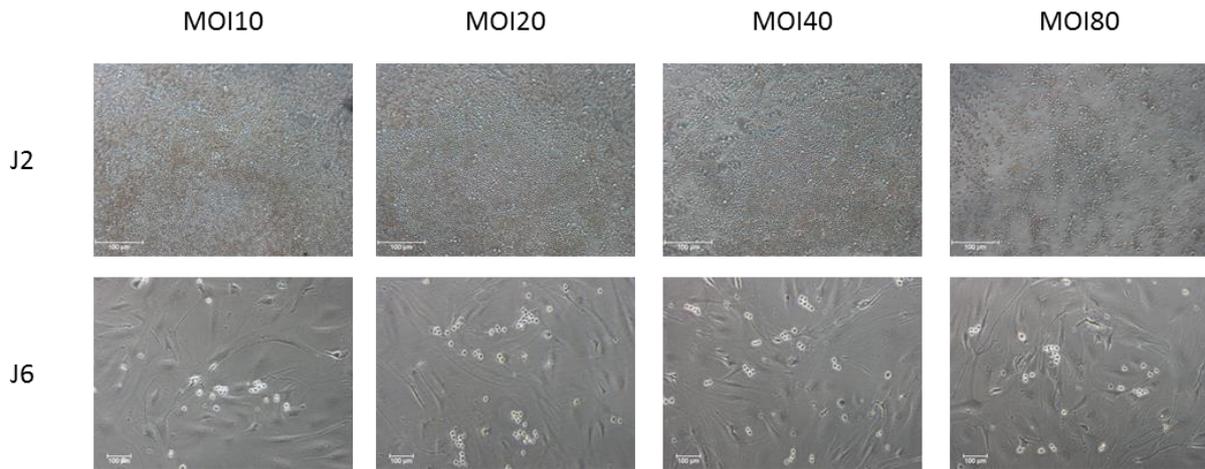


Figure 28: Analyse par cytométrie en flux de cellules PBMC de patient après transduction par des VLP-GFP

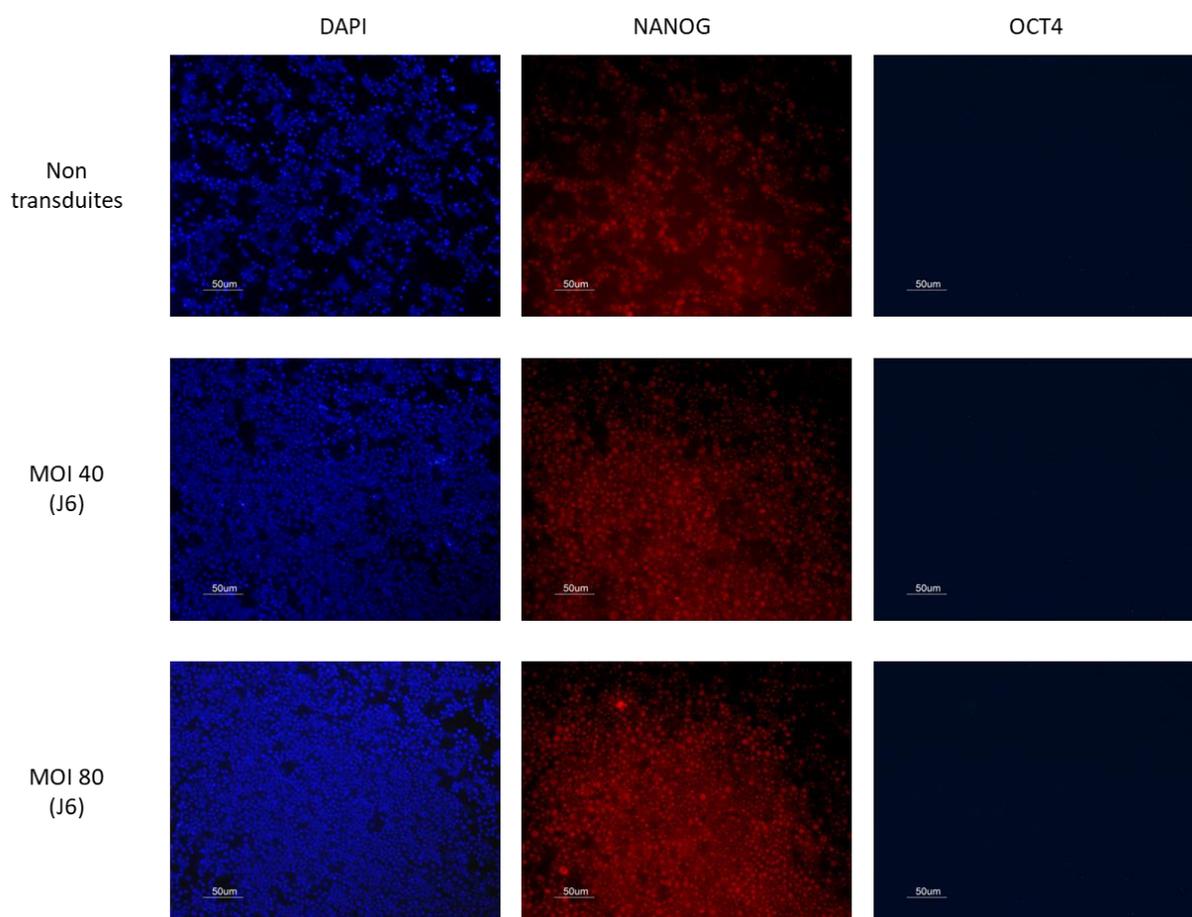
De plus, comme le montre la figure 29, très peu de cellules ont adhéré sur MEF et, comme pour l'essai de reprogrammation à l'aide des vecteurs lentiviraux, j'ai pu observer durant les semaines suivantes quelques regroupements de cellules ayant changé de morphologie se former en milieu KOSR mais aucun ressemblant réellement à un clone d'iPSC.



**Figure 29:** Morphologie des cellules PBMC transduites à différentes MOI de VLP-OSKM (Photographies à J2 : grossissement 4X ; photographies à J6 : grossissement 10X)

J'ai alors réalisé un deuxième essai à l'aide des VLP-OSKM, dans lequel j'ai cette fois transduit mes cellules à 8 reprises, tous les deux jours, aux MOI 40 et 80, toujours en présence de B18R. Cette fois, j'ai passé mes cellules sur Geltrex après 5 jours et utilisé un milieu TeSR-E7 de chez StemCell, milieu sans sérum, optimisé pour la reprogrammation par la méthode des épisomes en feeder-free.

Après 6 jours de transfection, j'ai étalé sur lame une partie des cellules et les ai fixées à la PFA 4% afin de les analyser par immunofluorescence. Comme le montre la figure 30, je n'ai obtenu aucun marquage OCT4 à MOI 40 ni à MOI 80. OCT4 étant un acteur clé de la reprogrammation, ces résultats ne présageaient rien de bon pour la suite de la manipulation et en effet je n'ai pu, malgré 8 transductions successives, obtenir aucune colonie iPSC.



**Figure 30:** Analyses par immunofluorescence des protéines OCT4 et NANOG après cytopspin des cellules PBMC transduites à différentes MOI de VLP-OSKM (20X)

Suite à ces échecs, nous avons décidé de faire appel à un prestataire extérieur pour la reprogrammation par transfection d'épisomes des cellules de patients hémophiles B.

### *c. Prestataire extérieur*

Nous avons donc fourni des échantillons de PBMC isolées à partir des 3 derniers patients hémophiles en notre possession à une entreprise spécialisée dans la reprogrammation de fibroblastes ou de cellules sanguines par une méthode non intégrative. Cependant, malgré leur expertise, confirmée par la reprogrammation réussie de cellules que nous leur avons fournies provenant de patients atteints d'autres pathologies héréditaires, aucun clone iPSC n'a été obtenu non plus entre leurs mains.

Cette « déveine » persistante sera discutée à la fin du manuscrit.

Je me suis donc concentrée pendant le reste de ma thèse sur le seul et unique clone iPSC issu de cellules de patient hémophile B à ma disposition : HB-iPSC.

## II. Différenciation hépatocyttaire du clone HB-iPSC

Afin de différencier les iPSC en hépatocytes, j'ai adapté un protocole du laboratoire pour la différenciation de cellules embryonnaires humaines en hépatoblastes<sup>441</sup>, par l'ajout successif de concentrations choisies de cocktails de facteurs de croissance intervenant lors du développement embryonnaire et fœtal du foie. Les mises au point nécessaires ont été un peu laborieuses car les cellules HB-iPSC sont en fait très sensibles en culture et se différencient très rapidement spontanément. Le protocole que j'ai établi, ainsi que la caractérisation des cellules différenciées, sont présentés dans l'article, à la fin de ce chapitre.

Afin d'apporter la preuve du concept d'une thérapie cellulaire et génique autologue de maladies héréditaires du foie comme l'hémophilie B par la transplantation d'hépatocytes différenciés à partir des cellules iPSC de patients, j'ai ensuite corrigé le défaut génétique des cellules HB-iPSC.

## III. Correction génétique

### A. Construction du plasmide

Pour corriger le déficit génétique des cellules de patients hémophiles B, une construction plasmidique avait été préparée au laboratoire avant mon implication dans ce projet (fig.31).

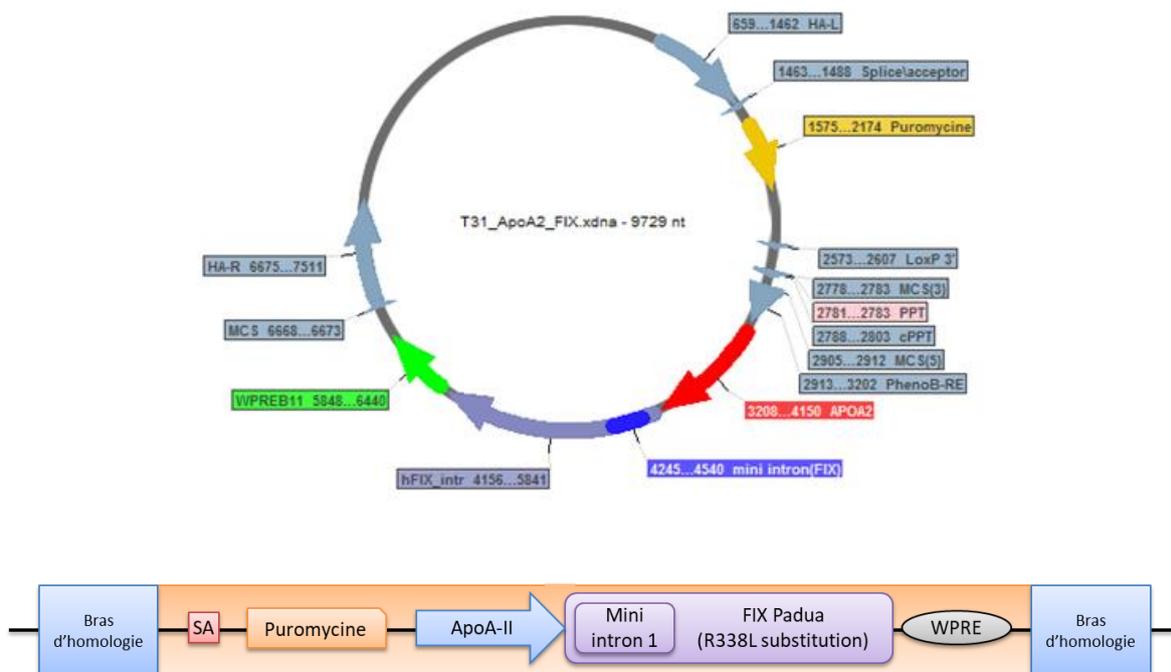


Figure 31: Plasmide et cassette de correction

La cassette de correction est composée d'un mini-gène *F9* contenant une forme tronquée de l'intron 1 du *F9*. Il a été montré que la présence de l'intron 1 du *F9* permettait une augmentation de la production de FIX en facilitant l'export nucléaire des ARNm et donc l'efficacité de traduction en protéine<sup>442</sup>. Ainsi, les deux jonctions intron-exon de l'intron 1 du FIX ont été hybridées. La construction du mini-gène *F9* a ensuite été validée dans des cellules DAMI montrant une forte intensité de fluorescence des cellules après marquage par immunofluorescence du FIX.

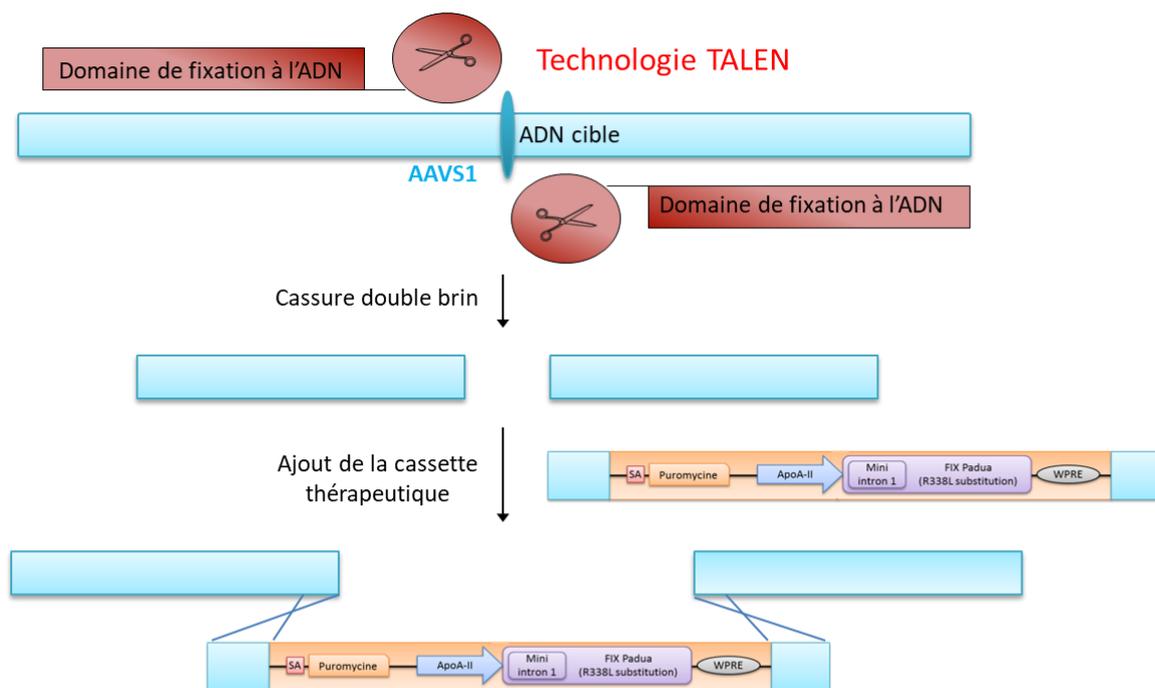
Le mini-gène *F9* possède aussi la mutation Padua (R338L)<sup>443</sup> qui augmente l'activité spécifique du FIX de huit fois. Le contrôle transcriptionnel par le promoteur hépato-spécifique *APOA2* (apolipoprotéine A2) permet de restreindre l'expression du FIX aux hépatocytes. Elle possède également une séquence du gène de résistance à la puromycine, afin de permettre une sélection des clones. Elle est intégrée dans un plasmide dont l'insert est flanqué de deux bras d'homologie de 500pb permettant la recombinaison homologue au niveau du site AAVS1 (adenovirus-associated virus intégration site 1), le site préférentiel d'intégration des AAV sur le chromosome 19 dans le génome humain. Il a été montré que l'introduction de séquences exogènes au niveau de ce site ne perturbe pas le fonctionnement du génome et assure l'expression du transgène<sup>444</sup>. Entre ces séquences d'homologie, la séquence SA est une séquence accepteur d'épissage qui permet l'expression du gène de résistance à la puromycine. La séquence codante de la résistance à la puromycine n'ayant pas de promoteur spécifique, elle ne s'exprimera que s'il y a intégration de la cassette dans le premier intron d'un gène dont le premier exon est non codant, comme c'est le cas du gène AAVS1. La cassette thérapeutique est suivie d'une séquence WPRE (Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element) destinée à faciliter le transport cytoplasmique de l'ARNm FIX.

## B. Approches de correction

Il a été choisi dans un premier temps d'utiliser la technologie des TALEN afin d'insérer la cassette thérapeutique à un site ciblé unique dans chacun de ces trois modèles. Par la suite, plusieurs articles ont été publiés montrant la possibilité d'insérer du matériel génétique à l'aide de la technologie des CRISPR, qui paraissait plus efficace que la méthode précédente. J'ai ainsi testé successivement ces deux approches.

### a. Premier outil choisi : les TALEN

Afin d'insérer cette cassette dans le génome des iPSC, j'ai utilisé la technique des TALEN (fig.32). Comme évoqué précédemment, le site d'intégration ciblé étant le site AAVS1, cette cassette contient des bras d'homologie correspondant aux séquences génomiques de ce site, de part et d'autre du site de coupure de l'ADN.



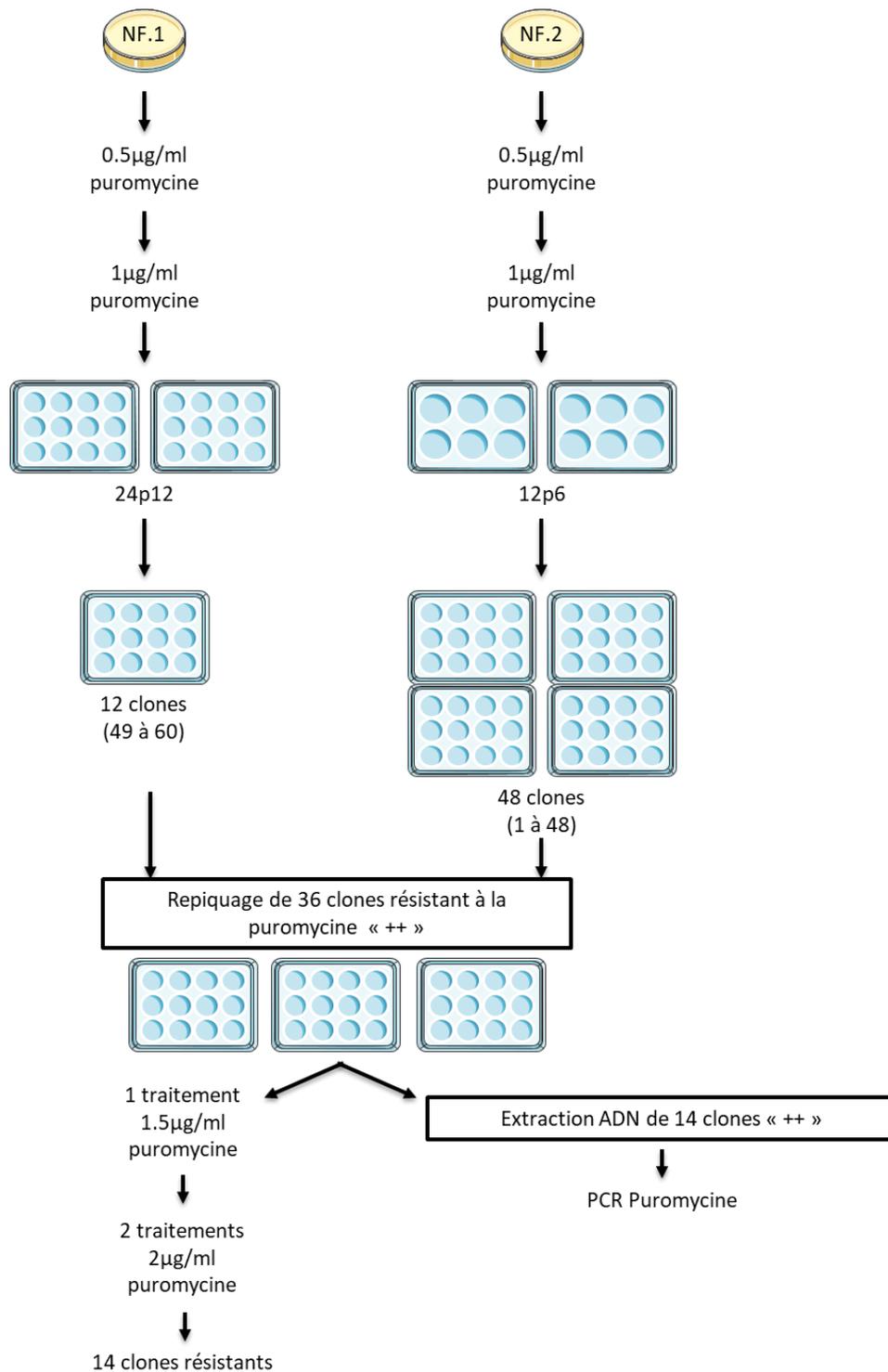
Intégration de la cassette thérapeutique par recombinaison homologue

**Figure 32:** Stratégie de correction du génome par la technologie des TALEN et intégration de la cassette thérapeutique au site AAVS1

Les HB-iPSC à passage 34 ont été cultivées sur Geltrex jusqu'à confluence puis dissociées à l'acutase. 2 millions de cellules ont été nucléofectées (Amaya, programme A023) en présence de 5µg de chaque TALEN et 2µg du plasmide thérapeutique. J'ai ensuite réensemencé les cellules sur Geltrex, et commencé la sélection par la puromycine après 6 jours de culture. J'ai réalisé 5 séquences successives de sélection par la puromycine, en augmentant progressivement la dose de 0.5 à 2µg/ml. Ceci permet de réaliser une réelle sélection progressive des cellules ayant intégré la cassette, car la puromycine à haute dose est trop toxique et induit une mort de toutes les cellules, même celles qui ont intégré la cassette de correction. A l'inverse, une dose trop faible ne permet aucune sélection.

Tout au long des étapes de sélection par la puromycine, j'ai progressivement « dilué » les cellules résistantes à l'antibiotique afin de les isoler. Après 3 semaines de traitement, j'ai finalement obtenu 14 clones résistants à la puromycine dont j'ai extrait l'ADN afin de vérifier par PCR la présence de la cassette de correction.

Les différentes étapes de l'expérience sont résumées dans la figure 33.

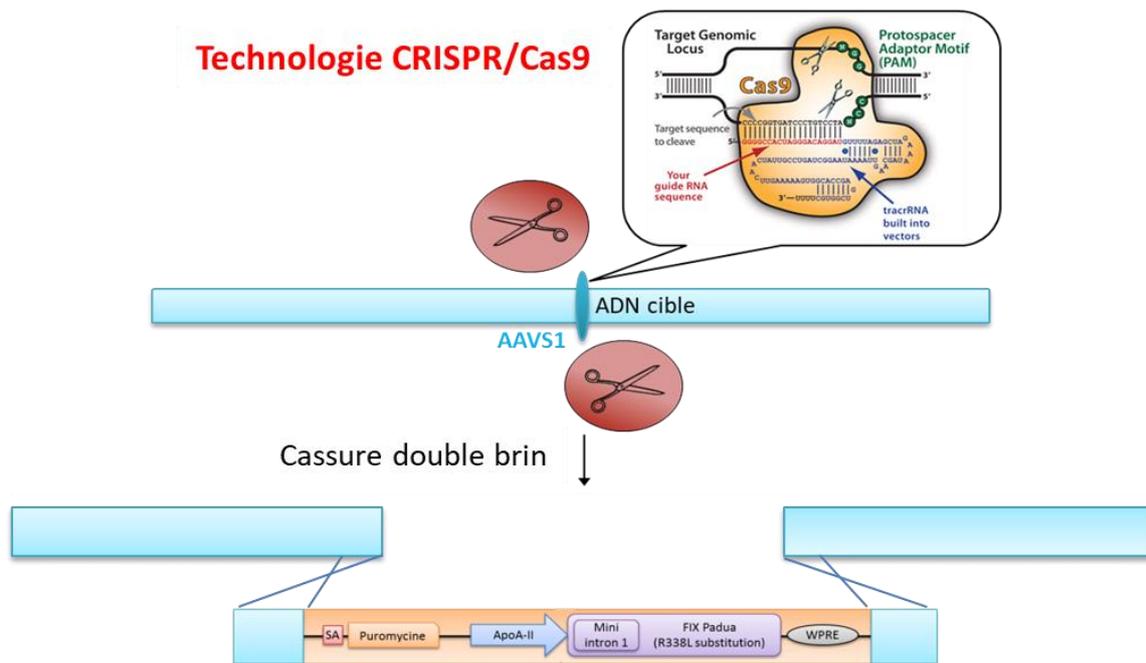


**Figure 33:** Protocole de correction du défaut génétique des HB-iPSC mis au point par la technologie des TALEN

Malheureusement, une contamination bactérienne massive dans notre L2 m'a fait perdre l'ensemble des clones obtenus avant que j'ai pu les amplifier et les congeler. Entre temps, la technologie CRISPR/Cas9 étant devenue disponible, j'ai alors utilisé cet outil pour une seconde tentative de correction de mon clone HB-iPSC.

*b. Deuxième outil testé : technologie des CRISPR/Cas9*

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la correction génétique par la technologie des CRISPR/Cas9 repose sur l'association de la caspase 9, d'un ARN guide et d'une cassette thérapeutique (fig.34).



Intégration de la cassette thérapeutique par recombinaison homologue

**Figure 34:** Stratégie de correction du génome par la technologie des CRISPR/Cas9 et intégration de la cassette thérapeutique au site AAVS1

Tout comme pour la correction à l'aide des TALEN, j'ai nucléofecté 2 millions d'iPSC cultivées sur Geltrex et dissociées à l'acutase, avec cette fois 3 plasmides : un pour la caspase 9, un pour l'ARN guide ciblant le site AAVS1 et le dernier contenant la cassette thérapeutique présentée précédemment. J'ai ensuite réensemencé les cellules sur Geltrex et commencé la sélection par la puromycine après 9 jours de culture dans les mêmes conditions que précédemment décrites pour la sélection des clones corrigés avec les TALEN. J'ai réalisé 6 sélections à la puromycine en augmentant progressivement la dose de 0.5 à 2µg/ml.

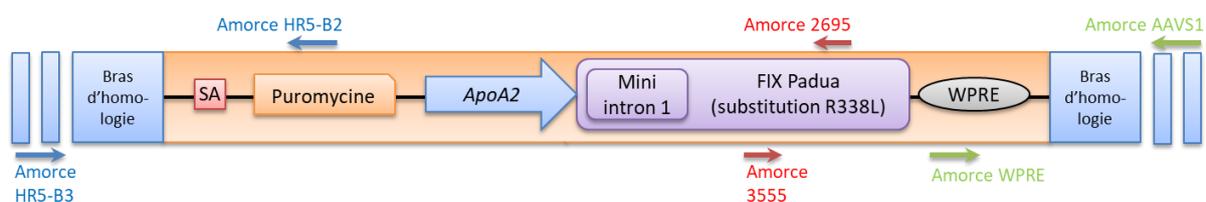
Cette fois encore, j'ai progressivement dilué les cellules résistantes à l'antibiotique afin de les isoler. Après 1 mois de traitement, j'ai finalement obtenu 48 clones résistant à la puromycine dont j'ai extrait l'ADN afin de vérifier par PCR la présence de la cassette.

J'ai confirmé la présence de la cassette au site d'insertion choisi dans 14 des 48 clones sélectionnés, soit une efficacité de correction de 29%. De plus, j'ai déterminé par PCR que l'insertion de la cassette

de correction était monoallélique dans ces 14 clones. Par la suite, j'ai amplifié deux de ces clones, choisis pour leur faible différenciation spontanée et leur comportement en culture, afin de vérifier leur pluripotence et la normalité de leur caryotype. Ces derniers résultats sont présentés plus en détail dans l'article, en fin de ce chapitre.

### C. Validation de la présence de la cassette thérapeutique dans les clones corrigés par séquençage

Afin de m'assurer de la présence de la cassette dans mes clones corrigés, j'ai extrait l'ADNg de ces cellules et réalisé plusieurs PCR dont j'ai par la suite fait séquençer les produits (fig. 35).



**Figure 35:** Localisation des amorces utilisées pour la validation des clones corrigés.

Ainsi, les résultats obtenus pour les fragments représentés en bleu et vert sur le schéma ont confirmé la présence des deux extrémités de la cassette dans nos iPSC corrigées. Le fragment représenté en rouge m'a permis quant à lui de confirmer la présence de la mutation Padua (R338L ; 31134G-T). Ce dernier résultat est présenté dans l'article, en fin de chapitre.

### D. Etude des insertions non ciblées

Cette partie du projet a été réalisée en collaboration avec l'équipe de Tuan Huy Nguyen à Nantes. Pour ce faire, 4 sites présentant une forte probabilité de coupure hors cible (GRK5 : G protein-coupled receptor kinase 5, CMB9 : région non codante, CPNE5 : copine 5 et CADPS2 : Calcium-dependent secretion activator 2) ont été sélectionnés sur le site Tefor ([www.tefor.net/crispor](http://www.tefor.net/crispor)) en fonction de la séquence de l'ARN guide. Des fragments PCR obtenus après amplification de ces 4 régions d'intérêt ont été déhybridés puis réhybridés lentement pour favoriser la formation d'hétéroduplexes sensibles à la digestion par l'endonucléase TE7, et permettant de détecter un mismatch de l'ADN se traduisant par la présence de deux bandes d'ADN après migration sur gel. Cette expérience a permis de déterminer qu'aucune insertion non ciblée n'avait eu lieu, dans les deux clones corr-HB-iPSC sélectionnés pour l'analyse, aux sites GRK5, CMB9 et CADPS2. En revanche, l'apparition de 2 fragments de 257 et 446 pb dans l'analyse du site CPNE5 montre une insertion non ciblée dans le génome des deux clones corr-HB-iPSC (fig.36).

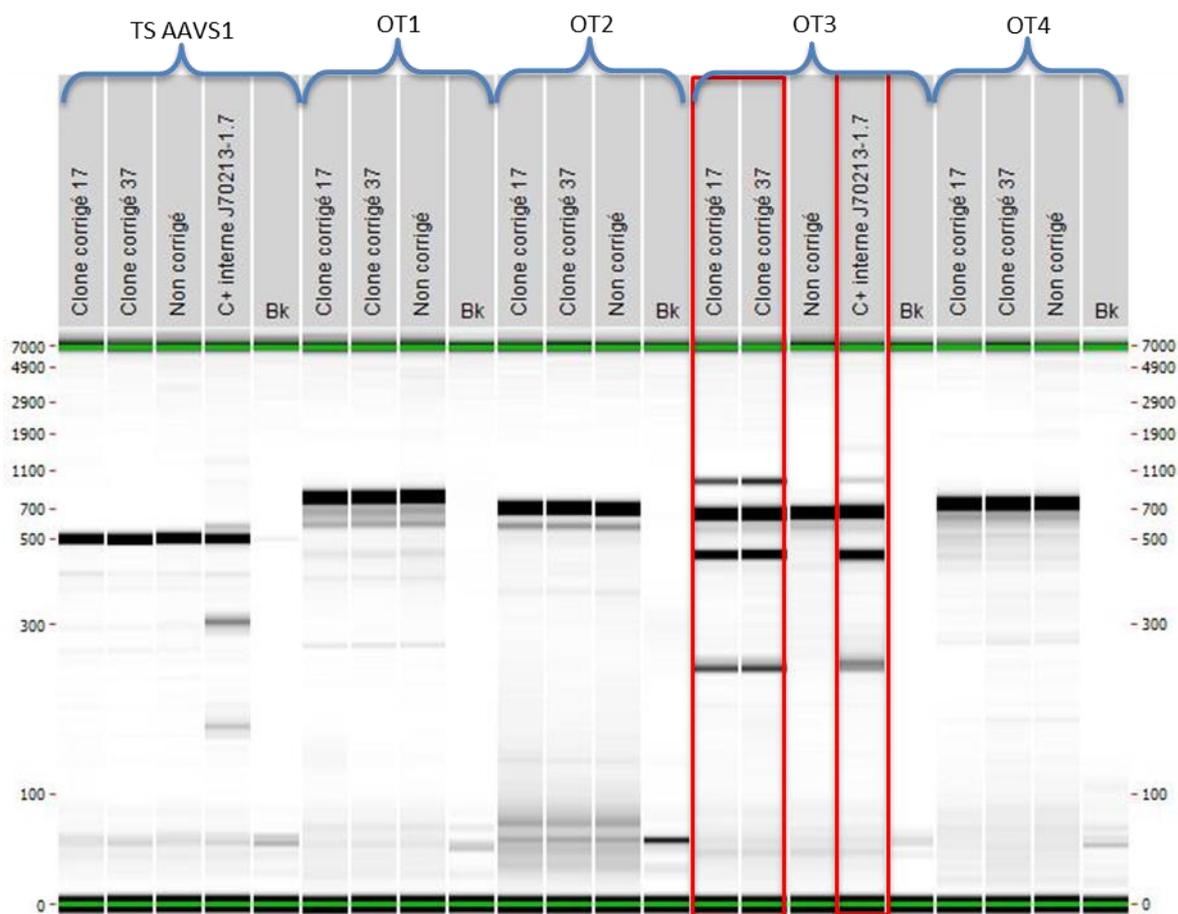


Figure 36: Etude de l'insertion non ciblée dans deux clones corr-HB-iPSC.

#### IV. Différenciation des iPSC corrigées en hépatocytes

L'étape suivante de mon projet consistait à vérifier que les iPSC corrigées avaient gardé leur potentiel de différenciation en hépatocytes et ainsi de valider la correction *in vitro*. Le FIX étant une protéine sécrétée par les hépatocytes matures adultes, j'ai également optimisé la maturation des cellules différenciées par un protocole de différenciation en 3D, via la formation d'agrégats.

##### A. Mise au point d'un protocole de différenciation dirigée en hépatocytes

Le protocole de différenciation hépatocytaire que j'ai mis au point, ainsi que la caractérisation par immunofluorescence, RT-PCR et RT-PCR quantitative des cellules différenciées obtenues, sont détaillés dans l'article présenté en fin de chapitre.

En résumé, sur les clones corrigés et non corrigés j'ai pu observer la même disparition progressive des marqueurs de pluripotence comme OCT4 et l'apparition de marqueurs hépatiques comme FOXA2, HNF4 $\alpha$ , AFP puis ALB par RT-PCR et immunofluorescence. L'ARNm du *F9* exprimé par la cassette thérapeutique dans les clones corrigés est détecté dans les stades précoces de la

différenciation (dès le jour 11), grâce au promoteur *APOA2*. J'ai d'ailleurs confirmé les résultats obtenus par RT-PCR en réalisant des analyses par RT-PCR quantitatives, montrant clairement une augmentation de la quantité d'ARNm du *F9* dans les clones corrigés entre J5 et J11 de différenciation et son absence dans les cellules non corrigées à ce stade. En effet, dans ces cellules, modèle de l'hémophilie B, l'ARNm du *F9* n'est pas détecté avant des stades très tardifs (jour 25).

#### B. Etude de la production de FIX par les hépatocytes dérivés des iPSC

L'étude de la production de FIX dans les cellules différenciées s'est avérée plus compliquée que prévu. En effet, j'ai eu tout d'abord beaucoup de mal à trouver un anticorps anti-FIX qui soit vraiment spécifique du FIX. Dans mes premières expériences de western blot, j'obtenais plusieurs bandes, dont la plupart était également présentes dans mes échantillons à J0 de la différenciation, au stade iPSC. Par la suite, j'ai mis au point les conditions pour réaliser une immunoprécipitation avant western blot. J'ai finalement réussi à visualiser le FIX produit par mes cellules à J30 de différenciation. Après quantification à l'aide du logiciel ImageJ, j'ai ainsi déterminé que mes cellules corrigées produisaient environ 2,7 fois plus de FIX que mes cellules non corrigées. Il s'est avéré que le FIX produit n'était pas de la même taille que le FIX détecté dans du plasma humain ou du FIXr (BeneFIX) analysés en parallèle. Comme évoqué dans l'introduction de ce manuscrit (Chap 4 – III), le FIX est synthétisé dans le foie sous forme d'une protéine inactive de 52kDa contenant un peptide signal permettant son transport vers le réticulum endoplasmique, et un propeptide nécessaire à la fixation de la  $\gamma$ -carboxylase vitamine K-dépendante<sup>376</sup>. La  $\gamma$ -carboxylation des 12 résidus N-terminaux d'acide glutamique en acide  $\gamma$ -carboxyglutamique, en présence de vitamine K, va permettre la liaison du propeptide avec le calcium et ainsi le changement de conformation de la protéine nécessaire à son activité<sup>377</sup>. La protéine produite par mes cellules différenciées de 52kDa environ correspond donc à la protéine du FIX inactive.

En parallèle, nous avons collaboré avec Olivier Christophe de l'unité INSERM U1176 au Kremlin Bicêtre, pour le dosage par ELISA du FIX, ainsi que la réalisation de tests d'activité chromogénique dans les surnageants de culture. Les premiers résultats des ELISA que nous avons obtenus nous ont amenés à concentrer les surnageants de culture, le FIX sécrété étant probablement trop dilué dans le milieu de culture pour être détectable. Quant aux analyses d'activité, elles ont confirmé que mes cellules n'étaient probablement pas suffisamment différenciées pour permettre la maturation du FIX et donc son activité.

A cette même période, l'élevage de souris *F9KO* que nous voulions utiliser afin de valider la correction du phénotype chez l'animal et donc l'approche de thérapie cellulaire et génique développée, n'était pas des plus productifs. J'ai donc « profité » de cette situation pour améliorer mon protocole de différenciation en hépatocytes. En effet, ces problèmes d'efficacité de différenciation, et plus précisément de maturation des cellules hépatocytaires obtenues après différenciation, ont été décrits par d'autres équipes qui ont montré que les cellules obtenues présentaient plus des caractéristiques d'hépatocytes fœtaux qu'adultes<sup>311</sup>. D'autres études ont montré que la culture en agrégats permettait une amélioration de l'efficacité de différenciation et l'obtention de cellules exprimant des marqueurs hépatocytaires plus matures qu'en 2D<sup>445</sup>. J'ai alors voulu voir si cette culture en 3D pouvait améliorer mon protocole de différenciation et ainsi

permettre les modifications post-traductionnelles nécessaires à l'activation du FIX sécrété par mes cellules. Pour cela, j'ai eu la chance de travailler avec Antonietta Messina, une post-doctorante de notre équipe, qui possède une forte expérience de la culture de cellules en agrégats. Elle m'a ainsi formée à cette technique et j'ai travaillé à améliorer la différenciation des cellules HB corrigées et non corrigées en agrégats.

## V. Amélioration de l'efficacité de différenciation par la culture 3D

### A. Mise au point des conditions de différenciation en agrégats

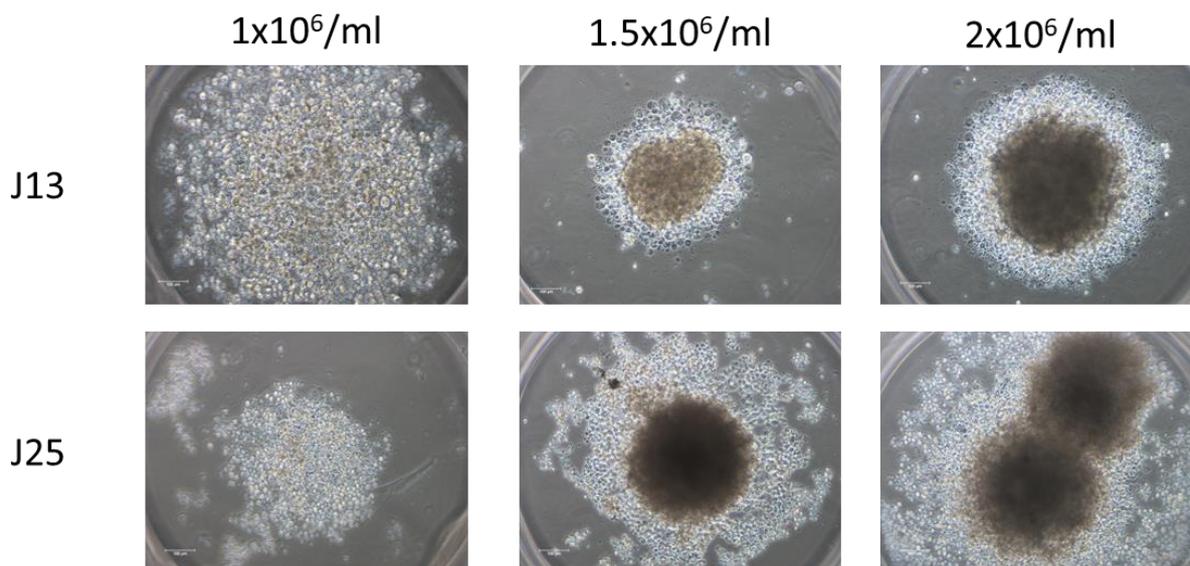
Plusieurs techniques existent pour cultiver les cellules en 3D. Dans notre laboratoire, nous utilisons un moule de silicone afin d'imprimer des micro-puits de taille définie dans des puits d'agarose 2%<sup>446</sup> (fig.37).



Figure 37: Schéma représentatif du moulage des micro-puits d'agarose

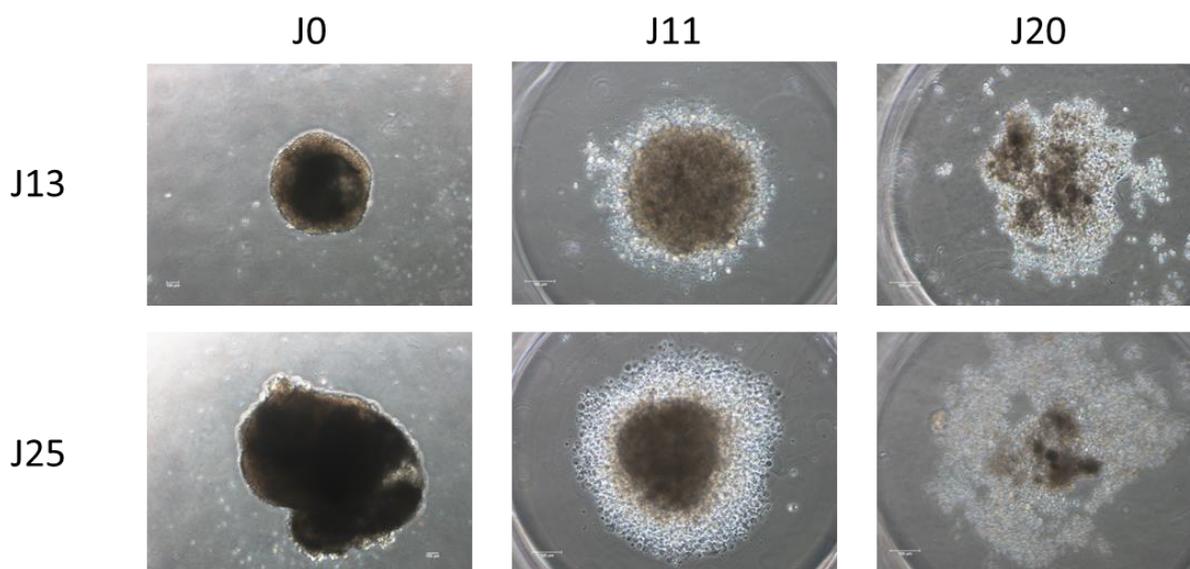
Il a fallu par la suite définir le nombre de cellules à utiliser pour former les agrégats dans ces micro-puits, ainsi que le stade de la différenciation auquel les cellules étaient les plus susceptibles de former ces structures.

J'ai donc utilisé plusieurs concentrations cellulaires et j'ai pu observer que celle-ci influençait grandement la taille, mais aussi la structure des agrégats obtenus (fig.38). Une concentration cellulaire de  $1 \times 10^6$  cellules/ml, soit environ 3 000 cellules/agrégat, ne permettait pas la formation d'agrégats ou entraînait la formation d'agrégats peu denses qui se décompactaient dans les jours suivants. En revanche, l'utilisation d'une concentration cellulaire de  $2 \times 10^6$  cellules/ml, soit environ 6 000 cellules/agrégat entraînait la formation de gros agrégats ou d'agrégats fusionnés, mais qui ne permettaient pas une bonne différenciation des cellules, confirmée par une quasi absence d'ARN FIX, probablement due à un problème de pénétration des facteurs de croissance au cœur des agrégats. J'ai donc opté pour une concentration moyenne de  $1.5 \times 10^6$  cellules/ml, soit environ 4 500 cellules/agrégat, qui permettait l'obtention d'agrégats 3D quelques heures après le dépôt des cellules, ainsi qu'une amplification des cellules en cours de différenciation jusqu'à l'obtention à J25 d'agrégats compacts.



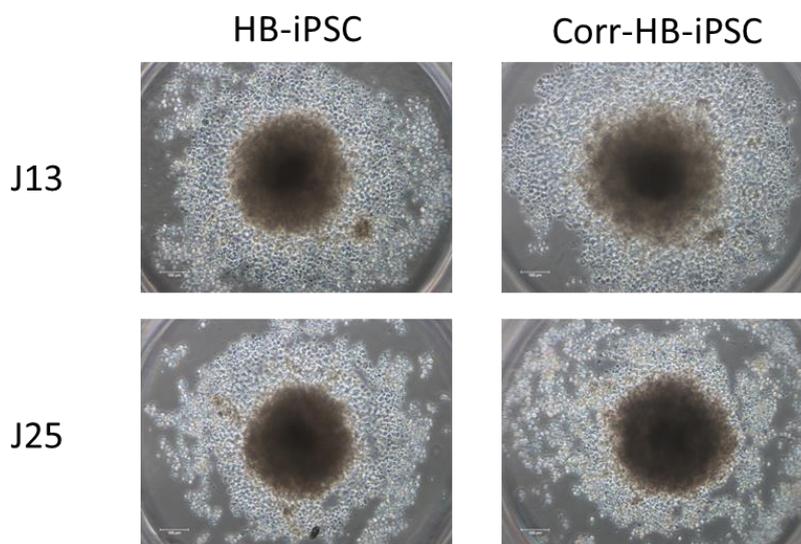
**Figure 38:** Mise au point de la concentration cellulaire optimale pour la formation des agrégats au cours de la différenciation hépatocytaire (X10)

J'ai par la suite tenté de former ces agrégats à plusieurs stades de la différenciation, c'est-à-dire soit dès J0, en réalisant l'intégralité de la différenciation en 3D, soit à J11 au stade hépatoblastes, soit à J20 au stade hépatocytes immatures (fig.39). En terme de morphologie, les agrégats obtenus dès J0 étaient très bien formés, compactés en sphéroïdes et ont très vite grossi, atteignant plus de 1,5 mm de diamètre en quelques jours. Les agrégats obtenus à partir d'hépatoblastes (J11) dépassaient rarement 100µm de diamètre et ne grossissaient pas beaucoup au cours de la différenciation, tout en gardant une structure compacte et lisse de sphéroïdes. En revanche, les hépatocytes immatures du J20 de la différenciation ne permettaient l'obtention que de très petits agrégats (quelques µm de diamètre), peu denses, dont les cellules finissaient par mourir avant la fin de la différenciation.



**Figure 39:** Mise au point du stade de différenciation des cellules à utiliser pour la formation et le maintien des agrégats au cours de la différenciation hépatocytaire (Photos colonne de gauche : grossissement 4X ; photos colonne du milieu et de droite : 10X)

Après ces mises au point de densité et de type cellulaire à utiliser, je me suis assurée que les conditions que j'avais définies s'appliquaient à la fois au clone HB-iPSC mais aussi au clone corrigé (Corr-HB-iPSC) (fig.40).



**Figure 40:** Validation des conditions de différenciation hépatocytaire en 3D mises au point sur les cellules HB-iPSC et corr-HB-iPSC

Comme pour les différenciations en 2D, j'ai vérifié par RT-PCR quantitative et immunofluorescence que les cellules obtenues après différenciation exprimaient des marqueurs hépatocytaires. Les résultats de la caractérisation de ces cellules sont présentés dans l'article, à la fin de ce chapitre.

Cependant, en résumé, les analyses en RT-PCR quantitatives ont montré une quantité 4 fois plus importante d'ARNm du *F9* dans les corr-HB-iPSC par rapport aux HB-iPSC à J25 de la différenciation. Autre observation intéressante, la comparaison des résultats obtenus dans les différenciations en 2D et en 3D, au même stade (J25), ont montré une quantité 11 à 14 fois plus importante (dans les HB-iPSC et corr-HB-iPSC respectivement) d'ARNm de l'albumine dans les cultures en 3D. Concernant l'ARNm du *F9*, les analyses ont montré une production 50 à 80 fois plus importante dans les cultures en 3D.

L'amélioration apportée par le protocole de différenciation en 3D à la maturation des hépatocytes a également été confirmée par la présence de marqueurs hépatocytaires spécifiques dans les cellules différenciées en 3D comme HNF4 $\alpha$ , l'albumine, observés également dans les expériences en 2D, mais également par la disparition de l'expression de l'AFP dès J20 de la différenciation, jamais obtenue en culture 2D, et l'expression de SRB1 (Scavenger receptor class B member 1) un récepteur des lipoprotéines, SREBP2 (sterol regulatory element-binding protein-2) impliqué dans le métabolisme du cholestérol, de la connexine 32 et du FIX par immunofluorescence.

#### B. Analyse de la production de la protéine FIX et de son activité

Les résultats de l'analyse de la protéine du FIX produite par les HB-iPSC et corr-HB-iPSC différenciées (HB-iHeps et corr-HB-iHeps) obtenus en 3D confirment l'amélioration attendue de l'efficacité de

différenciation des iPSC en hépatocytes du fait de la culture en 3D. J'ai pu la mettre en évidence par l'augmentation de l'expression, qui est aussi plus précoce, des marqueurs de différenciation observés par RT-PCR quantitative mais aussi par les marquages en immunofluorescence.

De même, l'analyse en western blot, après immunoprécipitation, du FIX obtenu à partir des mêmes cellules différenciées en parallèle en 2D et en 3D montre que le FIX présent dans les lysats des cellules en 2D migre à une taille d'environ 50kDa, correspondant environ à celle du FIX inactif, alors que la protéine produite par les cellules différenciées en 3D s'approche des 70kDa, comme celle obtenue dans le plasma humain. La différenciation en 3D semble donc permettre une amélioration de la maturation du FIX et donc de ses modifications post-traductionnelles qui devra être confirmée par l'analyse des surnageants de culture concentrés par western blot et test d'activité.

L'étude de l'activité du FIX sera réalisée dans les semaines qui viennent par l'équipe d'Olivier Christophe. J'espère ainsi, en attendant de pouvoir valider notre stratégie dans le modèle de souris *F9KO*, pouvoir montrer une activité FIX *in vitro* dans le surnageant de culture de ces hépatocytes et ainsi valider la correction des cellules.

## **VI. Validation de la correction *in vivo* : transplantation des hépatocytes dérivés des iPSC corrigées**

Même si cette étape du projet n'est pas encore achevée à l'heure où je rédige ce manuscrit, je présenterai dans les paragraphes suivant les résultats obtenus jusqu'alors.

### **A. Modèle animal**

La dernière étape de mon projet, réalisée en collaboration avec Olivier Christophe, consiste à valider la correction du phénotype de la maladie *in vivo* en transplantant les hépatocytes différenciés à partir des cellules iPSC corrigées dans un modèle de souris déficientes en FIX (*F9KO*) dont nous avons un élevage au laboratoire. La modification génétique de ces souris C57BL/6 est due à une modification par recombinaison homologue de la séquence comprise entre les exons 1 et 3 du gène *F9* (fig.41).

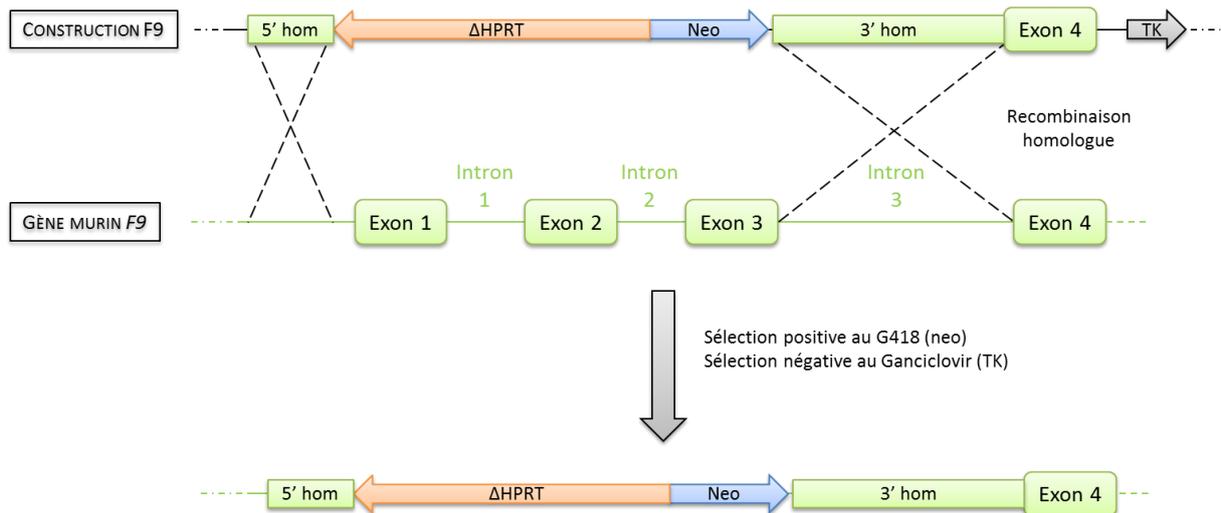
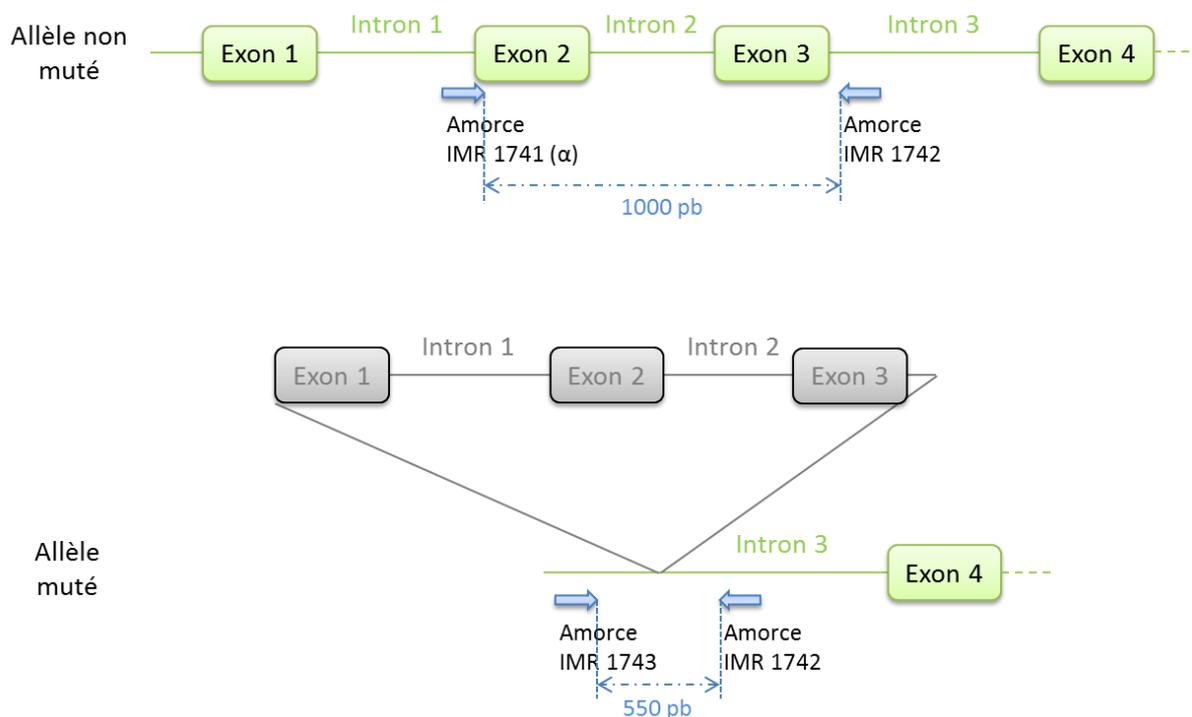


Figure 41: Présentation du modèle de souris transgéniques *F9KO*

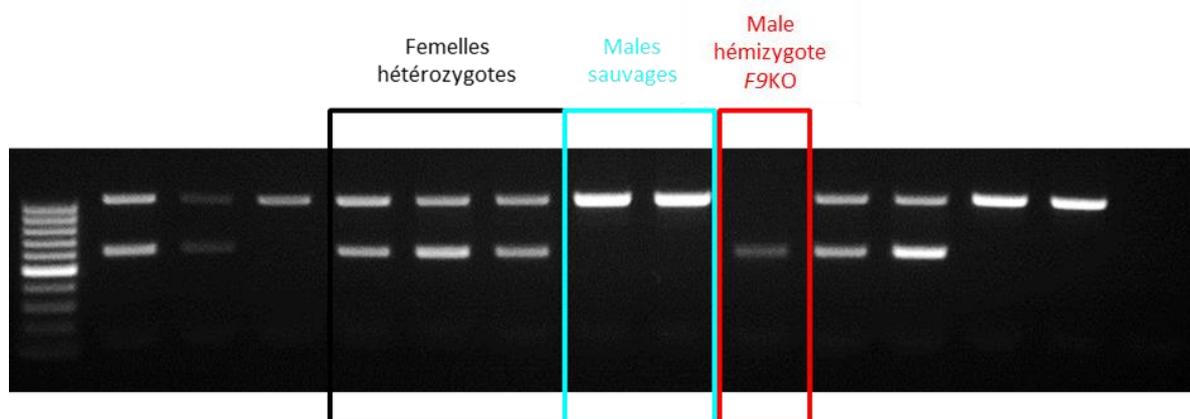
### B. Génotypage des animaux

Le gène du *F9* étant situé sur le chromosome X, chez la souris comme chez l'homme, il n'est pas possible de maintenir une colonie d'animaux homozygotes car les femelles hémophiles ne survivent pas aux gestations. Il est donc nécessaire de génotyper les animaux au moment du sevrage. Pour cela, j'ai utilisé 3 amorces afin de réaliser la PCR décrite figure 42. L'allèle muté des animaux possédant une forme tronquée du *F9*, le dessin de deux amorces IMR1741 ( $\alpha$ ) et IMR 1743 dans cette région du gène permet la distinction des deux allèles. Les séquences en gris sur le schéma sont déléetées dans l'allèle muté du gène.



**Figure 42:** Schéma représentatif de la distinction des deux allèles (muté ou non) du *F9* chez la souris *F9KO*.

Le dépôt des produits de PCR sur gel d'agarose permet de différencier, pour un croisement mâle hémophile x femelle hétérozygote, les mâles sauvages des hémizygotés *F9KO* (fig.43).



**Figure 43:** Exemple de gel PCR pour le génotypage des souris *F9KO*

### C. Analyse de la correction du phénotype hémophile

Cette étape du projet est encore inachevée à l'heure où je rédige ce manuscrit, mais nous avons déjà réalisé plusieurs séries de transplantation intra-hépatiques des cellules dans les souriceaux nouveaux nés. Nous avons choisi cette stratégie pour plusieurs raisons :

1. A la naissance, le foie est en pleine croissance pour atteindre sa taille adulte. Ce stimulus prolifératif permet d'améliorer la prise de greffe des hépatocytes transplantés en permettant également leur prolifération. Chez l'adulte, on provoque le plus souvent ce stimulus

prolifératif par une hépatectomie partielle, rendue délicate dans notre cas du fait de l'hémophilie de nos animaux.

2. Comme évoqué précédemment, nos souris *F9KO* sont des souris C57BL/6 génétiquement modifiées. Elles ne sont donc pas immunodéficientes. La transplantation de cellules humaines dans une souris possédant un système immunitaire intact entraîne le rejet de ces cellules par l'organisme et donc leur élimination par l'hôte. Il faut compter environ trois semaines avant que le système immunitaire des animaux ne se mette en place et rejette la greffe xénogénique. Nous profitons donc de l'immaturité du système immunitaire pour transplanter nos cellules humaines dans les souriceaux que nous sacrifions après environ deux semaines avant que le système immunitaire ne les rejette.
3. Notre stratégie de transplantation de nouveaux nés ne permet évidemment pas un génotypage des animaux au préalable. Pour ces expériences, nous réalisons des croisements de femelles hétérozygotes avec des mâles hémophiles pour maximiser la proportion d'animaux (50 % quel que soit le sexe, dans ce cas), mais nous devons transplanter tous les animaux d'une même portée, et ce avec des cellules de même génotype car il n'est pas possible de les distinguer. Il faut donc génotyper les animaux au moment du sacrifice.

Deux semaines après transplantation, nous avons prélevé les animaux pour détecter la présence de FIX humain dans le plasma par ELISA et test d'activité chromogénique. Nous avons également prélevé leur foie pour réaliser des marquages immunohistochimiques de l'albumine humaine sur coupes en paraffine.

Comme je l'évoquais précédemment, je n'ai pas finalisé les analyses au moment où je rédige ce manuscrit. Les résultats de cette dernière partie seront donc ajoutés à la fin de l'article dès que possible.

## VII. Manuscrit en préparation

# Model of autologous cell/gene therapy of hemophilia B using patient specific induced Pluripotent Stem Cells

E. Luce<sup>1,2,3</sup>, C. Steichen<sup>1,2,3</sup>, A. Messina<sup>1,2,3</sup>, M. Allouche<sup>1,2,3</sup>, S. Goulinet<sup>1,2,3</sup>, T. Lambert<sup>4</sup>, A. Weber<sup>1,2,3</sup>, TH. Nguyen<sup>5</sup>, O.Christophe<sup>6</sup>, A. Dubart-Kupperschmitt<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> INSERM Unité Mixte de Recherche (UMR\_S) 1193, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, F-94800, France;

<sup>2</sup> Université Paris-Sud, 94800 Villejuif, France;

<sup>3</sup> Département Hospitalo-Universitaire Hépatinov, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, F-94800, France;

<sup>4</sup> Centre de Référence pour le Traitement des Hémophiles, Hôpital de Bicêtre, F-94276, France;

<sup>5</sup> INSERM Unité Mixte de Recherche (UMR\_S) 1064, CHU Hôtel Dieu, Nantes, F-44093, France ;

<sup>6</sup> INSERM Unité Mixte de Recherche (UMR\_S) 1176, Hôpital de Bicêtre, Kremlin-Bicêtre, F-94276, France

**Key words:** Factor IX; Hemophilia B; disease modeling; induced Pluripotent Stem Cells; hepatocyte differentiation; CRISPR/Cas9

## Introduction

Hemophilia B (HB) is a genetic bleeding disorder characterized by a reduced or absence of functional coagulation factor IX (FIX), a vitamin K-dependent serine protease synthesized specifically in the liver by the hepatocytes. It was discriminated from hemophilia A around 1950 by Biggs et al.<sup>1</sup> and is also known as “Christmas disease” according to the name of the first patient described with HB, or as the “royal disease”, because most famously transmitted by Queen Victoria (1819–1901) to the European royal families. It is due to a mutation in the *F9* gene, localized on the X chromosome (Xq27), and affects 1 in 30 000 male individuals worldwide<sup>2</sup>. The severity of the disease is related to the measured residual activity of FIX and is accordingly classified as mild (5-40%), moderate (1-5%), or severe (<1%). If bleeding episodes can be controlled by FIX injections in mild and moderate cases, spontaneous bleedings can appear in the most severe ones possibly causing death. The current treatment is life-long and based on “on demand” or prophylactic biweekly intravenous injections of recombinant or plasmatic FIX, but it is very restrictive, costly, only palliative and can lead to side effects including the development of neutralizing antibodies<sup>3,4,5</sup>. Gene therapy trials show promising results but their long-term efficacy is still unknown and development of antibodies against the viral capsid observed in all the patients would precludes subsequent gene transfer with vectors of the same serotype if transgene expression falls below therapeutic levels<sup>6,7</sup>. The only curative treatment is liver transplantation, but organ availability is very restricted, and numerous patients, even with life-threatening diseases, are currently waiting for a viable graft, thus hemophiliac patients are not prioritized. An alternative to liver transplantation could be hepatocyte transplantation<sup>8</sup>, especially because even 5 to 10% of FIX secreting engrafted hepatocytes could largely improve prognostic and quality of life of patients suffering severe HB<sup>9</sup>. However, freshly isolated hepatocyte availability is also problematic and it is well-known that *in vitro* culture of hepatocytes does not allow proliferation and results in rapid loss of liver-specific functions, influencing cell engraftment after transplantation<sup>10</sup>. Human pluripotent stem cells like induced pluripotent stem cells

(iPSCs), developed by Yamanaka in 2007, have a huge potential for cell therapy and regenerative medicine<sup>11</sup>. Protocols mimicking liver development with sequential addition of cocktails of specific cytokines and growth factors directed hepatocytic differentiation of pluripotent stem cells, resulting in hepatocyte-like cells expressing specific liver markers like HNF4 $\alpha$  or albumin, and showing CYP detoxification and other hepatic-specific activities<sup>12,13</sup>. Hepatocyte-like cells derived from mouse iPSCs transplanted into a mouse model of HB led to FIX activity and improved thrombus generation, showing that hepatocyte transplantation could restore FIX levels in this model<sup>14</sup>. However few studies report the generation of HB patient-specific iPSCs (HB-iPSCs)<sup>15,16,17</sup> and none of them have described a cell therapy approach in an animal model.

In the present study, we established a human HB model using hepatocyte-like cells (HLCs) differentiated from HB-iPSCs and investigated whether a genetic correction using CRISPR/Cas9 technology could correct the HB phenotype as an approach of cell/gene therapy. HB-iPSCs were generated from fibroblasts of a HB patient with g.31280 G>A (c.1297G>A, p.E433K) mutation, leading to the production of an inactive FIX. We used the CRISPR/Cas9 cell editing approach to insert a donor cassette into the *AAVS1* site (adenovirus-associated virus integration site 1) within the first intron of the phosphatase 1 regulatory subunit 12C gene on chromosome 19 known as a safe harbor region where transgene expression from a chosen promoter does not lead to insertional genotoxicity or oncogenic transformation and ensures its expression<sup>18</sup>. The correction cassette included a *F9* mini-gene, encoding FIX bearing the Padua mutation (p.R384L) to enhance FIX specific activity<sup>19</sup>, under the control of the hepato-specific *APOA2* promoter.

## **Material and methods**

### ***Expansion and maintenance of patient's fibroblasts***

Diagnosis of severe Hemophilia B due to the g.31280 G>A (c.1297G>A, p.E433K) leading to inactive FIX (FIX c <1 % ; FIXAg 67%) was clinically and genetically confirmed at the *Centre de Référence pour les Hémophiles*, Kremlin Bicêtre, France, in a patient who agreed to undergo a skin biopsy during knee surgery and signed an informed consent. The biopsy specimen was cut into pieces and plated in 100 mm TC-treated culture dishes (Corning) in Dulbecco's modified Eagle's medium containing 1% non-essential amino acids (NEAA), 1% L-glutamine, 1% penicillin/streptomycin (all from Gibco) and 10% fetal bovine serum (Hyclone, Thermo Scientific). After few days, expanded fibroblasts were split 1:3 when they reached confluence.

### ***Generation of patient-specific iPSC (HB-iPSC)***

Patient's specific iPSC (HB-iPSC) line was derived after transduction of  $10^5$  fibroblasts at MOI 10 with retroviral vectors encoding the four reprogramming factors OCT4, KLF4, SOX2 and cMYC (vectors provided by Vectalys, Toulouse, France), as originally described by Yamanaka and colleagues<sup>20</sup>. After 5 days, cells were treated with trypsin and plated in a 100 mm TC-treated culture dish containing 20.000 irradiated embryonic murine fibroblasts (MEF) feeder cells/cm<sup>2</sup> (GlobalStem) on gelatin. Two days later, the media was replaced with serum-free "iPSC medium" containing DMEM F12 supplemented with 20% knockout serum replacement (KOSR), 1% non-essential amino acids, 1% L-glutamine, 1% penicillin-streptomycin (all from Gibco), 0.1 mM beta-mercaptoethanol (Sigma-Aldrich) and 4 ng/ml FGF2 (CellGenix).

### ***Maintenance of undifferentiated human iPSCs***

Human iPSCs were cultured in iPSC medium onto MEF feeder cells (GlobalStem) at  $3.5 \times 10^5$  cells per 6 mm culture dish in a 5% CO<sub>2</sub> / 5% O<sub>2</sub> incubator. Cells were passaged once a week after 5 min of treatment with collagenase IV (0.1 mg/ml; Gibco).

### ***iPSC line characterization***

iPSC line was deeply characterized for expression of stem cell markers and pluripotency by immunostaining and flow cytometry as described later in the document. Karyotype integrity has been confirmed, as well as the presence of the patient mutation in the iPSCs. Alkaline phosphatase (AP) was detected with the AP Detection Kit (Millipore), according to manufacturer's instructions.

### ***In vitro and in vivo differentiation capacity analyzes***

*In vitro* differentiation capacity of the cells was assessed by embryoid bodies (EBs) formation after one week culture of iPSCs in low-attachment plates, in iPSC culture medium without FGF2. Obtained EBs were then plated on gelatin and allowed to differentiate spontaneously in DMEM containing 10% FBS. After trypsin treatment, RNA was extracted and reverse transcribed before PCR assay with primers specific for markers of the three embryonic germ layers (Table S1).

*In vivo* differentiation capacity of the cells was assessed by teratoma assays. iPSCs cultured on MEFs were manually harvested by StemPro EZ passage (Invitrogen), collected by centrifugation and suspended in 120  $\mu$ l of Geltrex (2 mg/ml; Invitrogen) before injection into the thigh of NOD-SCID mice. Paraffin sections of the resulting teratomas were stained with hematoxylin and eosin. All animal procedures were approved by the local ethics committee.

### ***Karyotype analysis***

Karyotype analyses were carried out on cultured cells using standard procedures (RHG and GTG banding). Cells were cultured in StemMACS™ iPS-Brew XF supplemented with 0.02 mg/ml colchicine (Eurobio) for 2 h and then harvested and incubated with a warm hypotonic solution of 0.075 M KCl for 20 min. Finally, cells were fixed in Carnoy's fixative (methanol/acetic acid 3:1) and sent for analyses.

### ***DNA sequencing***

Genomic DNA was extracted using GeneJET Genomic DNA purification kit (ThermoFisher) according to manufacturer's instructions and PCR using specific primers were used to amplify the sequences of interest (Table S1). After migration on a 1% agarose gel, bands of amplified fragments were purified using GeneJET Gel extraction kit (Fermentas) and sent to Cochin Institute sequencing platform (Eurofins, France) for DNA sequencing. Chromatograms were treated and analyzed using Chromas software.

### ***Correction of the genetic defect in HB-iPSC using the CRISPR/Cas9 technology***

HB-iPSC were cultured in feeder-free condition on Geltrex-coated culture dishes (Gibco) for few passages in complemented StemMACS™ iPS-Brew XF medium (Miltenyi Biotec), with 1% penicillin-streptomycin (Gibco). The day of the transfection, cells were treated with 10 μM Y-27632 (Stemcell Technologies) 4 hours before treatment with accutase (Sigma).  $2,5 \times 10^6$  cells were nucleofected using Amaxa Nucleofector device (Lonza) with 3 plasmids harboring the sgRNA AAVS1 targeting sequence (GGGGCCACTAGGGACAGGAT), the spCas9 endonuclease and a donor cassette containing a *F9* minigene with the Padua mutation (g.31134 G>T, p.R384L) allowing increased FIX activity, under the control of the human *APOA2* promotor cloned into pZDonor-AAVS1 puromycin vector (Sigma). Corrected clones were then selected by increased concentrations (0,5 – 2 μg/ml) of puromycin (Sigma) and clonally picked.

### ***Hepatic differentiation of hiPSC***

Hepatic differentiation of iPSC was driven by successive addition of specific growth factor cocktails mimicking signals from the microenvironment during liver development. The protocol is described in fig2.A. Briefly, 3 days before collection for differentiation seeding, iPSC were treated with 100ng/ml Wnt3a (R&D). Cells were then collected after a 5 min trypsin-EDTA (0.5%) (Gibco) treatment at 37°C and incubated 20 min on a gelatin-coated dish to get rid of the MEF feeder cells. Cells were then seeded onto 6-well plates (Corning) precoated with 0.1% porcine gelatin (Sigma) at 40,000 cells/cm<sup>2</sup> in RPMI-1640 medium (Gibco) with B27 serum-free supplement (Life technologies) (RPMI/B27), 1% non-essential amino acids, 1% L-glutamine, 1% penicillin-streptomycin, supplemented with 10µM Y-27632 (Stemcell Technologies), 100ng/ml Activin A (CellGenix), 3µM CHIR-99021 (Stemcell Technologies). After 24 hours, medium was removed and cells were cultured in RPMI/B27 with 100ng/ml Activin A alone for 4 days. Cells were then cultured for 3 days in RPMI/B27 with 10ng/ml BMP4 (R&D Systems) and 10ng/ml FGF2 (CellGenix), and 2 more days in methionine-deprived RPMI (Gibco, Invitrogen) with 20ng/ml HGF (Peprotech), 30ng/ml FGF4 (Peprotech), 10ng/ml EGF (Peprotech) and reached the hepatoblast stage, the bipotent progenitors of hepatocytes and cholangiocytes.

Hepatoblasts were then harvested using cell dissociation buffer (0.1 mg/ml EDTA, 0.5 mg/ml BSA in PBS) and seeded onto 6-well collagen I-coated plates (Sigma) with plating medium (RPMI/B27 , 10% SVF (Gibco), 1 mg/ml bovin serum albumin (BSA) (Sigma), 20ng/ml HGF) for 4 hours for 2D hepatocyte differentiation.

For 3D hepatocyte differentiation, 6-well agarose coated plates have been prepared as follows<sup>21</sup>. Sterilized powder Ultrapure agarose (Life Technologies) was dissolved (2% w/v) by heating in sterile water. The liquid agarose solution was added to a well of a 6 well-plate and microwells have been formed using a home-made silicone mold and left to solidify at room temperature. After cooling, the molds were lifted up from the agarose gel and single cell

suspension of  $1,4 \times 10^6$  cells/ml seeded in the wells. After 30 minutes, cells settled into the bottom of the micro-wells and formed micro-aggregates within few hours.

The following steps were then applied for both 2D and 3D hepatocyte differentiation. Culture medium was replenished and changed every day for 4 days with RPMI-1640 medium with 1% insulin-transferrin-selenium (ITS, Gibco), 0.1% BSA, 4.5mM nicotinamide, 0.1 nM zinc sulfate heptahydrate,  $6 \times 10^{-4}$ M vitamin C (all from Sigma), supplemented with 20ng/ml HGF, 10ng/ml EGF, 100nM of dexamethasone (Sigma) and 20ng/ml oncostatin M (OSM, Peprotech). Finally, cells in both 2D and 3D conditions were kept in culture until the end of the differentiation experiment in RPMI-1640 medium with 1% ITS, 0.1% BSA, 4.5mM nicotinamide, 0.1 nM zinc sulfate heptahydrate, and  $5 \times 10^{-8}$  M 3,3',5-triiodo-L-thyroxine (Sigma), supplemented with 20ng/ml HGF, 100nM dexamethasone, 0,5 $\mu$ M Compound E (CE) (Santa Cruz), 5 $\mu$ M SB431452 (Tocris) and 5ng/ml vitamin K (Roche).

### ***Immunostaining***

Immunostaining was performed after fixation with 4% paraformaldehyde for 20 min, permeabilization by incubation with 0.5% Triton (Sigma) in PBS for 15 minutes for 2D culture and permeabilization solution (BSA 1% - 0.2 $\mu$ g/ml EDTA – 0.1% Triton) for aggregate slides. In all conditions, blocking was performed with PBS-3%BSA for 20 min. The cells were then incubated with primary antibodies diluted in PBS-1%BSA (Table S2) overnight at 4°C. Conjugated secondary antibodies were diluted at 1/1000 and incubated for 1 hour at room temperature. Cell nuclei were labeled with DAPI (0.5  $\mu$ g/ml) (Sigma) and samples were mounted in Faramount Aqueous mounting medium (Dako / Agilent Technologies). Images were obtained using the EVOS FL Auto microscope and its software (Thermo Fisher Scientific).

After immunostaining, five mm thick sections of HLC-spheroids embedded and frozen in Optimal cutting temperature compound (OCT compound) were mounted on glass slides.

### ***Flow cytometry***

Flow cytometry analyses were performed after cell dissociation with trypsin-0.05% EDTA (Gibco), centrifugation and suspension in PBS-1%BSA. Cells were then incubated with conjugated antibodies for 30 minutes at 4°C (Table S2). Analyses were performed on a BD Accuri C6 Flow Cytometer (Becton Dickinson).

### ***RNA extraction and RT-PCR***

Total RNA was extracted from 2D-cultured cells and mice liver biopsies with the RNAeasy mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. RNA from aggregates was extracted with Direct-zol RNA (Ozyme). All RNAs were then reverse transcribed with Superscript first-strand synthesis system (Invitrogen). PCR were performed with the Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen) (primer sequences in Table S1).

### ***Q-RT PCR analysis***

Before quantitative RT-PCR, RNA was reverse transcribed using QuantiTect kit (Qiagen) and qRT-PCR was performed in triplicate using Maxima SYBR Green/ROX qPCR master mix (Thermo Fisher) on an ABI-7000 real time PCR machine (Applied Biosystems). The  $\Delta\Delta C_t$  method was used for relative quantification. Threshold cycle number and reaction efficiency were determined using ABI PRISM® 7000 series software version 1.2.3f2. The primers used for *Albumin*, *F9* and the reference housekeeping gene *RPL13a* are described in table S1.

### ***In vitro assessment of differentiated hepatocyte functionality***

Oil Red O staining was assessed after incubation of fixed cells with 60% isopropanol (Sigma) for 5 minutes followed by 60% Oil Red O (Sigma). Cells were then washed 5 times with distilled water and counterstained with hematoxylin (Sigma) for 2 minutes.

Periodic acid solution (PAS) staining was assessed after incubation of fixed cells with 1% PAS (Sigma) during 5 minutes. Cells were then incubated with Schiff's reagent (Sigma) for

15 minutes after 4 washes in distilled water and counterstained with hematoxylin for 2 minutes.

### ***Immunoprecipitation and western blot analyses***

Total cellular proteins have been extracted using RIPA lysis buffer (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 1% Triton 100X, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 2mM EDTA) (All from Sigma) with addition of a protease inhibitor cocktail tablet (Roche). Protein concentration was determined using DC Protein Assay (Biorad) according to manufacturer's instructions. 300 µg of total proteins were used for immunoprecipitation using Protein G Sepharose Fast Flow beads (Sigma) and an anti-human FIX antibody (Affinity Biologicals) (Table S2). Immunoprecipitated proteins were resolved on a 12% acrylamide-SDS gel. Proteins were transferred to a Hybond Amersham polyvinylidene fluoride membrane (GE Healthcare) and probed overnight at 4°C with an antibody specific for human FIX at 1:2000 (Genetex) after saturation in PBS – 0.1% Tween-20 - 5% dry milk. The membrane was then incubated for 1h at room temperature with secondary specific horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody and the specific bands were finally visualized with the clarity western Enhanced Chemiluminescence Reagent (ECL) substrate kit (Biorad) (see Table S2 for antibody references). Pictures were taken using a Fusion solo camera and its software.

### ***Transplantation of corrected-HB-iPSC-derived hepatocytes into a mouse model of hemophilia B***

All animal studies were carried out according to the French guidelines for the care and use of experimental animals and approved by the French ethic committee C2EA-26 for animal experiments under number 509 1 2015062215414016. A Hemophilia B mice<sup>22</sup> (Jackson Laboratory, strain name: B6; 129P2-F9tm1Dws/J) farming was established in pathogen-free conditions and newborn mice from mating of *F9KO* heterozygous female and *F9KO* male mice were used for this study. Genotype of each hemophilia B mice was verified by PCR using primers listed in table S1. Together with intrahepatic cell transplantation, we

administered 1U of recombinant FIX in addition to the cells (BeneFIX® - Pfizer) to ensure survival of the hemophilic mice. Each newborn mouse was injected with  $1 \times 10^5$  corrected HB-iPSC at day 11 of the differentiation using a 27-gauge needle. After 2 weeks, mice were sacrificed and liver and plasma have been collected.

## **Results and discussion**

### ***Use of patient-specific iPSCs for disease modelling of Hemophilia B***

We reprogrammed skin fibroblasts from a patient with severe HB (FIX c <1 % ; IXAg 67%) carrying a g.31280 G>A (c.1297G>A, p.E433K) mutation using a polycistronic lentivirus encoding the four Yamanaka factors. Full characterization of one iPSC line (HB-iPSC) by immunostaining (Supp fig.1A) and flow cytometry analysis (Supp fig.1B) showed the expression of endogen pluripotency markers like OCT4, NANOG, SSEA4, TRA-1-80 and TRA-1-60. RT-PCR analyses of cells derived from randomly formed embryoid bodies *in vitro* highlighted the expression of markers from the three germ layers (Supp fig. 1C). Few weeks after injection of HB-iPSCs into NOD-SCID mice, teratomas produced contained multiple derivatives of the three germ layers (Supp. fig. 1D). Karyotype of the iPSCs was normal (Supp. fig. 1E) and DNA sequencing confirmed the presence of the patient's mutation in the HB-iPSC (Supp. fig. 1F).

### ***Genetic correction of HB-iPSC using CRISPR/Cas technology***

To correct the phenotypic defect of the cells, we used the CRISPR/Cas9 cell editing approach to insert a therapeutic cassette into the safe harbor *AAVS1* site (adenovirus-associated virus integration site 1). The therapeutic cassette included a *F9* mini-gene, with the Padua mutation (g.31134 G>T, p.R384L) to enhance its specific activity, under the control of the hepato-specific promoter of the apolipoprotein A2 (*APOA2*) (Fig. 1A). A

puromycin resistance sequence allowed the cell selection of the corrected clones, confirmed by PCR in 21% of the puromycin-resistant clones (15/70) (Fig. 1B). Each of these 15 clones was further analyzed by PCR using primers spanning the 5' and 3' homology arms showing an accurate integration of the cassette (Fig.1C). An intact endogenous *AAVS1* allele was detected in all the tested clones, indicating a monoallelic integration of the cassette (Fig. 1D). Sequencing of the homologous recombination 5' and 3' regions, and of a part of the *F9* mini-gene confirmed their genetic stability during the gene editing process (data not shown) and the presence of the Padua mutation in the corrected cells (Fig. 1E). We confirmed the normality of the karyotype and selected one the corrected clones for further experiments (Corr-HB-iPSC) (Fig. 1F).

### ***Differentiation of HB-iPSCs and Corr-HB-iPSCs into hepatocytes***

Based on previously published protocols<sup>23,24</sup>, we set up chemically defined conditions to differentiate both non-corrected and genetically corrected iPSCs into hepatocyte-like cells (HB-iHeps and Corr-HB-iHeps respectively) by sequential addition of growth factors mimicking the normal liver development (Fig.2A). We first started our differentiation protocol by inhibiting GSK-3 $\beta$  with a 24h treatment with CHIR99021, known to promote differentiation of embryonic stem cell lines towards primitive streak, mesoderm and definitive endoderm<sup>25</sup>. High concentration of Activin A was then used to induce endodermal cell fate leading to the expression of endoderm markers like GATA4 and CXCR4 confirmed by immunostaining and flow cytometry at day 5 of the differentiation (Supp. Fig. 2A). After specification of the endoderm, cells became bipotent hepatic progenitors known as hepatoblasts that expressed hepatic nuclear factor 4 $\alpha$  (HNF4 $\alpha$ ) and biliary marker CK19 (Supp.fig. 2B). Cells were then passaged at day 11 on a collagen/fibronectin matrix and treated with CHIR99021, TGF $\beta$ , and EGF to promote their proliferation as previously described<sup>24</sup>. Quantitative RT-PCR showed at this stage the expression of *F9* mRNA coming from the inserted cassette in differentiating Corr-HB-iPSCs due to the *APOA2* promoter (Supp. Fig. 2C). We finally treated cells with

inhibitors of both Notch and TGF $\beta$  pathways known to be involved in cholangiocytes lineage specification using Compound E and SB431542 as previously described<sup>24</sup>.

RT-PCR performed at each step of the protocol, *i.e.* definitive endoderm at day 5, hepatic progenitors at day 11 and hepatocyte like cells (HLCs) at day 20 and 25, showed the progressive silencing of pluripotency markers like *NANOG*, and the appearance of hepatic markers like alfa-foetoprotein (*AFP*), *HNF4 $\alpha$* , cytochrome P450 3A4 (*CYP3A4*), albumin (*ALB*) and *F9* (Fig.2B). Quantitative RT-PCR showed a higher expression of *F9* mRNA in Corr-HB-iHeps at day 25 of the hepatocyte differentiation, compared to HB-iHeps (Fig. 2C). To allow comparison of *F9* expression in both corrected and non-corrected cells taking into account their differentiation stage, *ALB* mRNA has been quantified by qRT-PCR as a differentiation marker. *F9/ALB* mRNA ratio has been compared, showing a 3.5-fold higher *F9* mRNA quantity in Corr-HB-iHeps compared to HB-iHeps at day 25. PAS and Oil Red O stainings show functions of glycogen and lipid storage in both Corr-HB-iHeps and HB-iHeps and immunostaining showed the expression of hepatocyte specific markers like *HNF4 $\alpha$* , *AFP*, *ATP7B*, *ALB*, tight junction protein *ZO-1* and *claudin-1* (Fig. 2D).

*FIX* is synthesized by hepatocytes in the liver as a pre-prozymogen of 52kDa that contains a hydrophobic signal peptide at its amino terminus that transports *FIX* into the lumen of the endoplasmic reticulum where this signal peptide is cleaved by a signal peptidase, and a pro-peptide that functions as a recognition element for a vitamin K-dependent carboxylase ( $\gamma$ -glutamyl carboxylase)<sup>26</sup>. Indeed, following protein biosynthesis, 12 glutamic acid residues of the protein are converted to gamma-carboxyglutamic acid (Gla) in a reaction that requires vitamin K as a cofactor leading to a change in its conformation crucial for *FIX* activity<sup>27</sup>. Western blot analyses performed on immunoprecipitated cell lysates showed a 2.7-fold higher production of *FIX* in Corr-HB-iHeps compared to HB-iHeps (Fig. 2E). However, if our results showed that both HB-iHeps and Corr-HB-iHeps are able to produce *FIX*, the synthesized protein appears to migrate faster than control plasmatic or recombinant *FIX*. Indeed, the molecular weight of the *FIX* protein present in our HB-iHeps and Corr-HB-iHeps

is roughly 50 kD as expected from the crude amino acid primary sequence. This could be explained by default in post-translational processing of the protein which is subject of multiple modifications such as  $\gamma$ -carboxylations, phosphorylations, glycosylations that are crucial for the FIX activity. It probably indicates that our differentiation protocol did not allow a sufficient maturation of the iHeps to allow proper FIX post-translational modification. This lack of differentiation and/or maturation of hepatocytes differentiated from hESCs and hiPSCs, also described by others<sup>28</sup>, led us to investigate how three-dimensional culture<sup>29</sup> would improve our conventional 2D differentiation protocol and result in the production of a correctly processed and active FIX.

### ***Three-dimensional hepatocyte differentiation of HB-iPSC and Corr-HB-iPSCs***

At day 11 of hepatocyte differentiation, hepatoblasts have been detached from gelatin, resuspended at a desired cell concentration, and seeded in inert agarose wells molded as previously described<sup>21</sup>. Since day 12, while the differentiation protocol used until day 25-30 was the same as the one described in figure 2A, self-assembly of hepatoblasts led to aggregates then to spheroid formation.

Quantitative RT-PCR showed a 4-fold higher expression of *F9* mRNA in Corr-HB-iHeps at day 25 of the hepatocyte differentiation, compared to HB-iHeps, using primers that recognize both endogenous and transgene expression (Fig. 3A) with no significant difference in the *ALB* gene expression level between HB-iHeps and corr-HB-iHeps, indicating comparable differentiation stages. However, comparison between 2D and 3D differentiation protocols showed an 11-fold increase in *ALB* mRNA for HB-iHeps and a 14-fold increase for Corr-HB-iHeps at day 25. Moreover, we detected a 50-fold increase in the *F9* mRNA level for HB-iHeps and an 80-fold increase for Corr-HB-iHeps showing a significant improvement of the hepatocyte differentiation efficiency.

PAS and Oil Red O stainings show functions of glycogen and lipid storage in both Corr-HB-iHep and HB-iHep aggregates and immunostaining showed also an improvement of the

differentiation compared to 2D differentiation protocol reflected by the expected disappearance of AFP at day 25 and the FIX labeling (Fig.3B). Connexin 32 (gap junction protein  $\beta$ 1), critical in intercellular communication is also detected in the 3D-differentiated cells, as well as the cytochrome P450 3A4 (CYP3A4), the scavenger receptor class B member 1 (SRB1) a receptor of high-density lipoprotein, and the sterol regulatory element-binding protein-2 (SREBP2) implied in the cholesterol metabolism.

Western blot analyses performed on immunoprecipitated cell lysates of 2D and 3D-differentiated cells originating from the same D11 iPSC-hepatoblast population show different profiles of FIX expression. Indeed, the molecular weight of the FIX protein present in our HB-iHeps and Corr-HB-iHeps differentiated in the 2D protocol is about 50kD whereas FIX obtained after 3D differentiation is almost 70kDa as observed in immunoprecipitated human plasma. This data confirmed the improvement of the hepatocyte differentiation protocol after spheroid formation and prompted us to assess FIX activity.

#### ***In vivo validation of the cell model***

FIX activity on 3D culture cell extracts and supernatants (ongoing....)

#### ***In vivo validation of the cell model***

We then assessed the phenotypic correction *in vivo* using the mouse model of Hemophilia B. Both corrected and non-corrected cells at day 11 of differentiation were transplanted into the liver of newborn mice. (ongoing....)

## References

1. Biggs, R. *et al.* (1952). 'Christmas disease: a condition previously mistaken for haemophilia'. *Br. Med. J.* 2: 1378–1382.
2. Bolton-Maggs, P. H. & Pasi, K. J. (2003). 'Haemophilias A and B'. *The Lancet.* 361: 1801–1809.
3. Blanchette, V. S. (2010). 'Prophylaxis in the haemophilia population'. *Haemophilia.* 16: 181–188.
4. O'Hara, J. *et al.* (2017). 'The cost of severe haemophilia in Europe: the CHESSE study'. *Orphanet J. Rare Dis.* 12: 106.
5. Bon, A. *et al.* (2015). 'Desensitization and immune tolerance induction in children with severe factor IX deficiency; inhibitors and adverse reactions to replacement therapy: a case-report and literature review'. *Ital. J. Pediatr.* 41: 12.
6. Nathwani, A. C. *et al.* (2011). 'Adenovirus-Associated Virus Vector-Mediated Gene Transfer in Hemophilia B'. *N. Engl. J. Med.* 365: 2357–2365.
7. Nathwani, A. C. *et al.* (2014). 'Long-Term Safety and Efficacy of Factor IX Gene Therapy in Hemophilia B'. *N. Engl. J. Med.* 371: 1994–2004.
8. Weber, A. *et al.* (2006). 'Hepatocyte transplantation: studies in preclinical models'. *J. Inherit. Metab. Dis.* 29: 436–441.
9. Puppi, J. *et al.* (2012). 'Improving the techniques for human hepatocyte transplantation: report from a consensus meeting in London'. *Cell Transplant.* 21: 1–10.
10. Elaut, G. *et al.* (2006). 'Molecular mechanisms underlying the dedifferentiation process of isolated hepatocytes and their cultures'. *Curr. Drug Metab.* 7: 629–660.
11. Hannoun, Z. *et al.* (2016). 'The potential of induced pluripotent stem cell derived hepatocytes'. *J. Hepatol.* 65: 182–199.
12. Si-Tayeb, K. *et al.* (2010). 'Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells'. *Hepatol. Baltim. Md.* 51: 297–305.
13. Touboul, T. *et al.* (2010). 'Generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells under chemically defined conditions that recapitulate liver development'. *Hepatol. Baltim. Md.* 51: 1754–1765.
14. Wu, Y.-M. *et al.* (2016). 'Hepatocyte-Like Cells Derived From Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Produce Functional Coagulation Factor IX in a Hemophilia B Mouse Model'. *Cell Transplant.* 25: 1237–1246.
15. Lyu, C. *et al.* (2017). 'The State of Skewed X Chromosome Inactivation is Retained in the Induced Pluripotent Stem Cells from a Female with Hemophilia B'. *Stem Cells Dev.* 26: 1003–1011.
16. Martorell, L. *et al.* (2017). 'Advanced cell-based modeling of the royal disease: characterization of the mutated F9 mRNA'. *J. Thromb. Haemost.*
17. He, Q. *et al.* (2017). 'Genetic Correction and Hepatic Differentiation of Hemophilia B-specific Human Induced Pluripotent Stem Cells'. *Chin. Med. Sci. J. Chung-Kuo Hsueh Ko Hsueh Tsa Chih.* 32: 135–144.
18. Sadelain, M. *et al.* (2011). 'Safe harbours for the integration of new DNA in the human genome'. *Nat. Rev. Cancer.* 12: 51–58.
19. Simioni, P. *et al.* (2009). 'X-Linked Thrombophilia with a Mutant Factor IX (Factor IX Padua)'. *N. Engl. J. Med.* 361: 1671–1675.
20. Takahashi, K. *et al.* (2007). 'Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors'. *Cell.* 131: 861–872.
21. Messina, A. *et al.* (2017). 'Self-assembly of tissue spheroids on polymeric membranes'. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 11: 2090–2103.
22. Lin, H. F. *et al.* (1997). 'A coagulation factor IX-deficient mouse model for human hemophilia B'. *Blood.* 90: 3962–3966.
23. Dianat, N. *et al.* (2014). 'Generation of functional cholangiocyte-like cells from human pluripotent stem cells and HepaRG cells'. *Hepatology.* 60: 700–714.

24. Touboul, T. *et al.* (2016). 'Stage-specific regulation of the WNT/ $\beta$ -catenin pathway enhances differentiation of hESCs into hepatocytes'. *J. Hepatol.* 64: 1315–1326.
25. Bone, H. K. *et al.* (2011). 'A novel chemically directed route for the generation of definitive endoderm from human embryonic stem cells based on inhibition of GSK-3'. *J. Cell Sci.* 124: 1992–2000.
26. Brandstetter, H. & Bauer, M. (1995). 'X-ray structure of clotting factor IXa: Active site and module structure related to Xase activity and hemophilia B'. *Proc Natl Acad Sci.* 92: 9796–9800.
27. Stenflo, J. (1999). 'Contributions of Gla and EGF-like domains to the function of vitamin K-dependent coagulation factors'. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 9: 59–88.
28. Baxter, M. *et al.* (2015). 'Phenotypic and functional analyses show stem cell-derived hepatocyte-like cells better mimic fetal rather than adult hepatocytes'. *J. Hepatol.* 62: 581–589.
29. Subramanian, K. *et al.* (2014). 'Spheroid culture for enhanced differentiation of human embryonic stem cells to hepatocyte-like cells'. *Stem Cells Dev.* 23: 124–131.

## Figure legends

**Figure 1. Genetic correction of HB-iPSCs using CRIPSR/Cas9 technology.** (A) Schematic representation of the therapeutic cassette in the AAVS1 SA-2A-puro-pA donor plasmid containing homology sequences to the sequence of the targeted AAVS1 site. The expression cassette includes the apolipoprotein A2 (*APOA2*) promoter driving the expression of a *F9* mini-gene bearing the Padua mutation (red star) to enhance FIX specific activity, and a puromycin resistance sequence for selection of corrected clones (SA: splice acceptor site; WPRE: Woodchuck hepatitis virus Post-transcriptional Regulatory Element which improves mRNA nuclear export and thus protein expression). (B) Confirmation of the correct insertion of the cassette at the targeted AAVS1 site by PCR flanking homologous recombination regions. (C) PCR analysis of the AAVS1 targeted site, showing the absence of integration of the therapeutic cassette in one of the alleles. (D) Confirmation of the presence of the Padua mutation in corrected clones by sequencing a portion of the *F9* mini-gene. (see Table S1 for the primers used). (E) Confirmation of the normality of the karyotype in one corrected clone selected for hepatocyte differentiation.

**Figure 2. Hepatocyte differentiation of corrected and non-corrected HB-iPSC in 2D.** (A) Schematic representation of the protocol used for iPSC differentiation into hepatocytes. (B) RT-PCR analyses showing the expression pattern during hepatocyte differentiation of both corrected and non-corrected iPSCs at days 0, 5, 11, 20 and 25. *AFP*: alfa-fetoprotein; *APOA2*: apolipoprotein A2; *CYP3A4*: cytochrome P450 3A4; *F9*: coagulation factor 9 genes (C) Relative quantification of *ALB* and *F9* mRNA levels at days 20 and 25 of the differentiation protocol by quantitative RT-PCR in non-corrected and corrected iPSC-derived hepatocytes (HB-iHeps and Corr-HB-iHeps respectively). Gene expression levels were measured in triplicates and normalized using *RPL13a* expression. Human adult hepatocytes (HH), human fetal liver and hepatocytes differentiated from HepaRG cell line were used as controls. In *F9* and *ALB* mRNA histograms, the value of HH was arbitrarily set to 1. Results

are expressed as mean  $\pm$  SD (n=3). Statistical significance was determined by Student's test, \*P<0.05, \*\*P<0.01. (D) Morphologies, PAS staining showing cell ability to store glycogen, Oil Red O staining evidencing lipid storage, and immunostainings of hepatocyte markers in HB-iHeps and Corr-HB-iHeps at day 25 of the differentiation. Nuclei were counterstained with DAPI. ATP7B: copper-transporting P-type ATPase; ZO-1: Zonula occludens-1. (E) Western blot analyses of immunoprecipitated FIX extracted from HB-iHeps and Corr-HB-iHeps at day 30 of differentiation. The FIX bands obtained in both differentiated clones were quantified with the ImageJ software where FIX band in HB-iHeps has been arbitrarily set to 1. Results are expressed as mean  $\pm$  SD (n=2). Statistical significance was determined by Student's test, \*\*P<0.01.

**Figure 3. Hepatocyte differentiation of corrected and non-corrected HB-iPSC in aggregates.** (A) Relative quantification by quantitative RT-PCR, in HB-iHeps and Corr-HB-iHeps, of *ALB* and *F9* mRNA levels at day 20 and 25 of the 3D differentiation protocol after aggregation at day 11. Gene expression levels were measured in triplicates and normalized according to *RPL13a* expression. Human adult hepatocytes (PHH), human fetal liver and hepatocytes differentiated from HepaRG cells were used as controls. The value of HH was arbitrarily set to 1. Results are expressed as mean  $\pm$  SD (n=3). Statistical significance was determined by Student's test, \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001. (B) Morphology, PAS staining showing cell ability to store glycogen, Oil Red O staining evidencing lipid storage, as well as immunostainings of HB-iHeps and Corr-HB-iHeps at day 25 of the 3D-hepatocyte differentiation protocol on cryosections of spheroids embedded in OCT. Connexin 32: gap junction protein  $\beta$ 1, SRB1: scavenger receptor class B member 1, SREBP2: sterol regulatory element-binding protein-2. Scale bars represent 100 $\mu$ m.

Figure 1

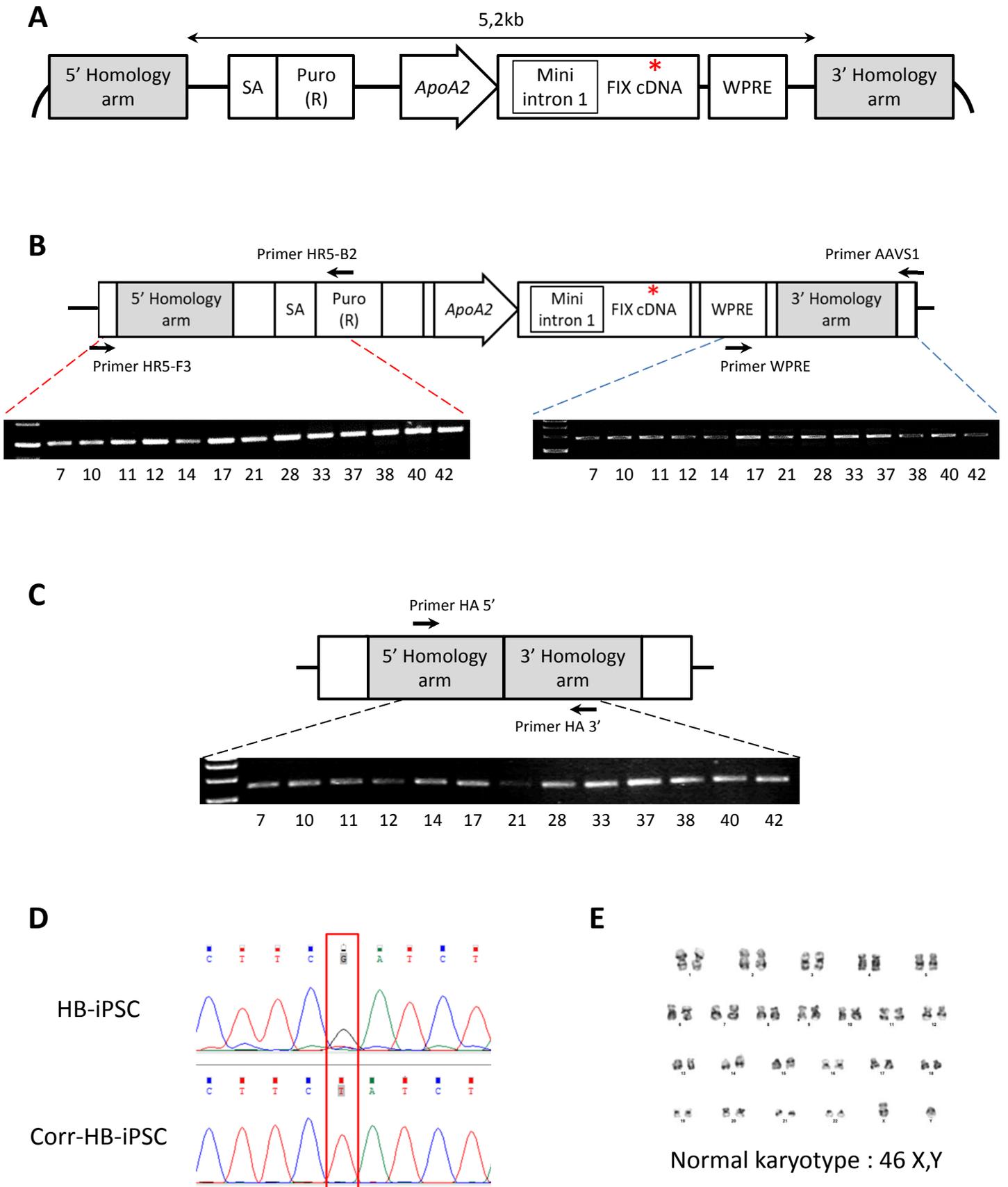


Figure 2

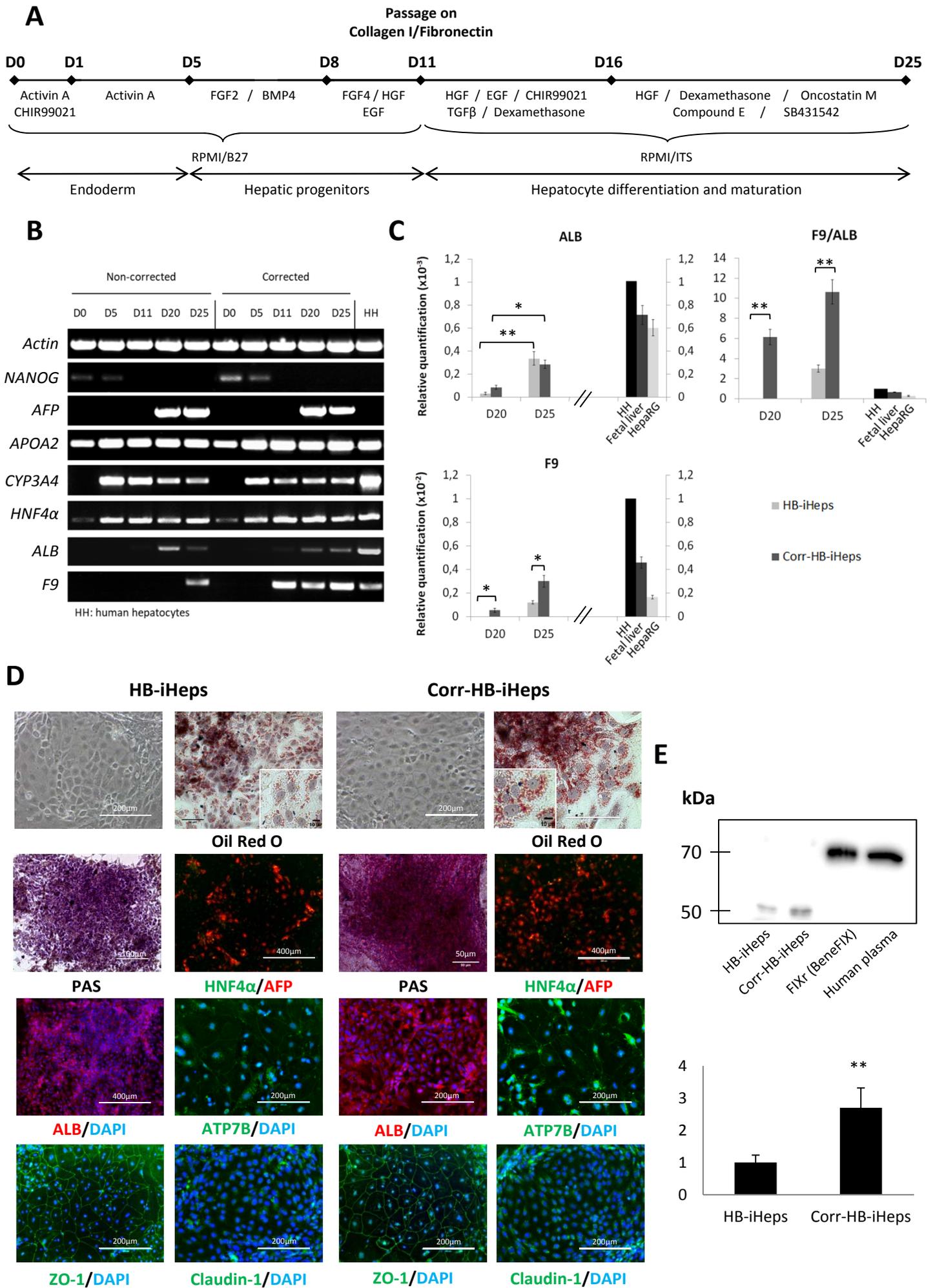
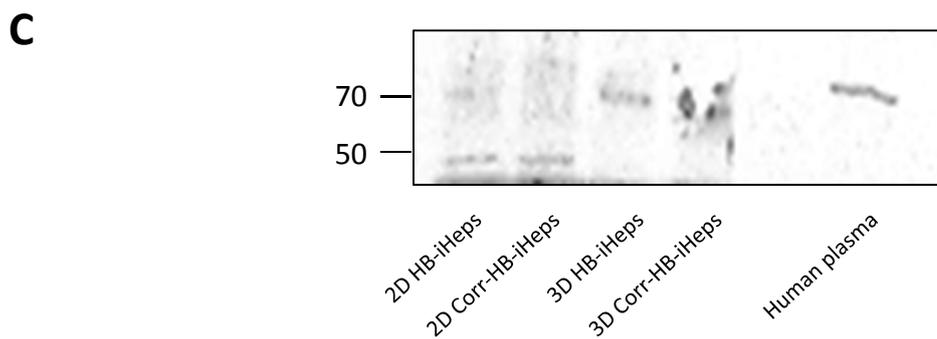
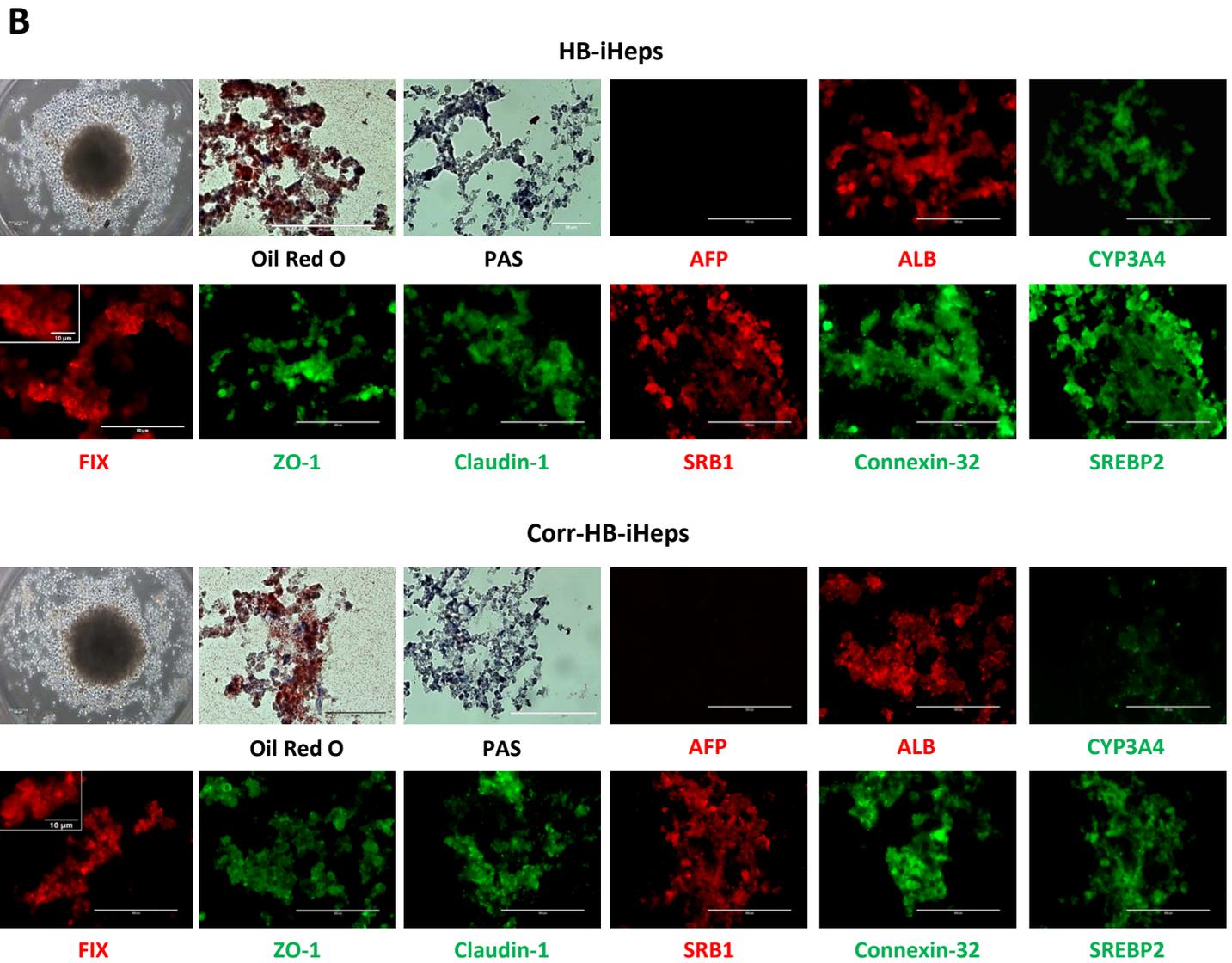
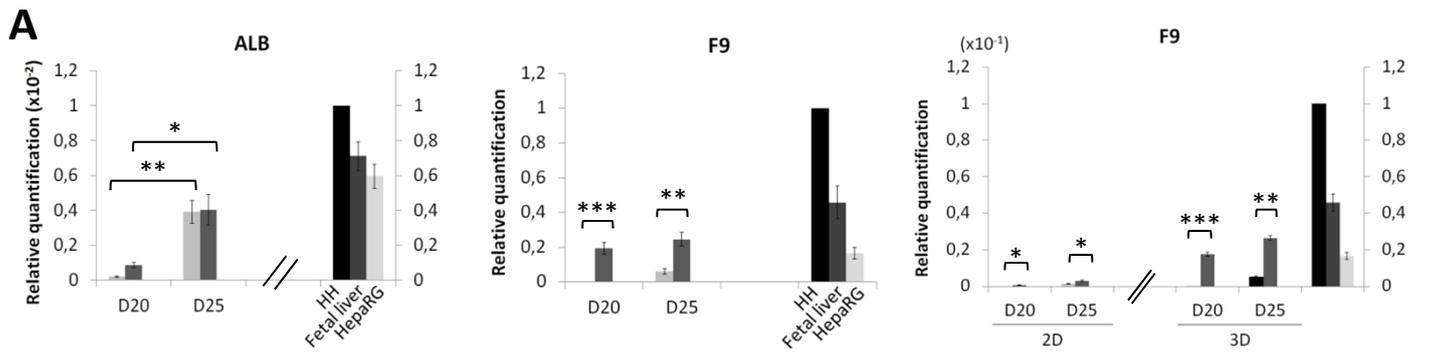


Figure 3



## Supporting Information

**Table S1:** List of RT-PCR and RT-qPCR primers used in this study.

**Table S2:** List of primary and secondary antibodies used in this study.

**Supplementary figure 1:** HB2P2 iPSC line characterization.

**Supplementary figure 2:** Differentiation of non-corrected and corrected HB-iPSC into bipotent hepatoblasts

**Table S1:** List of RT-PCR and RT-qPCR primers used in this study.

	<b>Human Gene</b>	<b>Primer 5' sequence</b>	<b>Primer 3' sequence</b>
<b>RT-PCR</b>	AFP	AGC TTG GTG GTG GAT GAA AC	CCC TCT TCA GCA AAG CAG AC
	ALBUMIN	CCT TTG GCA CAA TGA AGT GGG TAA CC	CAG CAG TCA GCC ATT CAC CAT AGG
	APOA2	GGA GAA GGT CAA GAG CCC AGA G	AGC AAA GAG TGG GTA GGG ACA G
	$\beta$ ACTIN	GCA CTC TTC CAG CCT TCC TTC C	CTG CTG TCA CCT TCA CCG TTC C
	CYP3A4	GAT TTG GCT CCT CTG CTT CT	GCC TCC TGT GTA GTG AGA TTA C
	F9	GTC CTG TGA ACC AGC AGT GCC	TTG TCA GCA ATG CAA ATA GGT
	FLK1	AGT GAT CGG AAA TGA CAC TGG A	GCA CAA AGT GAC ACG TTG AGA T
	GATA2	GCA ACC CCT ACA ATG CCA ACC	CAG TGG CGT CTT GGA GAA G
	GATA4	CTA GAC CGT GGG TTT TGC AT	TGG GTT AAG TGC CCC TGT AG
	HNF4 $\alpha$	CTG CTC GGA GCC ACC AAG AGA TCC ATG	ATC ATC TGC CAC GTG ATG CTC TGC A
	NANOG	TCC AAC ATC CTG AAC CTC AG	GAC TGG ATG TTC TGG GTC TG
	NCAM	ATG GAA ACT CTA TTA AAG TGA ACC TG	TAG ACC TCA TAC TCA GCA TTC CAG T
PAX6	TCT AAT CGA AGG GCC AAA TG	TGT GAG GGC TGT GTC TGT TC	
<b>qRT-PCR</b>	ALBUMIN	TGA AAC ATA CGT TCC CAA AGA GTT T	CTC TCC TTC TCA GAA AGT GCA TAT
	F9	GAC TTC ACT CGG GTT GTT	GAT AGA GCC TCC ACA GAA TG
	RPL13a	CTC AAG GTG TTT GAC GGC ATC C	TAC TTC CAG CCA ACC TCG TGA G
<b>Screening of corrected clones</b>	Puromycin	CTG GCG CCG CAC CGG CCC AAG G	TCG ACG TCG GCG GTG ACG GTG A
	HR5	CTG CCG TCT CTC TCC TGA GT	GTG GGC TTG TAC TCG GTC AT
	AAVS1-WPRE	CAC CAC GGA ATT GTC AGT GC	GGA ACG GGG CTC AGT CTG
	Bi-allelism	GCC CTA TGT CCA CTT CAG GA	ACA GGA GGT GGG GGT TAG AC
<b>Sequencing</b>	Patient's mutation	ACA CGA ACA TCT TCC TCA AA	TCC TTA ATC CAG TTG ACA TAC C
	Padua mutation	GGC AGG TTG TTT TGA ATG GT	GGG CCA CAA CTC CTC ATA AA
<b>Genotyping</b>	IMR 1741(a)	AGC TAT GGA ATT ACA TGA ACC C	
	IMR 1742	AAC AGG GAT AGT AAG ATT GTT CC	
	IMR 1743	TCC TGT CAT CTC ACC TTG CTC	

**Table S2:** List of primary and secondary antibodies used in this study.

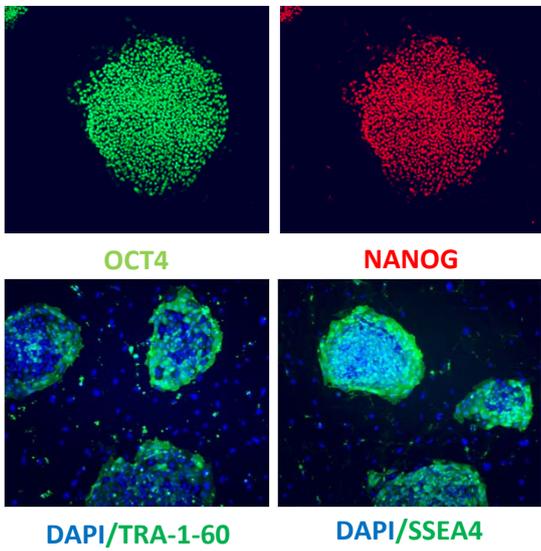
	<b>Protein</b>	<b>Reference</b>	<b>Species</b>	<b>Dilution</b>
<b>Immunofluorescence</b>	AFP	Santa Cruz - 8399	Mouse	1/200
	ALBUMIN	Cedarlane - 2513A	Mouse	1/200
	ATP7B	Novus Biologicals - 100-360	Rabbit	1/200
	CLDN-1	Life Technologies - 187362	Rabbit	1/200
	CYP3A4	Santa Cruz - 27639	Goat	1/200
	FIX	Genetex - 55312	Rabbit	1/100
	HNF4 $\alpha$	Santa Cruz - 8987	Rabbit	1/200
	NANOG	R&D - AF1997	Goat	1/150
	OCT-4	Santa Cruz - 5279	Mouse	1/200
	SSEA-4	Millipore - MAB4304	Mouse	1/200
	TRA1-60	Millipore - MAB4360	Mouse	1/200
	ZO-1	Novus Biologicals - 85047	Rabbit	1/200
<b>Flow cytometry</b>	IgG3 Isotype Control PE	BD Pharmingen - 12-4742	Mouse	1/20
	IGG	BD Pharmingen APC 555576	Mouse	1/25
	SSEA4	Ebioscience - 12-8843	Rat	1/20
	TRA-1-80	Ebioscience - 12-8883	Mouse	1/20
<b>Immunoprecipitation and Western Blot</b>	Actin	Abcam - ab8227	Rabbit	1/2000
	ECL IgG, HRP-linked	GE Healthcare - NA934	Rabbit	1/10000
	FIX	Affinity Biologicals - SAFIX-AP	Sheep	-
		Genetex - 55612	Rabbit	1/2000

**Supplementary figure 1. HB-iPSC line characterization.** (A) Expression of stem cell markers by immunostaining in HB-iPSC line (x100 magnification). Nuclei were counterstained with DAPI. (B) Quantification of the expression of TRA-1-80 and SSEA4 stem cell markers by flow cytometry. (C) Confirmation of the *in vitro* differentiation capacity of HB-iPSCs after spontaneous differentiation into embryoid bodies and RT-PCR analysis of the expression of markers of the three germ-layers (mesoderm: *FLK1* and *GATA2*; endoderm: *AFP* and *GATA4*; ectoderm: *PAX6* and *NCAM*). (D) Confirmation of the *in vivo* differentiation capacity of HB-iPSCs after injection of undifferentiated cells into NOD-SCID mice and the teratoma formation composed of cells differentiated from the three germ layers (mesoderm: bone and cartilage, endoderm: mucin-producing glands; ectoderm: neuronal epithelium). (E) Normal karyotype of HB-iPSC line (46 X,Y). (F) Patient's specific mutation G → A (GLU387LYS) confirmed by sequencing the exon 8 of the *F9* gene. (see Table S1 for the primers used and Table S2 for the antibodies used).

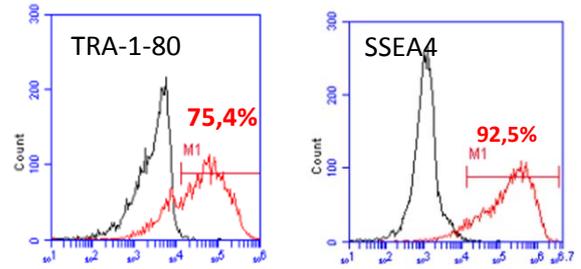
**Supplementary figure 2. Differentiation of non-corrected and corrected HB-iPSC into bipotent hepatoblasts.** (A) Morphologies, immunostainings and flow cytometry analyses showing the expression of definitive endoderm markers GATA4 and CXCR4 at day 5 of the hepatocyte differentiation of HB-iPSCs and corr-HB-iPSCs. (B) Morphologies, immunostainings and flow cytometry analyses showing the expression of hepatoblast markers HNF4 $\alpha$ , CK19, A1AT and FOXA2 at day 11 of the hepatocyte differentiation of non-corrected and corrected HB-iPSCs. CK19: cytokeratin 19; A1AT:  $\alpha$ -1 anti-trypsin. (C) Relative quantification by quantitative RT-PCR of *F9* mRNA levels at days 0, 5 and 11 of the differentiation protocol of HB-iPSCs and corr-HB-iPSCs. Gene expression levels were measured in triplicates and normalized using *RPL13a* gene expression. Human adult hepatocytes (HH) were used as control. The value of HH was arbitrarily set to 1. Results are expressed as mean  $\pm$  SD (n=3).

# Suppl figure 1

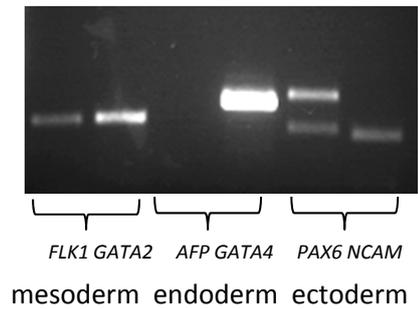
**A**



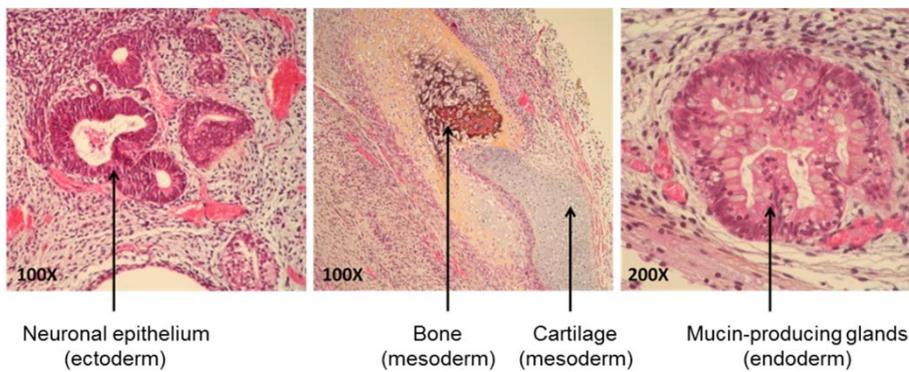
**B**



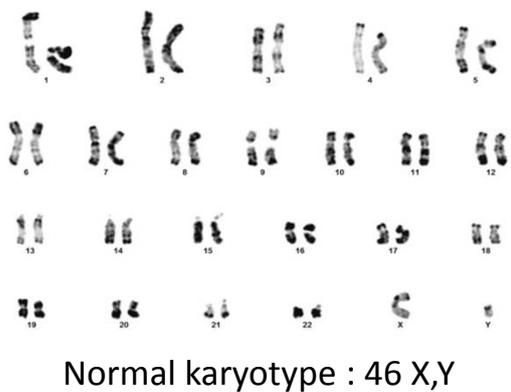
**C**



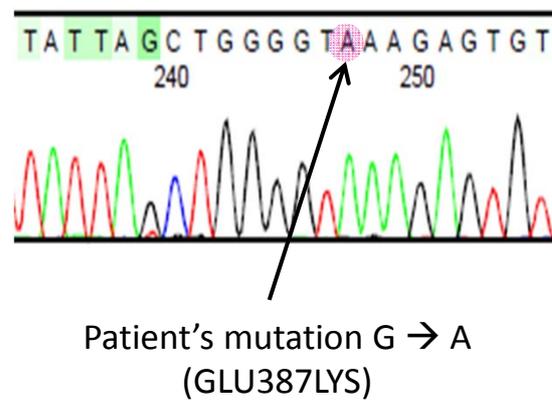
**D**



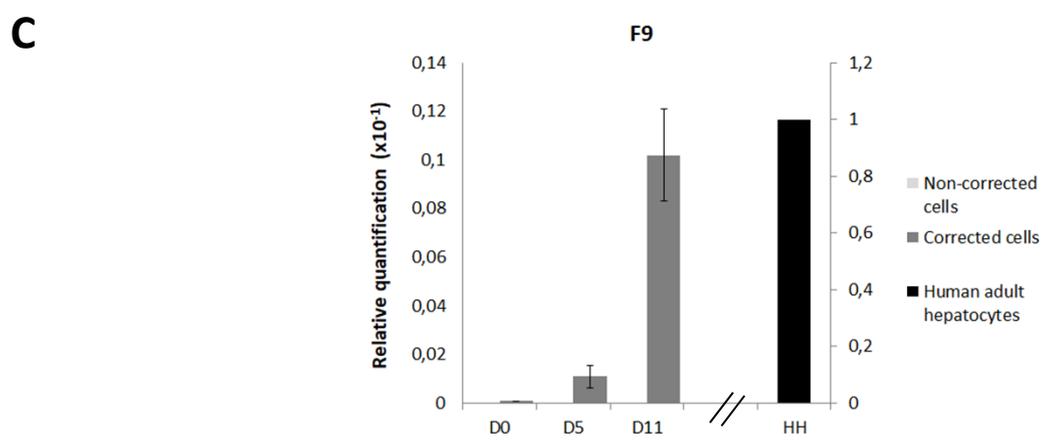
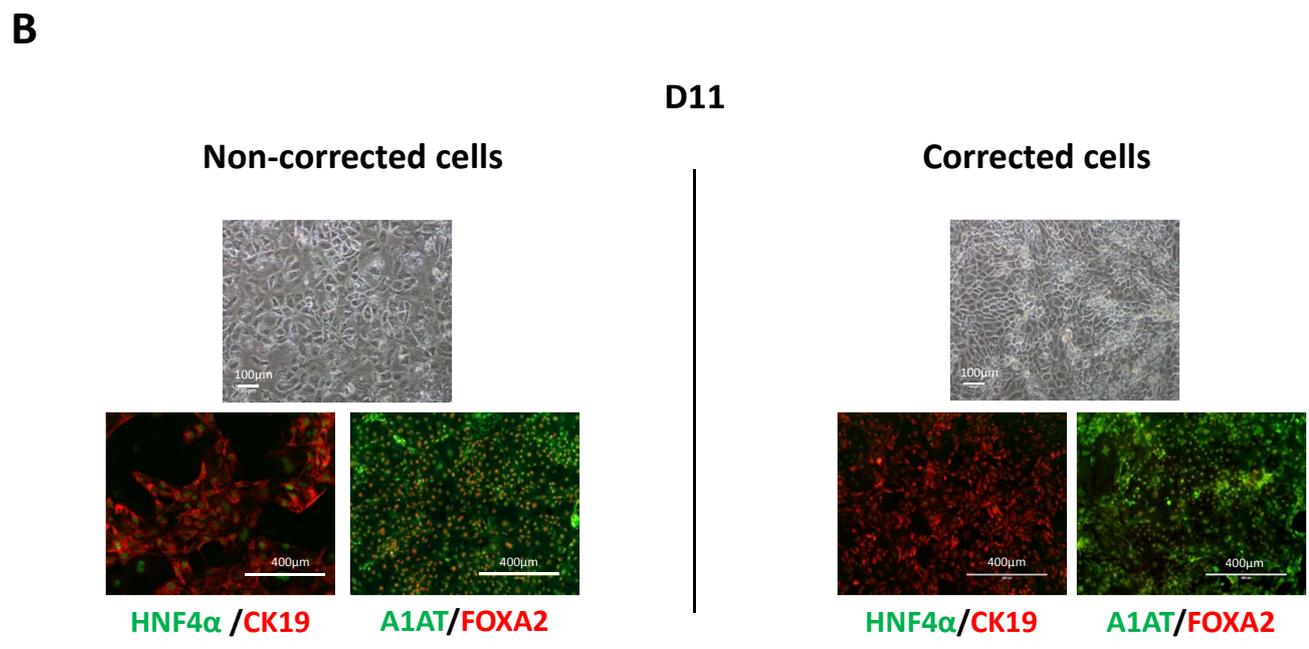
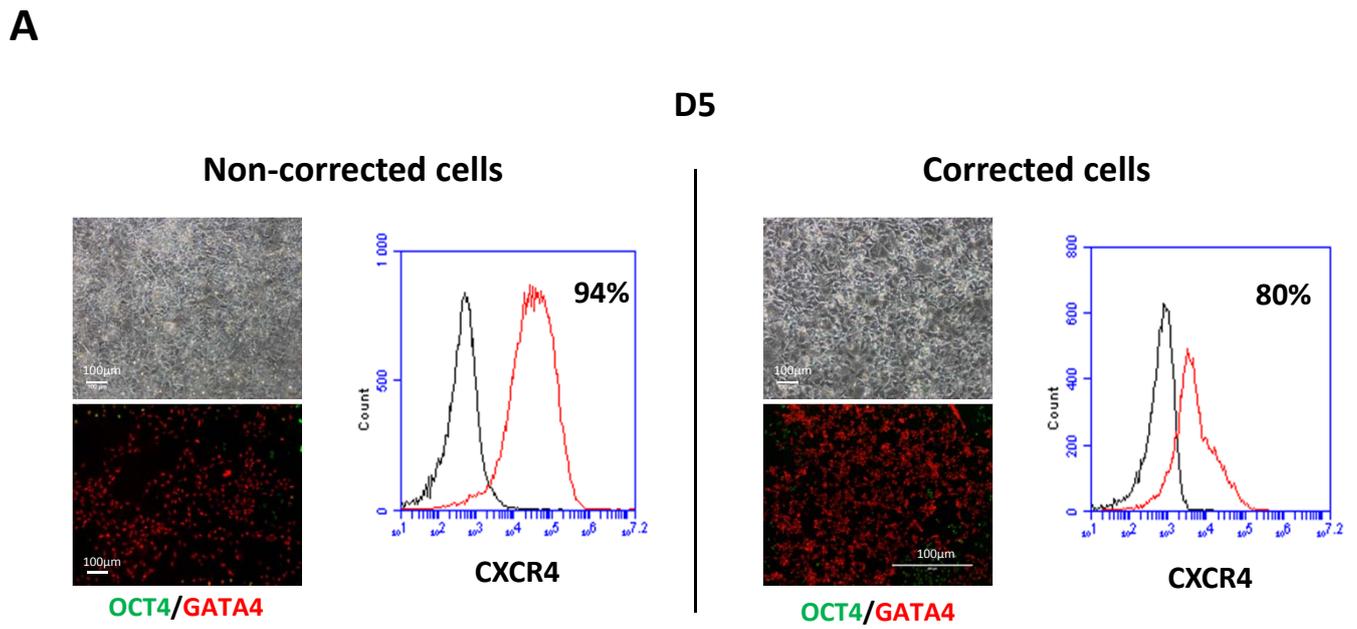
**E**



**F**



Suppl figure 2



## VIII. Discussion et perspectives

Au moment de la rédaction de ce manuscrit, ce projet n'est pas tout à fait achevé mais plusieurs points peuvent déjà être discutés.

Tout d'abord, nous avons obtenu et caractérisé des iPSC reprogrammées à partir de cellules d'un patient atteint d'hémophilie B sévère et avons confirmé que les HB-iPSC obtenues présentent la mutation du patient. Les raisons pour lesquelles la reprogrammation des différents prélèvements obtenus n'a pas été concluante ne sont pas clairement établies mais seront discutées plus en détail dans la discussion générale de ce manuscrit. Le fait de n'avoir obtenu qu'un clone HB-iPSC a été un handicap dans la réalisation de ce projet car il a déjà été montré, et nous l'avons confirmé au laboratoire dans d'autres modèles, que tous les clones iPSC ne répondent pas aux protocoles de différenciation de la même manière et ce seul clone avait une tendance à la différenciation spontanée.

J'ai par la suite mis au point la correction génétique des HB-iPSC en introduisant une cassette thérapeutique contenant un mini-gène du *F9* possédant la mutation Padua, décrite comme permettant une augmentation de l'activité spécifique du FIX<sup>443</sup>. Je n'ai pas eu le temps de caractériser en détail les clones obtenus par la technique des TALEN, puisque la contamination massive de notre L2 m'a fait perdre l'intégralité de mes clones avant d'avoir pu les congeler, mais cela m'a permis d'établir des conditions de sélection des clones iPSC par la puromycine et cela m'a été utile lors de la mise en œuvre de la correction génétique par le système des CRISPR/Cas9 et m'a permis d'obtenir plusieurs clones ayant intégré la cassette de correction au site ciblé *AAVS1*.

Ayant mis au point, en parallèle de la correction génétique, les conditions de différenciation des HB-iPSC en hépatocytes, j'ai par la suite ajusté ce protocole afin de différencier les HB-iPSC et les corr-HB-iPSC. Ce protocole m'a permis d'obtenir en 25 jours de différenciation, des cellules exprimant des marqueurs hépatocytaires spécifiques comme HNF4 $\alpha$  ou encore l'albumine, observables au niveau de l'ARNm par RT-PCR mais aussi au niveau protéique par immunofluorescence. Les résultats de RT-PCR quantitative ont montré l'apparition de l'ARNm du *F9* dès le 11<sup>e</sup> jour de différenciation (J11, hépatoblastes) des Corr-HB-iPSC, et donc l'expression de la cassette de correction à partir du promoteur *APOA2* puisque l'apparition de l'ARNm du *F9* à J25 seulement dans les HB-iPSC montre que le promoteur endogène du *F9* ne s'exprime qu'à partir de ce stade de différenciation.

L'étude de l'expression de la protéine FIX a été beaucoup plus problématique. D'une part, les modifications post-traductionnelles de la protéine nécessitent la présence de la vitamine K et, d'autre part, aucune étude n'ayant rapporté l'analyse de la fonctionnalité du FIX produite par des iPSC différenciées en hépatocytes, j'ai dû mettre au point, avec l'expertise d'Olivier Christophe, les conditions de traitement des cellules (choix de la vitamine K, dosage, temps de traitement...). Avant de tester mes échantillons, j'ai réalisé les mises au point de western blot sur du FIX recombinant, le BeneFIX, et j'ai, dans les débuts, obtenu de nombreuses bandes. J'ai donc affiné mon protocole mais je me suis heurtée à des problèmes de spécificité des anticorps utilisés, les résultats étant les mêmes dans mes contrôles positifs ou négatifs. J'ai finalement dû réaliser, avant western blot, une étape d'immunoprécipitation sur billes de sépharose. Il s'est avéré alors que 25 jours de différenciation permettaient de mettre en évidence l'ARNm du *F9* mais n'étaient pas suffisants à l'obtention du FIX dans mes cultures et après avoir mis au point les conditions nécessaires à la poursuite de cette

différenciation jusqu'à J30, j'ai ainsi pu visualiser par western blot le FIX produit par mes cellules. La différence de taille observée entre celui-ci et le FIX présent dans des échantillons de plasma humain ou de BeneFIX pouvant s'expliquer par un manque de maturation post-traductionnelle de la protéine, potentiellement dû à une différenciation incomplète des cellules, j'ai développé un protocole de différenciation en sphéroïdes pour essayer d'obtenir une maturation plus poussée des hépatocytes et, par conséquent, du FIX. Les résultats obtenus en RT-PCR quantitative et immunofluorescence sont plutôt encourageants quant au fait que la culture en 3D améliore l'efficacité de différenciation. Les résultats obtenus sur l'étude du FIX en western blot sont très récents et j'aimerais les confirmer très prochainement sur de nouveaux échantillons, mais ils confirment l'amélioration de la différenciation observée. La taille de la protéine obtenue en 3D est en effet bien plus proche de celle obtenue dans le plasma humain par rapport aux cellules obtenues en 2D, laissant penser que ce système permet une maturation plus poussée de la protéine. Les tests d'activité seront très prochainement réalisés par l'équipe d'Olivier Christophe, qui a mis au point les conditions de concentration des surnageants. J'espère ainsi pouvoir valider la correction des cellules *in vitro* dans le surnageant de culture en attendant de pouvoir valider notre stratégie chez l'animal.

En effet, la validation de notre stratégie chez l'animal va dépendre dans un premier temps de l'obtention de portées de souriceaux transplantables et de la survie des animaux pendant les premiers jours de leur vie. Depuis quelques mois maintenant, nous avons observé une très nette diminution du nombre de portées obtenues dans notre élevage, malgré des changements assez réguliers dans les accouplements, ainsi qu'un grand nombre de mort des nouveaux nés, le plus souvent sacrifiés par leur mère. Nous sommes freinés dans notre étude et ne pouvons qu'attendre de nouvelles portées à transplanter. Je continue donc bien évidemment à différencier mes cellules afin d'être prête à transplanter des nouveau-nés dès que l'occasion se présentera. Cependant, nous avons récemment réussi à transplanter 2 nouveaux nés et je suis actuellement en train de génotyper ces animaux et de réaliser des coupes des foies prélevés 15 jours après transplantation afin de voir si nos cellules transplantées ont greffé dans le foie. Evidemment, la transplantation de 2 animaux, même si nous obtenons de bons résultats, ne sera pas suffisante pour valider notre stratégie et la transplantation d'un plus grand nombre de portées reste notre objectif principal pour les mois à venir.

## Chapitre 3 : Preuve de concept pour la transplantation autologue d'hépatocytes dérivés d'iPSC de singe (siPSC)

Dans l'optique du développement d'une preuve de concept de thérapie cellulaire à partir d'hépatocytes dérivés d'iPSC, il est important de démontrer la faisabilité et la sécurité de la transplantation de ces cellules différenciées chez le gros animal. Notre équipe possède une forte expertise dans la transplantation d'hépatocytes chez le singe<sup>447,448</sup>. Un projet a ainsi été développé, en partenariat avec le Dr Leila Maouche-Chrétien du CEA de Fontenay-aux-Roses afin de reprogrammer des cellules iPSC à partir de cellules de singe (siPSC). Cette partie du projet a été réalisée avant mon arrivée au laboratoire par la doctorante qui m'a précédée, Clara Steichen. Je commencerai donc par présenter brièvement les résultats qu'elle a obtenus, puis j'exposerai plus en détails les expériences et les résultats que j'ai pu obtenir dans la mise au point du protocole de différenciation de ces iPSC simiennes ainsi que les préparations nécessaires à leur transplantation autologue chez le singe.

### I. Génération d'iPSC simiennes

#### A. Essais au laboratoire

Plusieurs essais ont été réalisés au laboratoire, sur des prélèvements de fibroblastes de peau de singe reprogrammés à l'aide de vecteurs lentiviraux et rétroviraux contenant les séquences humaines et simiennes des facteurs de reprogrammation. Aucun de ces essais n'a abouti. Par la suite, Clara a isolé des ECFC (Endothelial Colony Forming Cells) à partir de sang périphérique de singe. Ces cellules sont des progéniteurs endothéliaux circulants (PEC) qui prolifèrent de façon clonale et expriment fortement la télomérase. Des tentatives de reprogrammation par vecteurs lentiviraux et par ARNm ont été réalisées, sans succès.

#### A. Collaboration et caractérisation d'iPSC simiennes

En revanche, l'équipe du Dr. Leila Maouche-Chrétien du CEA de Fontenay-aux-Roses a obtenu et caractérisé plusieurs clones siPSC à partir de cellules de la moelle osseuse d'un jeune singe, après deux transfections successives de rétrovirus OSKM<sup>210</sup>. Nous avons donc récupéré l'un de ces clones au laboratoire, le 902.2, dont la caractérisation est présentée figure 43.

Nous avons ainsi confirmé que les cellules exprimaient des marqueurs de cellules souches comme OCT4, et NANOG par immunofluorescence (fig.44A), mais aussi par RT-PCR (fig.44B). Nous avons également vérifié la pluripotence de ces cellules *in vivo* en les injectant à des souris immunodéficientes puis en montrant, par analyse histologique, dans les tératomes formés, des tissus issus des trois feuillets embryonnaires (fig.44C). Enfin, nous avons vérifié la normalité du caryotype (fig.44D).

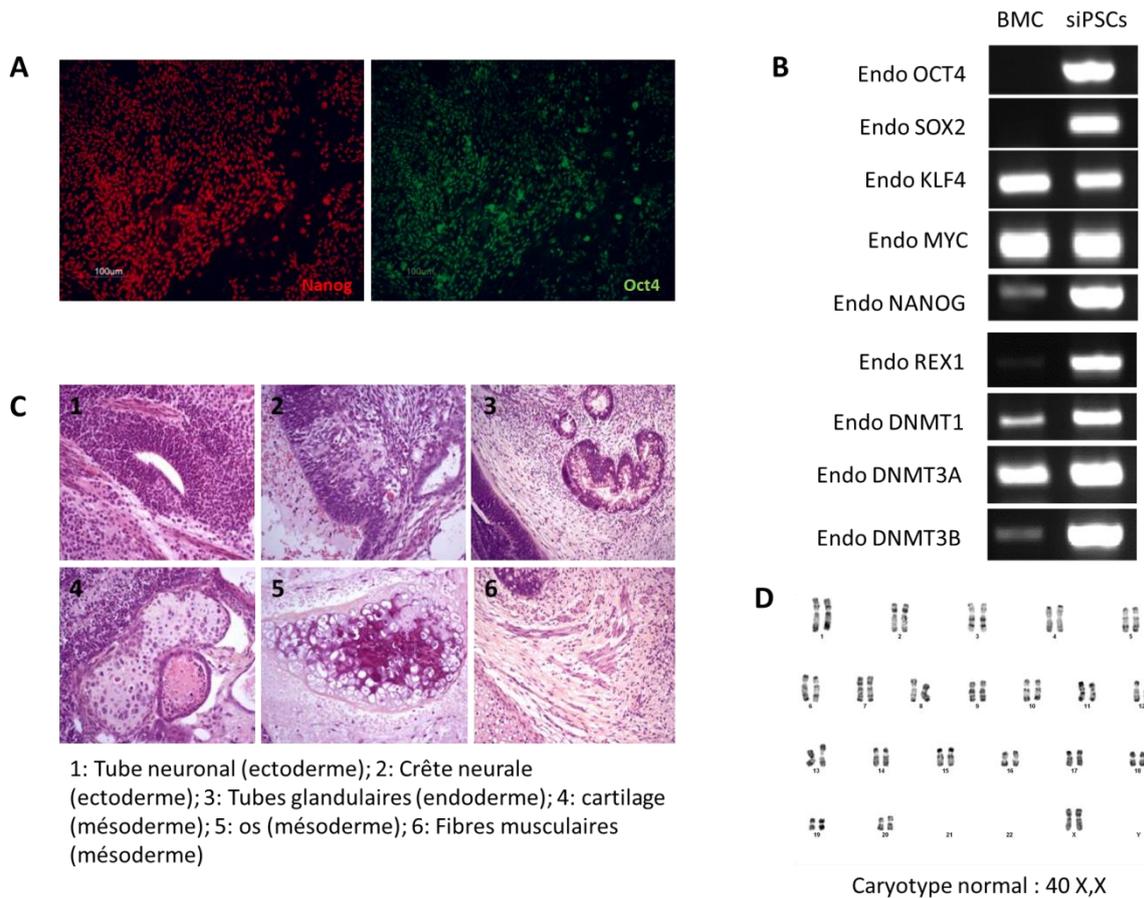


Figure 44: Caractérisation du clone siPSC 902.2

## II. Culture des siPSC

Avant de présenter les expériences de différenciation hépatocytaire des siPSC, il me paraît important de préciser quelques caractéristiques de ces cellules en culture. En effet, si elles présentent des caractères très proches des iPSC humaines (hiPSC) comme présentées dans la figure 44, leurs conditions de culture varient de celles des cellules humaines et plusieurs paramètres ont dû être adaptés pour leur maintien à l'état indifférencié.

En effet, si le changement de milieu des hiPSC peut se faire tous les 2 jours, les siPSC requièrent un changement quotidien de milieu, leur morphologie se dégradant très rapidement dans le cas contraire. De plus, les siPSC prolifèrent bien plus rapidement que les hiPSC, nécessitant un passage tous les 5 jours maximum au lieu de 7 pour les hiPSC. Il faut savoir également que ces cellules ne forment pas de colonies compactes, aux bords bien définis, comme les hiPSC. Un passage mécanique est donc quasi impossible, même sous une loupe binoculaire, et l'élimination des cellules spontanément différenciées est très difficile, nécessitant la décongélation régulière d'une nouvelle ampoule de cellules.

Si celles-ci se décongèlent très facilement la plupart du temps, il faut également noter que leur comportement durant la différenciation est très différent si l'expérience est réalisée quelques jours

ou quelques mois après décongélation. En général, il faut plus d'une dizaine de passages avant d'obtenir des cellules capables de se différencier en hépatocytes, quel que soit le protocole utilisé.

Enfin, ni moi ni Clara Steichen n'avons jamais réussi à cultiver ces cellules en feeder-free sur Matrigel ou Geltrex. Ces cellules sont donc exclusivement cultivées sur MEF, qui doivent être éliminées avant de débiter le protocole de différenciation.

### III. Différenciation hépatocytaire des siPSC

Comme nous venons de le voir, les siPSC et les hiPSC ne se comportent pas exactement de la même manière en culture. Aussi, j'ai dû adapter certains paramètres du protocole de différenciation que j'ai développé pour les cellules humaines, en ajustant principalement les concentrations des facteurs de croissance utilisés (fig.45).

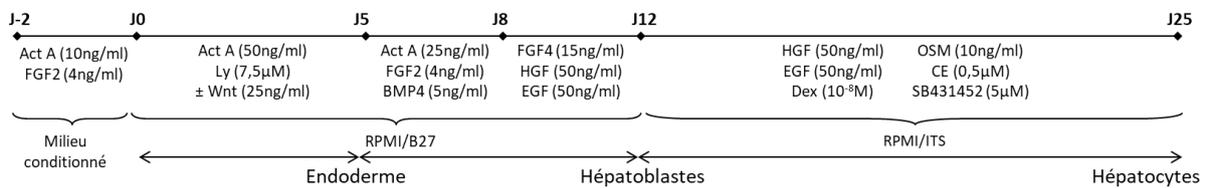


Figure 45: Protocole de différenciation hépatocytaire mis au point pour les siPSC

En mettant au point les outils adaptés, j'ai réalisé des analyses par RT-PCR au cours de la différenciation montrant la disparition des marqueurs de pluripotence comme *OCT4* et *NANOG* ainsi que l'apparition de marqueurs hépatiques comme *FOXA2*, *HNF4α*, *AFP* et *ALB* (fig.46).

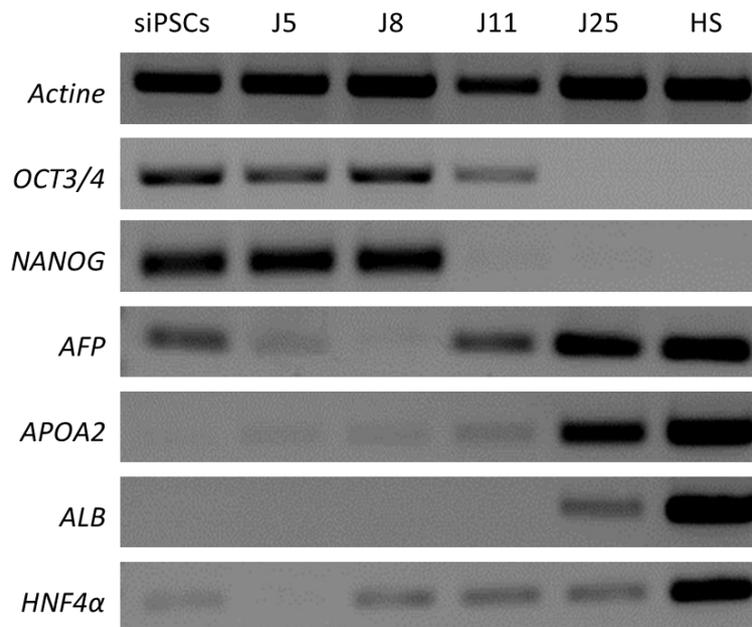


Figure 46: Analyse par RT-PCR de l'expression de marqueurs spécifiques au cours de la différenciation hépatocytaire des siPSC.

J'ai pu observer un changement de morphologie des cellules en cours de différenciation et j'ai également analysé, par immunofluorescence et cytométrie de flux, l'expression de protéines spécifiques à différents stades de la différenciation (fig.47). J'ai ainsi observé la disparition de l'expression des marqueurs de pluripotence comme OCT4 à J5 ainsi que l'expression de marqueurs spécifiques de l'endoderme comme GATA4 et CXCR4 (97% de cellules positives). Au stade hépatoblaste (J11), on observe la présence de marqueurs spécifiques comme HNF4 $\alpha$ , FOXA2 et CK19.

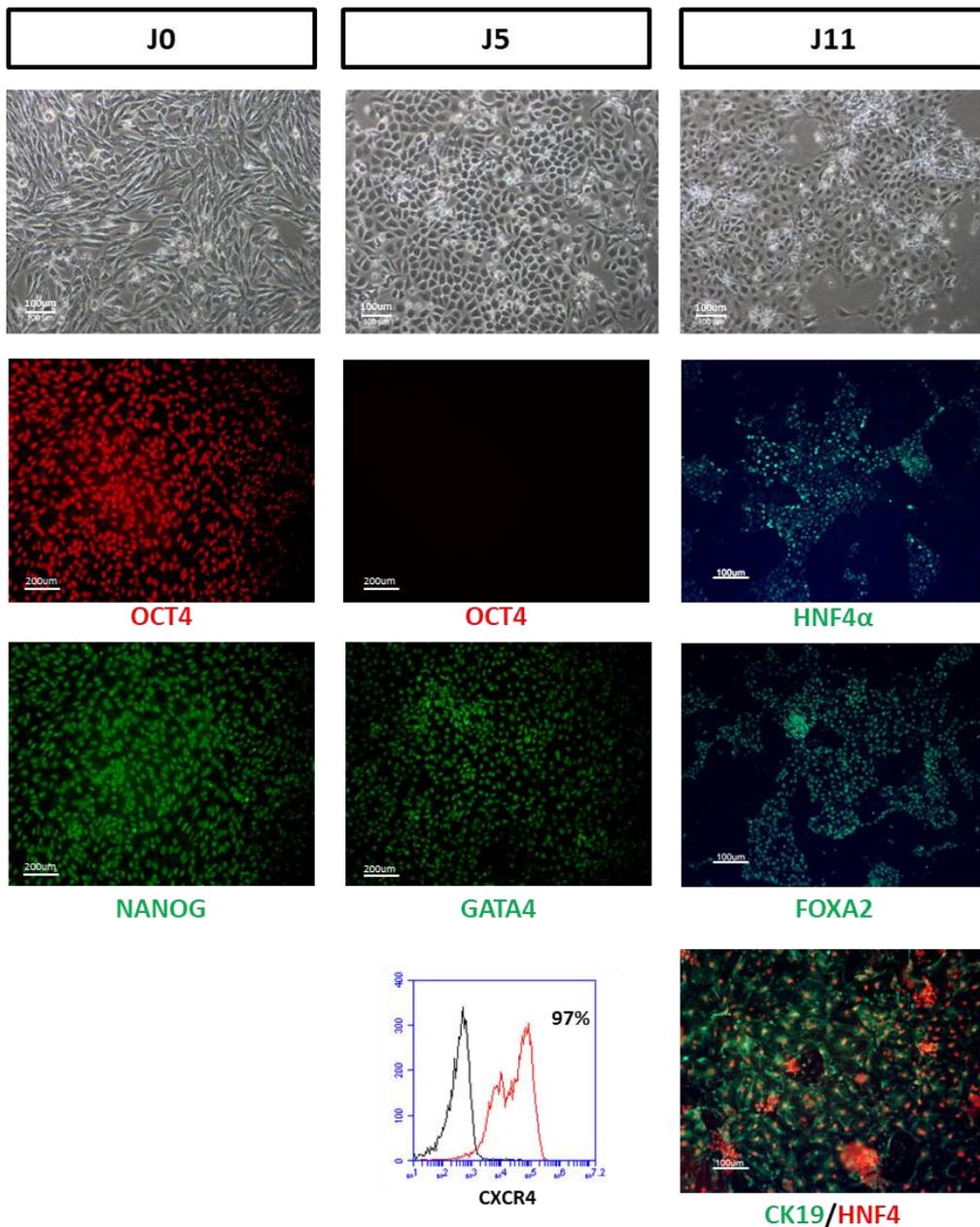
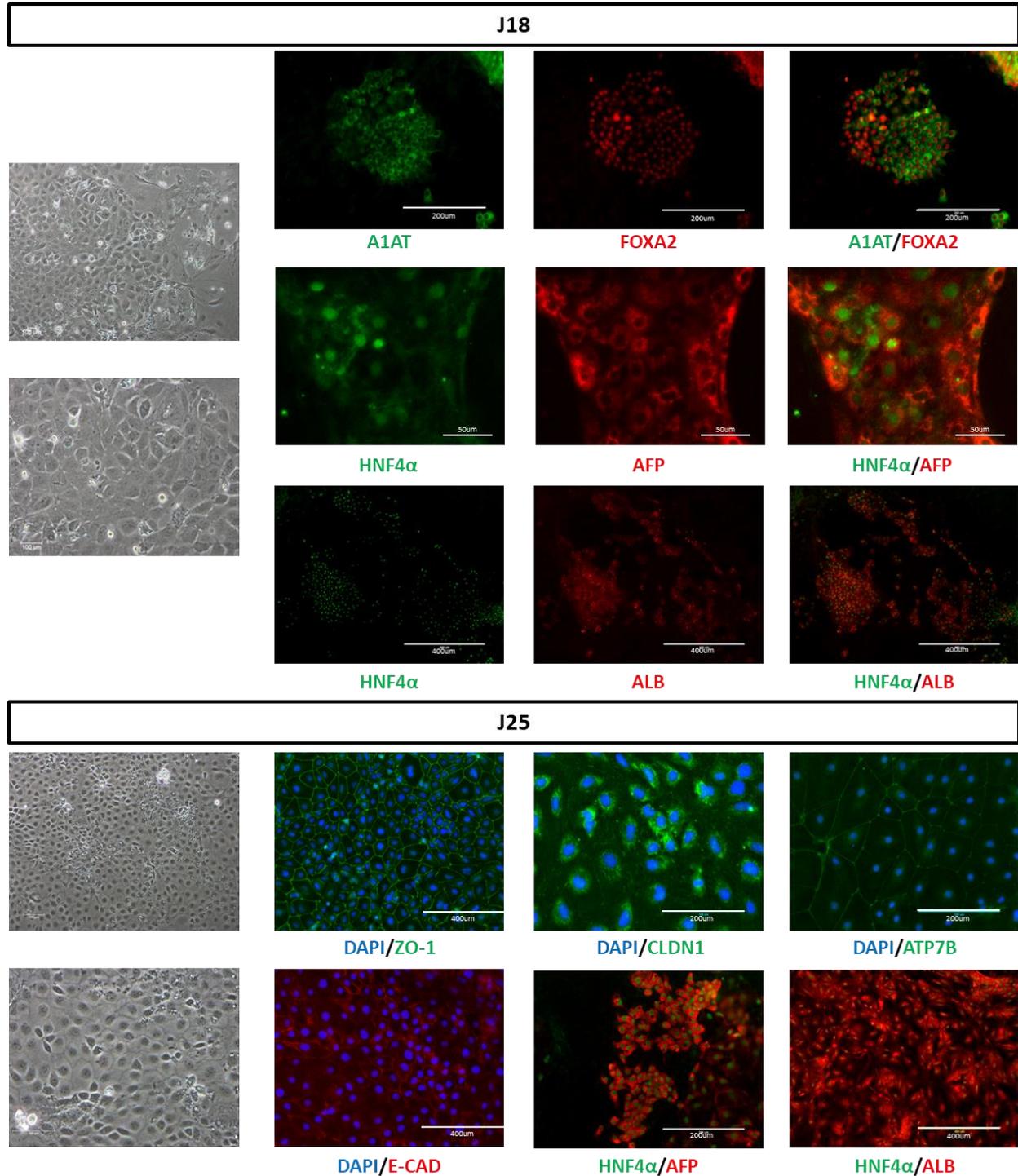


Figure 47: Caractérisation par immunofluorescence et cytométrie de flux des siPSC dans les premiers stades de la différenciation (J0 à J11)

A partir de J18, les cellules commencent à exprimer des marqueurs hépatocytaires comme HNF4 $\alpha$ , A1AT, FOXA2 mais aussi l'AFP et l'ALB, et à J25 les cellules présentent une morphologie caractéristique des hépatocytes, ainsi que des marqueurs comme l'ALB, E-CAD, ZO-1, CLDN1, et l'ATP7B (fig.48).



**Figure 48:** Caractérisation par immunofluorescence et cytométrie de flux des siPSC dans les derniers stades de la différenciation (J18 à J25)

#### IV. Transplantation des cellules différenciées chez la souris

Avant la transplantation des hépatocytes différenciés à partir de ses propres siPSC chez notre singe, ce qui représente un investissement considérable en termes de temps et de finances (environ  $10^9$  hépatocytes à produire, soit environ 250 m<sup>2</sup> de surface ou un peu plus de 45 000 B10...), il est nécessaire de vérifier leur capacité à greffer et à proliférer *in vivo* dans le foie chez le petit animal.

Pour cette partie du projet, nous collaborons avec Hélène Strick-Marchand à l'institut Pasteur qui a construit un modèle de souris BALB/c Rag2<sup>-/-</sup>IL-2R $\gamma$ c<sup>-/-</sup> NOD.*sirpa* uPA<sup>tg/wt</sup> (BRGS-uPA)<sup>353</sup>. Ce modèle murin présente une cytolysse chronique des hépatocytes résidents via l'activation de l'uPA (urokinase-type plasminogen activator) sous le contrôle du promoteur *Alb*, et donc un avantage sélectif des cellules transplantées par rapport à la régénération endogène et une amélioration de la prise de greffe.

Ainsi, 8 semaines après transplantation chez la souris adulte, la prise de greffe pourra être évaluée après prélèvement du foie des animaux afin de détecter la présence d'hépatocytes matures dérivés des siPSC, par marquages immuno-histochimiques et détection d'albumine simienne.

En raison de leur déficit immunitaire profond associé à une insuffisance hépatique chronique, ces souris sont des animaux très fragiles et sensibles à leur environnement et des problèmes au sein de l'animalerie dans laquelle elles sont hébergées ont provoqué un arrêt temporaire de l'élevage. Sa reprise ayant demandé de nombreuses semaines, et se faisant très lentement, nous n'avons pas encore pu transplanter les animaux au moment où ce manuscrit est rédigé.

#### V. Mises au point des conditions de la transplantation chez le singe

##### A. Transduction GFP

Dans le cas d'une transplantation autologue, il est impossible de discriminer les cellules transplantées des cellules résidentes. Il est donc nécessaire de marquer ces cellules avant leur transplantation chez l'animal. J'ai mis au point les conditions de transduction des hépatocytes dérivés des siPSC à l'aide d'un lentivirus GFP (fig.49).

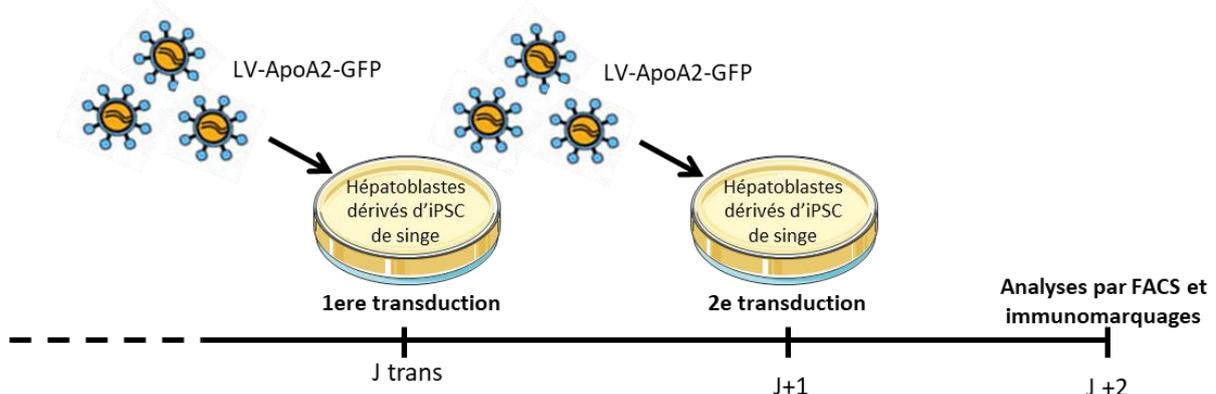
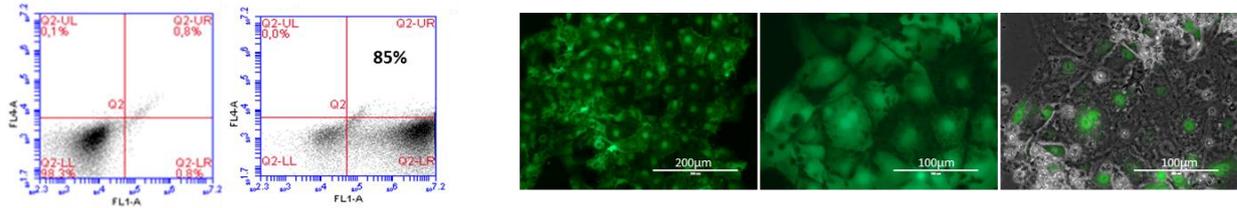


Figure 49: Protocole de transduction de cellules siPSC différenciées en hépatocytes à l'aide de vecteurs lentiviraux codant la GFP.

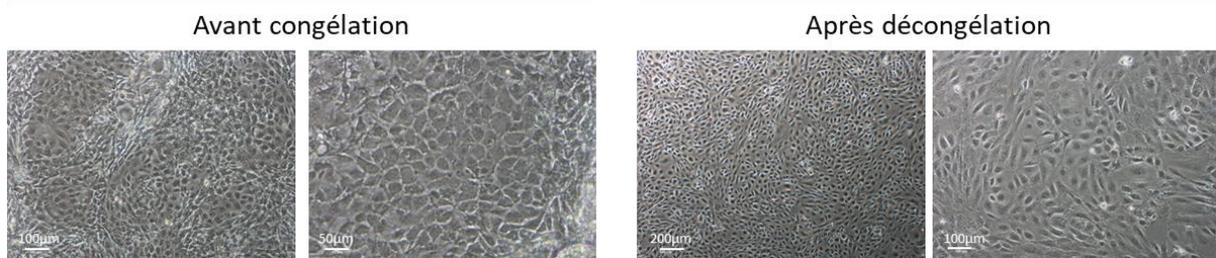
Après double transduction des cellules à J16 de la différenciation, une analyse par cytométrie montre la présence d'environ 85% de cellules GFP positives (fig. 50).



**Figure 50:** Analyse par cytométrie en flux de l'expression de GFP dans les cellules différenciées transduites (85% GFP+) et détection de la GFP par immunofluorescence (de gauche à droite).

## B. Banque de cellules

La transplantation hépatique d'hépatocytes par voie portale chez la souris adulte nécessite environ 0.8 à 1 million de cellules par animal transplanté. Pour une transplantation chez le singe, il faut compter au moins 500 millions de cellules viables. J'ai donc mis au point les conditions de congélation/décongélation des cellules différenciées à partir de siPSC afin de créer une banque de cellules (fig.51). Les hépatocytes étant très sensibles à la congélation/décongélation, il est nécessaire de trouver les meilleures conditions afin de maintenir une bonne viabilité de nos cellules à la décongélation. Les cellules sont donc congelées à une concentration de  $10^6$  cellules/ml dans une solution de rinçage et de conservation hypothermique d'organes (du type rein, foie, et pancréas) « SCOT 15 Multi-Organes Abdominaux » en présence de 10% de SVF, 10% DMSO et 25µM vitamine E. La décongélation des cellules se fait en milieu RPMI/ITS complétement en BSA (1%), 50ng/ml HGF, 10ng/ml OSM et  $10^{-8}$ µM Dex. Un comptage des cellules viables, discriminées à l'aide de bleu trypan, a permis de déterminer la viabilité à 48h et celle-ci est supérieure à 95% ( $95.5\% \pm 3.5$ ). Je poursuis actuellement les séries de congélation afin d'avoir une banque de cellules suffisante à la transplantation du singe.



**Figure 51:** Morphologie des siPSC différenciées en hépatoblastes congelées à J18 de la différenciation hépatocytaire (panneaux de gauche) puis 2 jours après décongélation (panneaux de droite)

De plus, afin d'obtenir un nombre suffisant de cellules sans trop de variabilités due aux différentes expériences de différenciation, j'ai également mis au point la différenciation de ces cellules à plus grande échelle, dans des systèmes de cultures clos « cell factory stacks » de 636 cm<sup>2</sup>, soit l'équivalent de 11 plaques 6 puits, permettant la différenciation de 20 millions de cellules.

### C. Conditions de transplantation chez le singe

Cette dernière étape consistera à transplanter les hépatocytes dérivés des siPSC et marqués à la GFP dans le foie du singe. Cette étape demandant un savoir-faire chirurgical et des locaux équipés en conséquence (MIRcen à Fontenay aux roses où est hébergé notre singe), elle sera réalisée par les chirurgiens de l'équipe, I. Dagher, P. Lainas, H. Tranchart et M. Gaillard qui exercent à l'hôpital Antoine Béchère de Clamart, qui sont expérimentés dans la transplantation d'hépatocytes, en particulier chez le singe<sup>448</sup>.

Ainsi, au travers d'une chambre implantable située sur la veine mésentérique inférieure, une embolisation partielle répétée de la veine porte, à l'aide d'un matériel résorbable, sera pratiquée et suivie de la transplantation des hépatocytes transduits avec le vecteur GFP.

Nous pourrions ensuite étudier la prise de greffe sur des biopsies de foie de l'animal à des temps variables par détection des cellules GFP positives. L'injection 4 heures avant la biopsie hépatique de 50mg/kg de BrdU permettra d'évaluer la régénération hépatique après immunomarquage de coupes de foie en paraffine.

## VI. Perspectives

Je n'ai pas pu tenir les objectifs que je m'étais fixés pour cette partie du projet. En effet, comme je l'ai évoqué précédemment, les siPSC sont des cellules très sensibles en culture, il faut donc régulièrement en décongeler une nouvelle ampoule et entretenir les cellules en culture pendant plusieurs semaines avant de pouvoir les différencier. De plus, si le protocole développé permet l'obtention d'une population homogène de cellules exprimant des marqueurs hépatocytaires, les expériences ne sont pas très reproductibles. Les soucis de l'élevage des souris BALB/c Rag2<sup>-/-</sup>IL-2Rγc<sup>-/-</sup>NOD.sirpa uPA<sup>tg/wt</sup> ont également été problématiques.

Cependant, nous avons maintenant un protocole de différenciation hépatocytaire plutôt efficace, qui permet d'obtenir des cellules exprimant des marqueurs spécifiques. Les cellules obtenues après 20 jours de différenciation sont plus homogènes que les hépatocytes obtenus à partir des hiPSC.

J'ai également adapté le protocole de différenciation pour une culture à plus grande échelle, nécessaire pour la différenciation et la congélation d'un nombre de cellules suffisamment important pour la transplantation du singe. Les conditions de congélation/décongélation permettent une bonne viabilité cellulaire des cellules adhérentes après 24h.

La capacité de ces cellules à greffer et à proliférer *in vivo* chez le petit animal reste, je pense, un point capital qu'il faudra valider dans les mois à venir, avant d'envisager la transplantation chez le singe.

Je compte avancer le plus possible dans ce projet d'ici la fin de ma thèse, en agrandissant la banque de cellules différenciées, en organisant la logistique autour de la transplantation du singe et en

finalisant les démarches administratives et réglementaires nécessaires à la réalisation de la transplantation. Nous avons déjà discuté avec l'équipe des chirurgiens, ainsi que le personnel de l'animalerie du CEA afin d'établir un protocole pour la transplantation, ainsi que la transplantation non autologue chez un autre singe que le donneur des cellules somatiques à partir desquelles ont été obtenues les siPSC afin de valider ce protocole avant la transplantation autologue. Cette étape sera finalisée par l'étudiant qui me succèdera. Ceci représenterait alors le premier modèle simien de transplantation autologue d'hépatocytes dérivés d'iPSC.

# DISCUSSION GENERALE

---

## I. La problématique reprogrammation en iPSC des cellules de patients HB

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, de nombreuses équipes ont travaillé sur le développement puis l'amélioration de la méthode de reprogrammation rétrovirale initialement utilisée pour la reprogrammation en iPSC par l'équipe de Shinya Yamanaka en 2007. Des vecteurs rétroviraux excisables<sup>162</sup> ont ainsi été développés, ainsi que des méthodes non-intégratives, comme l'utilisation du virus de Sendai<sup>167</sup>, d'adénovirus<sup>166</sup>, de plasmides<sup>449</sup>, d'ARNm<sup>157</sup>, de protéines<sup>158</sup>, ou encore de miRNA<sup>168</sup>. Par la suite, d'autres types cellulaires que les fibroblastes utilisés par Yamanaka ont été utilisés, comme des kératinocytes<sup>450</sup>, des cellules sanguines<sup>169</sup> et même des cellules recueillies dans l'urine<sup>170</sup>. Ces iPSC ont été générées à partir de cellules d'individus « sains » puis par la suite à partir de cellules de patients. Ainsi, il existe à ce jour des iPSC reprogrammées à partir de cellules de patients atteints de maladies neuronales comme la maladie d'Alzheimer<sup>451</sup>, de Parkinson<sup>189</sup>, de Huntington<sup>452</sup>, la schizophrénie<sup>453</sup>, la sclérose latérale amyotrophique (SLA)<sup>454</sup>, le syndrome de Rett<sup>455</sup>; mais également de maladies métaboliques comme le diabète<sup>456</sup>, ou l'hypercholestérolémie familiale<sup>457</sup>; dégénératives comme la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA)<sup>193</sup>, ou génétiques comme la maladie de Crigler-Najjar<sup>458</sup> ou le déficit en alpha-1-antitrypsine<sup>192</sup>.

Plusieurs études rapportent l'utilisation d'iPSC dérivées à partir de cellules de patients afin de modéliser l'hémophilie A (HA). L'un de ces premiers travaux date de 2014, dans lequel les auteurs rapportent la reprogrammation de cellules recueillies dans l'urine de patients HA à l'aide de vecteurs non intégratifs épisomaux<sup>459</sup>. La plupart des études publiées par la suite sur ce sujet rapportent l'utilisation du même type cellulaire<sup>460,427,461</sup>, à l'exception d'une étude qui a utilisé des fibroblastes<sup>426</sup>.

La modélisation de l'hémophilie B est, en revanche, beaucoup moins décrite et les articles traitant de ce sujet sont très récents. Le premier article, publié en juillet 2017 par une équipe chinoise, rapporte la reprogrammation, à l'aide d'épisomes, de PBMCs d'une patiente de 46 ans atteinte d'HB mineure (activité FIX de 6%)<sup>415</sup>. Le second article, paru en septembre 2017 en même temps que notre article dans *JTH*, rapporte l'utilisation d'iPSC reprogrammées à partir de PBMC d'un patient HB<sup>462</sup>.

Dans notre cas, nous avons reçu au laboratoire plusieurs prélèvements, de plusieurs patients atteints d'HB depuis ces dernières années. Clara Steichen ayant amorcé ce projet, elle a reçu 2 biopsies de peau et un prélèvement de sang. Pour ma part, j'ai reçu également 2 prélèvements de sang. Le tableau ci-dessous récapitule les différentes tentatives de reprogrammation que nous avons réalisées, en précisant pour chacune le type de prélèvement, le type cellulaire utilisé, la méthode de reprogrammation ainsi que l'expérimentateur (tableau 5).

N° expérience	Prélèvement	Type cellulaire	Méthode de reprogrammation	Manipulateur	Résultat
1	Biopsie	Fibroblastes	Rétrovirus + ARNm	Clara Steichen	0 colonie iPSC
2	Biopsie	Fibroblastes	Rétrovirus + ARNm	Clara Steichen	1 colonie iPSC
3	Sang	ECFC	Rétrovirus + ARNm	Clara Steichen + prestataire extérieur	0 colonie iPSC
4	Sang	PBMC	Rétrovirus + VLP + épisomes	Eléonor Luce + prestataire extérieur	0 colonie iPSC
5	Sang	PBMC	Rétrovirus + VLP + épisomes	Eléonor Luce + prestataire extérieur	0 colonie iPSC

**Tableau 5:** Récapitulatif des expériences de reprogrammation de prélèvements de patients HB au laboratoire

Comme présenté dans le tableau ci-dessus, nous avons réalisé plusieurs tentatives de reprogrammation Clara et moi sur des types cellulaires différents et en utilisant des méthodes de reprogrammation différentes. Nous avons également fait appel à un prestataire extérieur, spécialisé dans la reprogrammation de cellules en iPSC par une méthode non-intégrative utilisant des épisomes. Cette société a d'ailleurs reprogrammé des échantillons de patients atteints d'hypercholestérolémie familiale, et de la maladie de Wilson pour d'autres projets développés dans notre équipe et a pu obtenir plusieurs clones pour chacun de ces derniers prélèvements. Il semblait donc y avoir une difficulté particulière à reprogrammer les cellules des patients hémophiles B mais il était difficile d'imaginer qu'il y ait un lien avec l'anomalie du FIX portée par ces patients.

Nous nous sommes alors renseignées sur les traitements suivis par les patients HB dont nous avons reçu les prélèvements afin de tenter de comprendre la source du problème. En effet, bon nombre de patients HB ont été contaminés par le VHC ou le VIH présent dans les lots de FIX qui leur ont été administrés et ils suivent parfois de lourds traitements. C'est par exemple le cas des patients à partir desquels nous avons obtenu les prélèvements 1 et 5, VHC et VIH positifs, suivant au moment du prélèvement un traitement anti-rétroviral comme le cocktail Truvada, Reyataz, Norvir ou encore EVIPLERA, associant des inhibiteurs de la transcriptase inverse et des inhibiteurs de protéases. Le patient dont nous avons obtenu le prélèvement de notre 4<sup>e</sup> essai était quant à lui VHC positif, mais VIH négatif, ne suivant plus aucun traitement antiviral au moment du prélèvement, mais ayant suivi avec succès deux ans auparavant un traitement composé d'interféron pégylé (PEG IFN), de Ribavirine et de Telaprevir. La ribavirine est un analogue nucléosidique de synthèse qui a, en association avec le PEG IFN, une activité à l'égard de certains virus à ADN et à ARN *in vitro* mais dont le mécanisme d'action est encore méconnu. Les patients dont nous avons obtenu les prélèvements de nos 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> essais ne présentaient quant à eux aucune infection virale et n'ont donc suivi aucun traitement antirétroviral.

Plusieurs études ont montré l'influence de certains traitements anti-rétroviraux comme les inhibiteurs de protéases (IP) sur les PBMC et en particulier l'induction d'un stress oxydatif important et une sénescence prématurée des cellules<sup>463</sup>. Ces résultats ont été confirmés sur des fibroblastes traités avec des IP utilisés en thérapie, entraînant également des anomalies dans la forme des noyaux, une diminution de la capacité de prolifération et une accumulation de prélamine A dans les cellules traitées<sup>464</sup>. La lamine A est une protéine participant à la structure du noyau et aux liaisons chromatine/membrane nucléaire et qui joue également un rôle dans les processus de mitose, de différenciation cellulaire et de mort cellulaire par apoptose. De plus, une étude publiée par une équipe chinoise en 2007 a montré que la surexpression de lamine A diminuait l'efficacité de reprogrammation de fibroblastes de souris<sup>465</sup>. Il serait intéressant de regarder si l'accumulation de prélamine A observée dans les fibroblastes humains traités par des IP peut également impacter l'efficacité de la reprogrammation, ce qui à ma connaissance n'a pas été étudié.

Si les traitements anti-rétroviraux peuvent potentiellement expliquer nos difficultés dans 3 de nos tentatives de reprogrammation, les causes exactes de ces échecs restent cependant encore incertaines. L'hémophilie (A ou B) étant une maladie monogénique qui se prête bien aux approches de modélisation par les iPSC et de correction génétique développées ces dernières années, et sur lesquelles nous reviendrons plus en détails par la suite, je suis surprise du peu de publications rapportant la reprogrammation de cellules de patients hémophiles, qui pourrait potentiellement s'expliquer par une difficulté partagée par d'autres laboratoires pour reprogrammer ces cellules. Une étude réalisée en 2010 par la Fédération Mondiale des Hémophiles a montré que 4.5% des patients hémophiles étaient contaminés par le HIV et 18% par le HCV. En revanche, le patient porteur de la « mutation royale » à partir duquel nous avons obtenu les premières HB-iPSC ne présentait aucune de ces infections et ne suivait aucun traitement antiviral. La question du traitement suivi au moment du prélèvement est donc, je pense, une question primordiale qu'il est nécessaire de se poser au moment de la sélection des patients, même si la pathologie d'intérêt, ici l'HB, ne requiert pas de traitement susceptible en premier lieu de perturber la reprogrammation.

## II. La correction génétique

### A. Quelle stratégie et quel outil ?

On peut distinguer deux grandes stratégies applicables à la correction génétique des iPSC. La première stratégie possible, rapportée dans l'article de l'équipe chinoise publié en septembre de cette année sur la correction d'HB-iPSC<sup>462</sup>, consiste à corriger directement la mutation responsable de la maladie chez le patient en remplaçant la séquence mutée par une version sauvage, non mutée. La seconde, que nous avons utilisée dans notre équipe, est d'insérer la séquence non mutée du gène codant pour la protéine faisant défaut à notre patient dans un site sûr et transcriptionnellement actif, dans un autre endroit du génome. Si la première stratégie est plus élégante et semble plus « propre » au premier abord que celle que nous avons développée, il est nécessaire de prendre en compte la multitude de mutations potentiellement responsables du phénotype chez les malades. En effet, l'hémophilie B, comme d'autres maladies génétiques d'ailleurs, n'est pas causée chez tous les patients par la même mutation, mais par plusieurs centaines, toutes différentes qui sont répertoriées dans une base de données ([www.factorix.org](http://www.factorix.org)). Le développement d'outils permettant la correction ciblée d'une mutation implique l'utilisation d'outils différents pour chaque patient, ce qui est

difficilement concevable dans une approche thérapeutique, du fait du temps et du coût d'une telle démarche et des nécessaires contrôles de sécurité indispensables à chaque nouvel outil développé, alors que notre stratégie permet, en utilisant les mêmes CRISPR/Cas9, d'accumuler de l'expérience avec cet outil et de continuer à le perfectionner. De plus, notre stratégie est également applicable à un grand nombre de maladies génétiques. Nous avons, par exemple, employé cette même stratégie pour corriger le phénotype de cellules reprogrammées à partir de prélèvements de patients atteints d'hypercholestérolémie familiale, en changeant uniquement la cassette de correction utilisée, mais en gardant les constructions de CRISPR/Cas ou de TALEN utilisées pour cibler le site *AAVS1* (Caron et al. – soumis pour publication). Dans cette approche, le choix du site d'insertion n'est évidemment par anodin. L'insertion d'une séquence exogène ne doit évidemment pas entraîner de perturbation dans l'expression des gènes de la cellule et la cassette insérée doit également pouvoir être transcrite, et donc introduite dans une région où la chromatine est ouverte. Le site *AAVS1* a été utilisé dans de nombreuses applications, permettant le développement d'outils commercialisés, et remplit ces différents critères.

Après avoir choisi la stratégie que l'on veut suivre vient le choix des outils. De plus en plus d'études rapportant la modification ciblée du génome, ou bien l'édition du génome, sont publiées actuellement. Les mots-clés « genome editing » renvoient à plus de 8 400 références sur PubMed, plus de 620 références pour les Zinc Finger Nucleases, 770 pour les TALEN, et déjà près de 600 pour le système CRISPR/Cas. Ces deux dernières techniques sont actuellement les plus utilisées. Comme évoqué dans l'introduction (chapitre 4 – VII), les TALEN permettent de cibler à peu près n'importe quelle région du génome car elles ne nécessitent qu'une thymidine en début de séquence cible<sup>425</sup>, à la différence de la technologie des CRISPR qui nécessite la présence d'une séquence PAM (5' NGG 3') à proximité du site ciblé. Les CRISPR sont en revanche de conception plus « simple ». Si l'efficacité de l'outil utilisé dépend en partie du type cellulaire et de la localisation de la séquence cible, des études ont montré que les CRISPR étaient plus efficaces dans des cellules souches pluripotentes par rapport aux TALEN<sup>435</sup>. De plus, des modifications ont été apportées au système CRISPR/Cas9 depuis sa découverte afin de pallier les problèmes de ciblage nécessitant la séquence spécifique PAM, qui bien que relativement fréquente dans l'ADN, ne se trouve pas toujours assez proche du site cible, comme le développement de variants synthétiques de la caspase 9<sup>466</sup>, ou encore l'utilisation de *cpf1* à la place de la *cas9* permettant de cibler des régions riches en AT<sup>467</sup>. L'efficacité des CRISPR peut également être améliorée, en utilisant des Cas9 modifiées qui permettent une cassure simple brin de l'ADN, au lieu de la cassure double brin du système classique<sup>468</sup>. L'utilisation de ces deux Cas9 dites « nickases » permet une efficacité augmentée ainsi qu'une diminution du risque de coupure non ciblée (« off-target ») que nous évoquerons par la suite. La spécificité du système a également été améliorée en utilisant des ARN guides tronqués<sup>469</sup>. Enfin, pour des applications *in vivo* utilisant des adeno-associated virus (AAV), parfois limitées par la taille de la *cas9* de *Staphylococcus pyogenes* couramment utilisée, l'enzyme de *Staphylococcus aureus* présente, par sa plus petite taille (environ 3Kb contre 4Kb), un sérieux avantage<sup>470</sup>.

Comme présenté dans le manuscrit (Résultats – Chap 2 – III), j'ai testé ces deux approches au laboratoire et en pratique leur utilisation ne diffère pas vraiment. Il est donc difficile de dire clairement si l'une de ces méthodes est meilleure que l'autre et le choix de la stratégie et de l'outil employés doit donc se faire, à mon avis, au cas par cas selon l'application et le type cellulaire étudié.

Dans le cas de l'hémophilie par exemple, les articles rapportant la correction du défaut génétique dans les iPSC rapportent l'utilisation des deux techniques. Le phénotype de près de la moitié des hémophiles A sévères étant dû à une large inversion au niveau de l'intron 22 du gène *F8*, situé sur le chromosome X<sup>471</sup>, l'étude de Park et *al.* rapporte l'utilisation des CRISPR/Cas9 afin de corriger cette inversion, permettant ainsi la production de FVIII par les cellules endothéliales différenciées à partir de ces cellules corrigées<sup>460</sup>. Plus récemment, une étude a rapporté la correction génétique du défaut en FVIII d'iPSC dérivées à partir de patients atteints d'HA sévère par l'utilisation de transcription activator-like effector nickases (TALENickases)<sup>461</sup>. Ce système est dérivé des TALEN (TALE nucléases), décrites dans l'introduction et utilise un domaine FokI muté (D450A) qui donne lieu à une coupure simple brin de l'ADN, au lieu d'une coupure double brin dans le système TALEN. Les auteurs rapportent une augmentation de FVIII dans les lysats et les surnageants de culture après différenciation des iPSC corrigées en cellules endothéliales. Concernant l'HB, l'article publié en septembre de cette année rapporte la correction des HB-iPSC à l'aide de la technologie des CRISPR/Cas9<sup>462</sup>. Après correction, les auteurs rapportent la différenciation des cellules en hépatocytes permettant la synthèse de FIX après 21 jours de différenciation.

Plus récemment encore que ces deux technologies, un article a été publié par une équipe japonaise rapportant la mise au point d'une nouvelle technique d'édition du génome couplant la technologie des CRISPR/Cas à l'activité de désamination des cytidines de l'AID (activation-induced cytidine deaminase)<sup>472</sup>. Cette activité de désamination a été démontrée comme essentielle pour la génération de variations génétiques permettant de diversifier les régions variables des immunoglobulines, permettant à notre système immunitaire de s'affiner. Les auteurs ont développé un complexe hybride CRISPR/Cas9 (dépourvu d'activité nucléase) – AID, appelé Target-AID, qui permet de cibler les mutations des cytosines dans une région de quelques paires de bases autour de la séquence PAM ciblée par les CRISPR (fig. 52). Cette technique a été d'ailleurs utilisée dans des plants de riz afin de développer des résistances à des pesticides<sup>473</sup>.

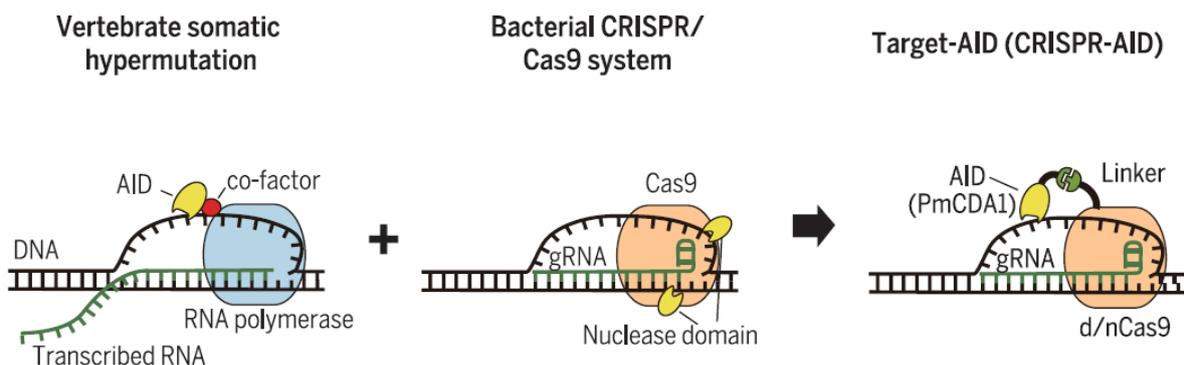


Figure 52: Construction des Target- AID (Nishida – *Science* - 2016)

Les potentielles applications de ces systèmes de modification ciblée du génome sont immenses, et ne se limitent pas, comme nous venons de le voir, à la recherche fondamentale médicale, mais à de nombreux autres domaines. J'ai moi-même été très surprise de la « facilité » d'utilisation de ces technologies au laboratoire, la plus grosse difficulté de cette partie de mon travail ayant porté sur la sélection des clones corrigés par la suite. L'enthousiasme est grand, et compréhensible, étant moi-même convaincue que des applications thérapeutiques énormes s'ouvrent à nous grâce à ces

systèmes. Cependant, il est nécessaire de garder à l'esprit que l'introduction de matériel exogène dans un ADN n'est pas anodine et que, même si de nombreuses améliorations évoquées précédemment ont déjà été apportées au système CRISPR/Cas9 afin d'augmenter sa spécificité, la possibilité d'introduire du matériel génétique étranger en dehors du site ciblé avec un risque de génotoxicité reste un risque qui ne doit pas être négligé.

#### B. L'intégration non spécifique : comment l'étudier et qu'en conclure ?

Je prendrai ici l'exemple des CRISPR, même si la même question se pose avec toutes les approches de modifications ciblées du génome utilisables à ce jour. Le système CRISPR/Cas9 « classique », est dépendant d'une séquence PAM qui est reconnue par l'ARN guide. Ces séquences PAM sont situées un peu partout dans le génome et peuvent donc se trouver à côté d'une séquence homologue à celle de l'ARN guide et le risque de cliver l'ADN à un autre site que le site ciblé, appelé hors cible ou « *off-target* », n'est donc pas à exclure. L'utilisation d'amorces reconnaissant les séquences situées au niveau du site d'insertion permet de s'assurer par PCR que la cassette insérée est bien au bon endroit, comme présenté dans le chapitre « Résultats », mais comment savoir si cette cassette n'a pas également été insérée ailleurs ? Plusieurs méthodes peuvent être utilisées et il convient de choisir la plus adaptée en fonction de l'application, mais la méthode optimale de détection de ces *off-targets* est le séquençage à haut débit. Cependant, cette méthode s'avère à la fois longue et coûteuse et si son efficacité permet de détecter des événements d'une fréquence de 0.01 à 0.1%, il convient de faire attention aux potentiels faux positifs dus à des artefacts de PCR<sup>474</sup>.

Depuis plusieurs années maintenant, le système CRISPR/Cas9 a été utilisé et les publications de nombreuses équipes ont permis d'établir des listes de sites « préférentiels » d'insertion non-spécifique, répertoriées dans des bases de données. Des outils sont également disponibles sur internet afin de prévoir les potentiels *off-targets*, en fonction du système utilisé et de la séquence de l'ARN guide choisie (par exemple <http://www.rgenome.net/cas-offfinder>). Selon les situations, plusieurs centaines de potentiels *off-targets* peuvent être identifiés et la vérification de chacun d'entre eux après correction n'est pas forcément réalisable.

Sans rentrer dans les détails des différentes techniques disponibles, je citerai deux exemples de publications rapportant l'étude, par deux méthodes distinctes, des *off-targets* dans des cellules T génétiquement modifiées par les ZFN en essai clinique comme traitement du HIV (essai clinique NCT01252641). La première étude rapporte l'étude des *off-targets* par l'utilisation d'IDLV (integrase-déficient lentivirus)<sup>475</sup>, qui permet en quelque sorte de marquer les cassures doubles brins de l'ADN induites par la Cas9, et la seconde étude par sélection *in vitro* des sites de coupure des ZFN utilisés sur une librairie contenant plus de  $10^{11}$  séquences<sup>476</sup>. Ces deux études indépendantes, réalisées par deux méthodes différentes et dans deux laboratoires différents, ont rapporté deux listes de *off-targets* presque entièrement différentes, montrant ainsi les limites de ces approches ainsi que la précaution avec laquelle les résultats de telles études doivent être analysés.

Enfin, certaines questions se posent quant à l'interprétation des résultats obtenus. En effet, le séquençage du génome, par exemple, permet d'identifier tous les sites d'intégration de la séquence exogène. Mais que faire de cette information ? Quelles sont les conséquences de ces intégrations non-spécifiques ? Les gènes endogènes sont-ils perturbés ? Si oui, les conséquences sur le fonctionnement de la cellule sont-elles importantes ? Le potentiel bénéfique tiré de la modification

génétique ciblée (comme dans le cas de la correction d'une mutation pathologique par exemple) surpasse-t-il le risque d'une possible intégration non spécifique? Dans notre cas par exemple, l'insertion, bien que hors cible, détectée au site CPNE5, dans le gène codant pour la protéine copine 5 exprimée dans les neurones et les progéniteurs neuronaux mais pas dans le foie<sup>477</sup>, n'a probablement aucun impact sur la différenciation ou les fonctions des hépatocytes obtenus. Quoiqu'il en soit, le risque de *off-target* est à prendre en compte, même si de nombreuses améliorations de ces techniques d'édition du génome ont été développées, comme les modifications de la Cas9 précédemment évoquée, ou encore des protéines anti-CRISPR/Cas9 comme AcrIIA4 qui permettrait d'inhiber l'action du complexe après l'intégration au site ciblé<sup>478</sup>.

### III. Les systèmes de différenciation hépatocytaire

#### A. Quelles cellules utiliser pour la différenciation ?

Comme nous l'avons vu en introduction de ce manuscrit, les iPSC ne sont pas les seules cellules souches utilisables pour la différenciation hépatocytaire. Plusieurs essais concluants ont déjà été réalisés sur des cellules souches mésenchymateuses de rat<sup>37</sup> ou humaines ayant montré des fonctions hépatiques *in vitro* et une capacité à s'intégrer dans le foie de souris immunodéficientes<sup>38</sup>. Une autre étude a également montré la différenciation en hépatocytes fonctionnels de cellules souches spermatogoniales humaines<sup>479</sup>. Mais j'aimerais parler dans les paragraphes qui suivent d'un autre type cellulaire que les cellules souches.

Il y a quelques années maintenant, plusieurs études ont montré qu'il était possible d'obtenir des hépatocytes différenciés à partir de fibroblastes sans passer par la lourde étape de reprogrammation en iPSC. Cette méthode s'appelle la transdifférenciation. Des premières études ont été réalisées chez la souris montrant la transdifférenciation de fibroblastes murins après transduction de HNF1, GATA4 et FOXA3 associée à l'inactivation de p19ARF. Les cellules ainsi obtenues (miHeps) présentent une morphologie hépatocytaire, expriment des marqueurs hépatiques comme l'albumine ou HNF4 $\alpha$ , ainsi que des fonctions hépatocytaires comme la sécrétion d'albumine, une activité du cytochrome P450 ou encore la capacité à stocker le glycogène<sup>480</sup>. Enfin, la transplantation de ces miHeps dans un modèle de souris Fah $^{-/-}$  (fumarylacetoacetate-hydrolase-deficient) permet la restauration des fonctions hépatiques de l'animal. Une autre étude a montré des résultats similaires en réduisant le nombre de facteurs de transcription nécessaires à 2 (HNF4 $\alpha$  et FOXA1 ou FOXA2)<sup>481</sup>. Dans ces études, les auteurs ont exclu la possibilité d'une fusion entre les cellules transplantées et les hépatocytes résidents. Plus récemment, une étude a rapporté la transdifférenciation de fibroblastes de souris en utilisant un seul facteur de croissance (FOXA1, FOXA2 ou FOXA3) ainsi qu'un cocktail de molécules chimiques appelé RFVPTD (R, RepSox; F, Forskoline; V, VPA; P, Parnate; T, TTNPB; et D, 3-déazaneplanocine A)<sup>482</sup>. Les cellules obtenues présentent des caractéristiques hépatocytaires comme l'expression d'albumine, mais aussi des fonctions hépatocytaires comme une activité du cytochrome P450 ainsi qu'une capacité à restaurer les fonctions hépatiques dans le modèle de souris Fah $^{-/-}$ . Une autre équipe a publié l'utilisation de ces miHeps dans un système de bio-impression 3D en imprimant ces cellules dans une structure de 25 x 25mm montrant une expression d'albumine, d'ASGR et de HNF4 $\alpha$  pendant 28 jours en culture, expression qui augmente encore après transplantation dans un modèle de souris<sup>483</sup>.

Chez l'homme, l'équipe ayant publié la première étude sur la transdifférenciation de fibroblastes de souris a publié en 2014 la même expérience à partir de fibroblastes humains, utilisant cette fois le cocktail *FOXA3*, *HNF1 $\alpha$*  et *HNF4 $\alpha$* <sup>484</sup>. Deux ans plus tard, la même équipe rapporte l'utilisation de ces hépatocytes différenciés à partir de fibroblastes humains dans un système de foie bio-artificiel utilisé avec succès dans un modèle d'insuffisance hépatique aiguë chez le porc<sup>485</sup>. Les auteurs rapportent une restauration des fonctions hépatiques, une amélioration des taux d'ammonium et de bilirubine sanguins, ainsi qu'une régénération hépatique entraînant une amélioration de la survie des animaux. De plus, de l'albumine humaine ainsi que de l' $\alpha$ -1-antitrypsine ont été détectées dans les animaux traités. Cette étude est à ma connaissance la première application de ces cellules dans un foie bio-artificiel.

Plusieurs arguments feraient pencher en faveur de la transdifférenciation à partir de fibroblastes la plupart du temps (tHeps). Le premier argument est que les tHeps ne présentent pas de risque de former des tératomes après transplantation *in vivo*, puisqu'elles ne sont pas passées par le stade pluripotente. De plus, ces cellules n'ayant pas subi les lourdes modifications et le clonage nécessaires à la reprogrammation, elles sont potentiellement moins sujettes aux problèmes d'intégrité génomique rapportés dans les iPSC. Enfin, les fibroblastes sont des cellules facilement disponibles et facilement cultivables *in vitro*. Mais l'utilisation d'iPSC présente également de nombreux avantages. Si plusieurs études ont montré que la reprogrammation en iPSC permettait d'effacer, en tout cas partiellement, la mémoire épigénétique des fibroblastes de départ, la transdifférenciation, en revanche, ne permet pas cette étape et le maintien de cette mémoire épigénétique sur laquelle nous reviendrons plus en détails dans la suite de ce manuscrit, est un paramètre à prendre en compte lors de l'utilisation des cellules différenciées. De plus, la reprogrammation des iPSC est clonale, c'est-à-dire qu'une seule cellule de départ va être reprogrammée en iPSC et, par la suite, se diviser à l'infini. La population d'hépatocytes obtenus après différenciation aura donc le même patrimoine génétique. Les tHeps sont obtenus à partir de la différenciation de fibroblastes uniques, en gros un fibroblaste = un hépatocyte, menant à l'obtention d'une population hétérogène d'hépatocytes, les fibroblastes étant sujets à un mosaïcisme important<sup>227</sup>. Cette propriété clonale des iPSC permet d'étudier et de sélectionner le « meilleur » clone utilisable pour la différenciation, aussi bien sur le plan génétique qu'épigénétique, ce qui n'est pas possible dans une approche de transdifférenciation. De plus, en cas de nécessité d'un grand nombre d'hépatocytes, les iPSC peuvent être cultivées en grande quantité dans des bioréacteurs<sup>486</sup> et leur capacité de prolifération quasi infinie permet d'obtenir rapidement un très grand nombre de cellules, ce qui n'est pas possible pour les fibroblastes qui sont sujets au phénomène de sénescence<sup>487</sup>.

Les deux types cellulaires présentent donc chacun leurs avantages et le choix dépend, à mon avis, en très grande partie de l'application qui en découle. La transdifférenciation de fibroblastes utilisés dans le foie bio-artificiel présenté précédemment par exemple semble très intéressante et permettrait d'obtenir des hépatocytes sans passer par la lourde étape de reprogrammation. Il reste néanmoins à s'assurer de la bonne fonctionnalité des cellules différenciées, comme c'est le cas d'ailleurs pour les hépatocytes obtenus à partir d'iPSC.

## B. Les limites des protocoles de différenciation : cas de l'étude du FIX

La différenciation *in vitro* vise à mimer les étapes du développement embryonnaire, mais alors que ce développement se réalise en quelques mois chez l'homme, les protocoles de différenciation *in*

*in vitro* permettent d'obtenir des hépatocytes en 20 à 30 jours. La différenciation est-elle donc suffisamment poussée et les cellules obtenues sont-elles suffisamment fonctionnelles ? Les protocoles de différenciation hépatocytaires permettent l'obtention d'une population relativement homogène d'hépatocytes présentant des caractéristiques spécifiques comme la production d'albumine ou de l'activité cytochrome P450. En revanche, la présence dans bon nombre de ces expériences d'une population résiduelle de cellules exprimant l'AFP, l'équivalent fœtal de l'albumine, semble montrer que cette différenciation n'est pas optimale ou peut-être pas achevée. C'est ce que nous avons également observé dans nos hépatocytes différenciés à partir d'HB-iPSC.

La validation de la correction du phénotype dans des HB-iPSC différenciées en hépatocytes nécessite l'obtention de cellules capables de produire du FIX actif. En effet, l'étude de sa production, mais surtout de sa fonctionnalité, dans un modèle d'hépatocytes différenciés à partir d'iPSC nécessite d'obtenir des hépatocytes matures, permettant non seulement sa production, mais aussi les modifications post-traductionnelles nécessaires à son activité. Dans l'article publié en septembre 2017 décrivant la correction des HB-iPSC à l'aide de la technologie des CRISPR/Cas9<sup>462</sup>, les auteurs rapportent la différenciation des hiPSC en hépatocytes, permettant, la synthèse de FIX après 21 jours. Je dois avouer que cet article me laisse perplexe et soulève de nombreuses questions. En effet, j'ai pu observer que la production de FIX par des cellules différenciées n'était déjà pas évidente à obtenir, mais que sa maturation l'était encore moins. Dans cet article, les auteurs ne précisent pas la taille de la protéine obtenue, ni si celle-ci est active. Cependant, quelques éléments me laissent penser que la protéine produite dans leur système n'est pas mature. Tout d'abord, leur protocole de différenciation ne diffère pas énormément de celui que j'ai utilisé pour différencier mes HB-iPSC. En revanche, ils n'ont pas utilisé de dexaméthasone, permettant de stimuler l'activité de la carboxylase vitamine-K dépendante essentielle à la maturation du FIX<sup>488</sup>, ni même de vitamine K et, comme nous l'avons vu précédemment, l'activité du FIX est dépendante de ces modifications post-traductionnelles.

Comme j'ai pu le constater, l'expression de marqueurs spécifiques des hépatocytes, comme l'albumine, ainsi que l'expression de l'ARNm du *F9* et le traitement des hépatocytes par la vitamine K ne suffisent pas à induire l'activité du FIX *in vitro*. Ceci peut en partie s'expliquer par une différenciation insuffisante des hépatocytes, observée également par plusieurs équipes rapportant des caractéristiques plus fœtales qu'adultes des cellules obtenues<sup>311</sup>, l'expression du FIX étant beaucoup plus faible dans le foie fœtal que dans le foie adulte<sup>489</sup>.

### C. L'apport des systèmes de différenciation en 3D

De nombreux articles décrivant la culture d'hépatocytes primaires rapportent la perte rapide des fonctions hépatiques *in vitro* due en partie au fait que ces fonctions nécessitent une organisation spatiale définie que ne permet pas une culture monocouche<sup>14</sup>. Comme nous l'avons vu en introduction, de nombreuses approches ont été développées afin d'améliorer les interactions cellules-cellules ou cellules-matrices nécessaires au maintien des fonctions hépatiques. Le développement de systèmes de cultures en agrégats, qui s'organisent ensuite en sphéroïdes, permet des interactions et une organisation spatiale impossibles en 2D. Il a été montré dans plusieurs études, et j'ai pu le confirmer dans mes expériences, que la différenciation en 3D permettait une nette amélioration de l'efficacité de différenciation en hépatocytes<sup>445,490</sup>. Ce système peut également permettre la co-culture de plusieurs types cellulaires, afin d'étudier leur auto-organisation par

exemple, comme dans l'étude de Morell et *al.*, présentée à l'ISSCR 2017, dans laquelle des hépatocytes différenciés à partir d'iPSC, des cholangiocytes primaires, des cellules étoilées immortalisées LX2 et des cellules de Kupffer différenciées à partir d'iPSC ont été co-cultivés en 3D et se sont auto-organisés au sein de l'organoïde. Mais ce système de culture en 3D est également applicable à d'autres types cellulaires comme les cellules cancéreuses par exemple, utilisées afin de « modéliser » les tumeurs *in vitro* pour mieux comprendre leur fonctionnement ou tester des candidats-médicaments<sup>491</sup>, ou encore des cellules neuronales permettant de modéliser des maladies comme l'Alzheimer<sup>492</sup>, ou même des cellules dermiques de la papille, responsables de la pousse des cheveux<sup>493</sup>.

Le potentiel de ces techniques de culture 3D est enthousiasmant mais l'analyse de sphéroïdes requiert des équipements et des mises au point de nos systèmes d'analyses en 2D. Nous avons aujourd'hui à notre disposition de nombreux outils moléculaires, et des microscopes de plus en plus performants, mais lorsque j'ai commencé à analyser les agrégats que j'avais obtenus en culture, je me suis rendue compte que les méthodes d'extraction d'ARN ou de protéines que j'utilisais pour l'étude de mes cellules en 2D n'étaient pas suffisamment efficaces pour les cultures 3D. Les analyses en immunofluorescence ont également dû être totalement repensées. Le marquage à l'aide d'anticorps d'un agrégat, même de 100µm de diamètre, demande une perméabilisation plus poussée, des incubations beaucoup plus longues, et ne permet pas toujours, en fonction du microscope à disposition, d'obtenir des images informatives (discrimination des noyaux, des cytoplasmes et des membranes par exemple). De plus, le traitement de ces images devient très vite complexe. Il est alors possible d'opter pour des coupes d'agrégats, comme j'ai pu le faire après congélation en OCT, qui permettent d'améliorer la qualité des images, mais qui ne permettent pas de visualiser l'ensemble de l'organisation spatiale des cellules. Nous venons d'acquérir sur le site de Paul Brousse un microscope à feuille de lumière, qui permet de visualiser des structures 3D et d'obtenir des images d'une qualité remarquable<sup>494</sup>. Evidemment, l'utilisation d'un tel matériel demande également quelques mises au point quant à la préparation des échantillons, mais j'espère pouvoir avoir la chance de le tester dans les mois qui viennent.

En résumé, je trouve ces systèmes de culture en 3D passionnants et les potentielles applications qui s'offrent à nous dans ce domaine sont nombreuses. Cependant, la culture en 2D reste, selon moi, capitale afin de comprendre les nombreux mécanismes biologiques encore peu ou mal connus, avant de passer dans un modèle plus complexe en 3D.

#### IV. L'utilisation des cellules dérivées des iPSC en thérapeutique

##### A. Intégrité génomique des iPSC et des cellules différenciées

Comme nous l'avons évoqué auparavant, le potentiel des iPSC est énorme et leur différenciation offre la possibilité d'obtenir de nombreux types cellulaires parfois difficiles à isoler à partir de tissus, permettant de modéliser certaines maladies *in vitro*. Cependant, la reprogrammation n'est pas un processus anodin pour la cellule et celle-ci entraîne, comme nous l'avons vu dans l'introduction, de nombreux remaniements cellulaires et géniques importants qu'il est nécessaire de prendre en compte avant leur utilisation. En effet, la stabilité génomique des iPSC ainsi que des cellules obtenues après leur différenciation est, selon moi, une des principales raisons qui freinent leur utilisation en clinique.

De nombreuses équipes rapportent l'étude de l'intégrité génomique des iPSC par l'analyse de leur karyotype<sup>221</sup>, des CNV<sup>224,226</sup>, ou encore par l'étude de mutations ponctuelles<sup>228</sup>. La question qui se pose alors est : est-ce que ces mutations étaient initialement présentes dans la population de départ, proviennent du processus de reprogrammation ou bien de la culture *in vitro* de ces cellules ?

La réponse n'est à ce jour pas clairement établie. Comme nous l'avons vu en introduction, la population de départ utilisée pour la reprogrammation peut influencer sur l'intégrité génomique des iPSC, du fait par exemple du mosaïcisme que l'on peut trouver dans les fibroblastes<sup>495</sup>. Il est dans ce cas difficile de déterminer si les anomalies génétiques détectées dans les iPSC sont dues au processus de reprogrammation ou se trouvaient déjà dans la cellule de départ. Cependant, l'analyse de l'intégrité épigénétique réalisée dans 17 lignées iPSC dérivées à partir de 6 types cellulaires différents a montré que les anomalies épigénétiques étaient une caractéristique des iPSC indépendantes du type cellulaire utilisé pour la reprogrammation<sup>496</sup>.

Les études menées sur l'impact de la méthode de reprogrammation sur l'intégrité génomique des iPSC ne sont pas unanimes. Plusieurs études n'ont montré aucun lien entre la méthode de reprogrammation utilisée (intégrative ou non-intégrative) et le nombre de mutations ponctuelles détectées dans les iPSC<sup>228</sup>, ou le nombre de CNV<sup>226</sup>. Mais toutes ces analyses ont été réalisées à partir d'hiPSC obtenues dans des laboratoires différents et ce paramètre doit être pris en compte dans l'analyse. Nous avons, au sein du laboratoire, réalisé une étude sur l'intégrité génomique des iPSC obtenues, à partir des mêmes fibroblastes et par les mêmes expérimentateurs, à l'aide d'une méthode de reprogrammation intégrative et non-intégrative (vecteurs rétroviraux et ARNm)<sup>239</sup>. Nous avons constaté, au cours de cette analyse, un plus grand nombre de SNP dans les iPSC obtenues à l'aide des vecteurs rétroviraux par rapport aux clones obtenus par la méthode des ARNm, mais nous n'avons en revanche observé aucun lien entre méthode de reprogrammation et nombre de CNV.

Enfin, des études réalisées sur des hESC et des hiPSC ont montré que la culture à long terme de ces cellules était associée à une diminution du nombre de CNV. Une étude a en effet montré que dans les hiPSC, la majorité des CNV acquis après reprogrammation, initialement présents dans la population de départ ou acquis durant le processus de reprogrammation, disparaissait après 30 passages en culture<sup>226</sup>. De plus, des études ont montré un impact de la méthode de passage des iPSC (*i.e.* mécanique ou enzymatique) sur l'intégrité génomique des cellules, montrant un plus grand nombre d'anomalies génétiques dans les cellules passées de façon enzymatique<sup>497,498</sup>.

En raison de leur potentielle utilisation en clinique, de nombreuses études sont réalisées sur l'intégrité génomique des iPSC. En revanche, très peu d'études rapportent de telles analyses sur les cellules obtenues après leur différenciation, celles-ci étant potentiellement les plus à même d'être utilisées en clinique. Dans notre étude, nous avons analysé les CNV avant et après différenciation des iPSC en hépatoblastes et nos résultats ont montré que la différenciation n'avait induit aucun CNV supplémentaire. De plus, le pourcentage de SNP entre les iPSC et les cellules différenciées n'était pas différent de celui mesuré entre des iPSC à deux passages successifs, quelle que soit la méthode de reprogrammation.

Il me semble important de préciser que toutes les études rapportées dans la littérature sont réalisées avec des techniques différentes (puce Affymetrix, CGH-array, séquençage haut débit,..) et que

chaque équipe applique ses propres critères pour l'analyse des résultats bruts (par exemple la taille minimale d'un CNV), ce qui peut en partie expliquer des conclusions parfois divergentes. Nous avons d'ailleurs pu l'observer dans notre propre analyse, dans laquelle le nombre de CNV déterminé par puce Affymetrix ou par puce CGH-array différait pour un même clone. Il me semble donc important de définir des techniques de référence, ainsi que des critères standardisés à utiliser afin d'uniformiser les résultats obtenus dans les différents laboratoires.

Quoi qu'il en soit, une dernière question se pose : quel est l'impact de ces anomalies génétiques sur les cellules ? Quand on parle de mutation, on a souvent tendance à penser cancer ou tumeur. Cependant, de nombreuses mutations n'ont pas ou peu d'impact sur le fonctionnement de nos cellules. Une étude a par exemple montré qu'environ 12 % du génome humain contenait des CNV, et que ces derniers contribuaient entre 0.12 et 7.3 % à la variabilité génomique qui nous caractérise<sup>499</sup>. De plus, plus de 300 000 CNV ont été répertoriés comme non-associés à un phénotype clinique et ont été regroupés dans une base de données<sup>500</sup>. Certains outils informatiques existent afin de prévoir les possibles conséquences d'une anomalie génomique<sup>501</sup>, mais cela reste informatique, et chaque mutation doit être analysée et prise en compte en fonction de l'utilisation des cellules. Il existe cependant des mutations liées à des risques de tumorigénicité. Une analyse réalisée sur 17 lignées hESC a montré que 44% des gènes « perturbés » par les CNV détectés étaient associés au cancer<sup>502</sup>.

Ces nombreuses études montrent l'importance de l'étude de l'intégrité génomique des iPSC utilisées en laboratoire, et potentiellement en clinique, mais aussi l'importance de réaliser ces mêmes études sur les cellules différenciées à partir d'iPSC ou d'ESC, surtout dans le cadre d'une application thérapeutique, en utilisant des méthodes et des critères standardisés.

#### B. Le potentiel manque de maturité des cellules obtenues après différenciation peut-il être un obstacle à leur application en thérapeutique ?

Comme nous l'avons observé dans le cas de la différenciation d'hépatocytes à partir des HB-iPSC, le système de différenciation en 2D ne permet pas une différenciation complète des hépatocytes pour permettre les modifications post-traductionnelles nécessaires à l'activité du FIX, nécessitant le développement d'un protocole de différenciation plus poussé. La question qui se pose alors est donc la suivante : est-ce que ce potentiel manque de différenciation peut être un obstacle à l'utilisation de ces cellules en thérapeutique ?

La réponse à cette question dépend, je pense, comme souvent en grande partie de l'application qu'on envisage pour les cellules. Par exemple, pour une utilisation de cellules présentant des fonctions hépatocytaires mais où l'homogénéité des cellules ou l'intégrité génomique de ces dernières importent moins (utilisation *in vitro*), je dirais que l'utilisation de cellules différenciées à partir d'iPSC peut représenter un énorme avantage. C'est par exemple le cas de l'utilisation de ces cellules dans des foies bio-artificiels, qui me paraît être une application très prometteuse des hépatocytes différenciés à partir d'iPSC. Ces cellules ne sont pas transplantées, évitant ainsi le risque de tumorigénicité associé à la présence résiduelle d'iPSC dans la population d'hépatocytes, et seule leur fonctionnalité importe ici. Les cellules présentées aujourd'hui dans les publications rapportant les récentes améliorations de protocoles comme le développement de nouvelles matrices, ou l'utilisation de petites molécules chimiques comme nous l'avons vu auparavant, semblent capables de remplir ces fonctions. Bien évidemment, même si ces cellules ne sont pas transplantées chez le

patient, il est, selon moi, nécessaire de définir des critères d'évaluation précis de ces cellules avant une application clinique, en particulier au niveau de leurs fonctionnalités.

En revanche, pour des applications de transplantation, je pense que nous avons encore des améliorations à apporter à nos protocoles actuels, en grande partie sur l'homogénéité des cellules obtenues et sur l'étude pour l'instant réduite de leur intégrité génomique. Leur degré de différenciation n'est pas le plus grand obstacle à leur utilisation en thérapie. En effet, il a été montré que la transplantation d'hépatoblastes chez la souris, ou d'hépatocytes présentant des marqueurs fœtaux, permettait une prise de greffe de ces cellules ainsi que la poursuite de leur différenciation *in vivo*, dans le foie de l'animal<sup>503</sup>. La question du degré de différenciation des cellules transplantées peut alors se poser. Vaut-il mieux transplanter des cellules au stade progéniteurs hépatiques (hépatoblastes) qui possèdent une forte capacité de prolifération pouvant être un grand avantage dans la prise de greffe et le repeuplement du foie, et qui pourraient par la suite poursuivre leur différenciation *in vivo*; ou bien des cellules différenciées au stade hépatocyte, qui auront des fonctions hépatiques plus avancées, mais auront une capacité de prolifération peut-être plus réduite et seront peut-être plus fragiles que les hépatoblastes au cours du processus de transplantation car mécaniquement moins résistants et plus gros ?

## V. Intérêts de la thérapie cellulaire appliquée à l'hémophilie B

Comme nous l'avons vu précédemment, le traitement prophylactique suivi par les patients HB permet de réduire la fréquence des épisodes hémorragiques mais ce traitement n'est pas curatif et son coût ainsi que le renouvellement régulier des injections (2 à 3 fois par semaine pour les cas les plus sévères) sont des paramètres qui nécessitent de développer d'autres approches thérapeutiques. L'amélioration des FIXr, comme par exemple le FIXr pegylé évoqué en introduction, permettrait d'espacer les injections, mais cela n'empêchera pas le traitement à vie des patients, et les conséquences d'injections répétées de protéines pegylées dans l'organisme est aujourd'hui inconnue. Une autre approche développée est de diminuer le taux d'antithrombine naturellement présente chez les patients, en utilisant des ARN antisens<sup>504</sup>, mais cette technique, également applicable aux patients atteints d'hémophilie A, présente des risques de thrombogènes importants et pose également le problème de la durée du traitement à vie.

L'hémophilie B est un bon candidat pour la thérapie génique et plusieurs essais ont déjà été réalisés, utilisant maintenant le plus souvent des vecteurs AAV (Adenovirus associated virus). L'adenovirus est un virus non pathogène pour l'homme et, contrairement au virus sauvage qui a tendance à s'intégrer dans le génome, l'ADN proviral des vecteurs AAV reste épisomal. L'utilisation des vecteurs AAV entraîne donc une extrêmement faible fréquence d'insertion du vecteur dans le génome et donc un risque minime de mutagenèse insertionnelle, même si des études menées chez le singe<sup>505</sup> ou la souris<sup>506</sup> ont montré que ce risque d'intégration n'était pas nul. Plusieurs types d'AAV ont été utilisés, mais les récents essais utilisant l'AAV8 semblent très prometteurs car celui-ci possède un fort tropisme pour les hépatocytes et permet donc son injection dans la circulation sanguine, à la différence de l'AAV2 précédemment utilisé qui devait être injecté directement dans l'artère hépatique<sup>405,406</sup>. Nous avons aujourd'hui un recul de 6 ans sur l'essai de thérapie génique de l'équipe d'Amit Nathwani et les résultats sont très encourageants<sup>507</sup>. Quatre des 6 premiers patients inclus dans l'étude ont arrêté leur traitement mais la toxicité hépatique observée chez les patients ayant reçu la plus forte dose de vecteur 7 à 10 semaines après injection n'avait pas été anticipée

dans les modèles animaux, pas même chez le singe<sup>508</sup>, montrant bien la limitation de certains modèles et le risque d'extrapolation à l'homme. Cette toxicité a été prise en compte pour l'élaboration d'un autre essai clinique en cours, dans lequel les vecteurs ont été purifiés afin d'éliminer les capsides vides, permettant ainsi de diminuer les réactions immunitaires et de permettre une expression maximale du FIX. En effet, comme dans toutes les productions de vecteurs, une partie des capsides ne contient pas de génome codant le FIX mais est reconnue par le système immunitaire. La purification des vecteurs est donc une étape capitale pour diminuer la toxicité due, non seulement à la présence d'une trop forte quantité de capsides vides, mais aussi à d'éventuelles contaminations par de l'ADN ou des protéines des cellules utilisées pour leur production.

Si les résultats obtenus jusqu'alors sont très encourageants, l'utilisation de vecteurs non-intégratifs entraînera un jour ou l'autre la diminution de l'expression du FIX, potentiellement sous le seuil thérapeutique. Des approches de modification ciblée du génome *in vivo*, validées chez la souris<sup>419</sup>, comme celle de la société Sangamo Therapeutics sont testées actuellement chez l'homme, mais leur utilisation en clinique nécessitera certainement plusieurs années de mise au point, les risques de clivages non ciblés évoqués précédemment présentant évidemment un risque bien plus important chez un patient que dans des cellules en culture. De plus, l'utilisation de ZFN *in vivo* requiert l'injection de deux vecteurs AAV (1 pour les ZFN et 1 pour l'ADNc du FIX), nécessitant donc la production de deux vecteurs en parallèle et donc la mise en place de deux processus de purification et de production. Là encore, des améliorations sont en cours de développement comme l'utilisation de nanoparticules d'or, utilisées chez la souris pour corriger, à l'aide des CRISPR/Cas9, la mutation responsable de la dystrophie musculaire de Duchenne<sup>509</sup>.

La thérapie génique semble très prometteuse pour les patients HB et on peut se demander si le développement d'une stratégie de thérapie cellulaire et génique a véritablement un intérêt. Il faut savoir que la thérapie génique ne pourra pas être applicable à tous les patients, en partie à cause du taux d'anticorps anti-AAV naturellement présents dans l'organisme. De plus, il faut noter que l'ensemble des patients ayant reçu l'injection de vecteurs a développé une réaction immunitaire contre la capside, empêchant une seconde injection si celle-ci est nécessaire. Il me semble donc important de développer des alternatives afin de ne pas limiter le traitement à une seule stratégie. De plus, les essais cliniques se déroulant aujourd'hui sont basés sur des résultats pré-cliniques obtenus il y a plusieurs années et il est donc important de poursuivre ces études *in vitro*, mais aussi chez l'animal, afin d'approfondir nos connaissances et de permettre le développement de nouveaux outils de thérapie. Les résultats obtenus avec les iPSC présentent l'avantage d'être transposables à plusieurs maladies, comme nous l'avons nous-mêmes montré en utilisant la stratégie de correction au site *AAVS1* décrit dans ce manuscrit dans un modèle d'iPSC reprogrammées à partir de cellules d'un patient atteint d'hypercholestérolémie familiale (Caron et *al.* – soumis pour publication).

Le premier essai de thérapie cellulaire autologue à partir des iPSC a été réalisé en 2014 pour traiter une patiente de 77 ans atteinte de DMLA<sup>510</sup>. Cependant, ces approches de thérapie cellulaire autologue ne pourront peut-être pas être applicables avant que les conditions de reprogrammation soient plus « sécurisées », rapides et surtout moins coûteuses. La création en 2010 d'une bio-banque d'iPSC de grade clinique (CiRA, située sur le campus de l'université de Kyoto au Japon) regroupant des cellules utilisables chez des patients HLA-compatibles a cependant permis une grande avancée dans l'utilisation des iPSC en thérapeutique. Son directeur, Shinya Yamanaka, annonçait d'ailleurs au

congrès de l'ISSCR de cette année avoir déjà développé 10 lignées iPSC homozygotes HLA de grade clinique. Treize de ces lignées ont également été obtenues en Corée du Sud<sup>511</sup>. L'utilisation de ces cellules HLA-compatibles permettrait après sélection des donneurs, d'obtenir des cellules compatibles avec une grande partie de la population, selon l'origine ethnique et le patrimoine génétique. Ainsi, la dérivation de 2 lignées d'iPSC reprogrammées à partir de cellules d'individus homozygotes HLA pourrait permettre de couvrir environ 20 % de la population japonaise et 50 lignées 90.7 % de la population<sup>512,513</sup>. Au Royaume-Uni, 150 lignées HLA-compatibles permettraient de couvrir 93 % de la population<sup>514</sup>. Utilisant un modèle de probabilité, une étude a montré que la dérivation de 100 lignées pour chacune de ces populations permettrait de couvrir les besoins en cellules compatibles de 78 % des habitants de l'Europe du Nord, 63 % des asiatiques, 42 % des hispaniques et 45 % des afro-américains<sup>515</sup>.

## VI. Intérêts du modèle primate non humain

Les modèles de petits animaux comme la souris ou le rat sont nécessaires afin de comprendre certains mécanismes impossibles à extrapoler des modèles *in vitro*, comme le comportement des cellules lors de la transplantation, leur capacité à greffer dans le foie ainsi que leur différenciation *in vivo*. Mais même si le rat permet des expériences de chirurgie plus poussées que chez la souris, l'utilisation de gros animaux comme le primate non humain reste indispensable pour tester et optimiser les pratiques chirurgicales avant une application chez l'homme. De plus, la taille de l'organe, ainsi que sa vasculature sont très similaires à ceux de l'homme. Cette similitude de vascularisation pourrait d'ailleurs être particulièrement intéressante dans des expériences de greffe d'organoïdes, comme celle réalisée par l'équipe de Takebe chez la souris<sup>516</sup>. La durée de vie de ces animaux permet également un suivi à plus long terme, ainsi que la potentielle répétition des traitements.

L'adaptation du protocole de différenciation en hépatocytes développé au laboratoire sur des iPSC de singe a été un peu plus compliquée que prévu. Cependant, les cellules obtenues après différenciation présentent des caractéristiques hépatocytaires et expriment certains marqueurs caractéristiques comme nous l'avons vu précédemment (Résultats – Chapitre 3). L'un des plus gros problèmes auxquels j'ai été confrontée dans ce modèle, c'est la reproductibilité des expériences. J'ai passé énormément de temps à tenter d'améliorer mon protocole de différenciation car si certaines expériences me permettaient d'obtenir des populations homogènes d'hépatocytes, certaines autres ne me permettaient même pas d'obtenir des cellules de l'endoderme, toutes les cellules mourant avant le 6<sup>e</sup> jour de différenciation. Il m'a fallu plusieurs mois pour me rendre compte que le protocole de différenciation n'était pas directement responsable de ces résultats peu reproductibles, mais que ces derniers étaient en grande partie dus aux cellules elles-mêmes. En effet, comme je le disais précédemment, les iPSC de singe sont très sensibles à leur environnement en culture et très rapidement sujettes à la différenciation spontanée. De plus, leur comportement en différenciation n'est pas le même en fonction du nombre de passages après décongélation des cellules. Il m'a donc fallu cultiver les cellules à deux passages différents en parallèle : l'un pour les expériences de différenciation à court terme et l'autre pour anticiper les expériences à venir. Les raisons de ces différents comportements en culture n'ont pas été déterminées. J'ai cependant mis au point un protocole relativement efficace, permettant également la transduction de ces cellules par un vecteur lentiviral codant la GFP. Les étapes de congélation/décongélation ont également été mises au point,

et je poursuis actuellement la congélation des cellules en vue de la transplantation chez la souris, étape indispensable avant la transplantation autologue chez le singe.

Ce modèle reste cependant problématique en termes d'animalerie capable d'héberger de tels animaux, de coût des expériences mais aussi d'équipements nécessaires à la chirurgie. En effet, la transplantation d'hépatocytes chez le singe nécessite une chirurgie quasi équivalente à celle nécessaire chez l'homme. Une telle opération requiert donc, non seulement des chirurgiens, mais aussi des radiologues, afin de réaliser l'embolisation partielle, laisser un cathéter dans la veine et positionner une chambre implantable en sous-cutané pour permettre les injections de BrdU nécessaires à l'étude de la régénération hépatique. Il faut également pouvoir suivre les constantes biologiques de l'animal après la chirurgie, tout ceci dans un bloc opératoire de chirurgie animale.

## VII. Questions éthiques

J'aimerais, avant de conclure ce manuscrit, prendre quelques instants pour parler d'éthique. Je pense qu'on ne peut pas parler d'ESC, d'iPSC, de correction génétique, d'organoïdes et de leurs potentielles applications thérapeutiques sans parler des aspects éthiques que ces passionnantes avancées entraînent. S'il est vrai que l'utilisation d'hiPSC « règle » le problème éthique de l'utilisation d'embryons humains en recherche posé par l'utilisation d'hESC, elles sont néanmoins obtenues à partir de patients, le plus souvent vivants, dont le génome sera utilisé, amplifié, congelé, potentiellement distribué ou même vendu à des fins de recherche. Ces cellules seront génétiquement caractérisées, étudiées dans le moindre nucléotide, et dans le cas de la découverte d'anomalies génétiques, que doit-on faire de l'information ? Il y a quelques années, le débat avait été lancé à propos des nombreuses entreprises qui proposaient, via internet le plus souvent, des tests génétiques afin de rechercher des facteurs de risques. Les résultats étant envoyés aux clients sans véritables analyses, ni suivi, cette pratique avait soulevé bien plus de questions et de panique que de réponses.

Le développement des outils d'édition du génome comme les CRISPR/cas9 ouvre des possibilités extraordinaires dans des domaines comme la thérapie cellulaire, mais aussi génique. Cependant, la modification du génome d'une cellule est loin d'être anodine. Déjà controversée et discutée dans plusieurs articles<sup>517</sup>, la publication en février 2017 par une équipe chinoise d'une étude rapportant l'utilisation de la technologie des CRISPR dans un embryon humain créé dans un but de recherche avait soulevé de nombreux débats<sup>518</sup>, relancé cet été par un second article<sup>519</sup>. La correction génétique de mutations dans des embryons humains éviterait ainsi le développement de certaines maladies génétiques, mais aussi leur transmission à leur descendance. Cependant, si cette approche est appliquée dans un but thérapeutique, le risque de dérives eugénistes ne doit pas être négligé. C'est pour cette raison que la sénatrice écologiste belge Petra de Sutter a déposé un rapport examiné jeudi 12 octobre par l'Assemblée parlementaire du Conseil de l'Europe (APCE), insistant sur la nécessité d'une réglementation internationale pour éviter les dérives eugénistes liées à la modification du génome humain. En effet, le rapport évoque notamment « *le risque d'utilisation inappropriée ou abusive de la technologie dans le but de produire un individu ou un groupe d'individus dotés de caractéristiques particulières ou de certaines qualités requises* ». Autrement dit, de la mise en œuvre d'une forme d'eugénisme. « *Il serait même possible de "militariser" l'utilisation des nouvelles technologies génétiques sur l'être humain, par exemple pour réduire le besoin de sommeil des soldats* ». La convention d'Ovideo, ratifiée par 29 pays en 1997– dont la France –,

interdit le transfert d'un embryon génétiquement modifié dans l'utérus d'une femme en vue d'une grossesse, mais malheureusement « *très peu de pays légifèrent sur des nouvelles technologies, essentiellement parce que la technologie progresse plus vite que les autorités de régulation.* ». L'APCE a donc demandé au Comité de Bioéthique du Conseil de l'Europe d'évaluer les enjeux éthiques et juridiques de ces techniques de modification du génome, particulièrement dans le cas d'application chez l'embryon et de développer un cadre réglementaire et législatif commun.

Enfin, j'ai assisté en juin de cette année au congrès annuel de l'ISSCR, et en particulier à une session présentée par un membre du conseil d'éthique de l'ISSCR, portant sur les implications éthiques de l'utilisation des organoïdes. Au cours de cette session, les nombreux avantages des organoïdes ont été évoqués, comme la possibilité de réduire la recherche animale, ou l'augmentation de la maturation et de la complexité des systèmes de culture actuels. L'orateur a par la suite posé quelques questions que je ne m'étais pas vraiment posées jusqu'alors, comme « quelle est la nature de l'organoïde ? » puisque celui-ci est une reproduction d'une partie d'un être humain *in vitro*, et « Que faire si ces systèmes de culture améliorés permettent d'identifier des biomarqueurs de maladies pour lesquelles il n'y a actuellement pas de traitement ? ». Je n'ai pris conscience de l'intérêt de ces questions que plus tard, pendant le congrès. Lorsque j'ai assisté à la présentation de Magdalena Zernicka-Goetz de l'université de Cambridge, par exemple, qui a présenté les travaux de son équipe portant sur la construction d'embryons de souris et d'humains *in vitro*, en réalisant la co-culture en 3D de cellules souches embryonnaires et extra-embryonnaires<sup>520</sup>. La construction *in vitro* d'un embryon, même s'il ne mène pas au développement d'un être vivant, est selon moi un sujet délicat et potentiellement dangereux. Les risques de dérive sont importants et ces applications doivent être strictement encadrées, ce qui n'est, pour l'instant, pas le cas du fait de la nouveauté de cette approche.

## CONCLUSION

---

Ce travail de thèse a, tout d'abord, permis d'étudier l'une des plus célèbres mutations responsables de l'hémophilie B, *F9* c.278-3A>G, plus communément appelée « mutation royale », à l'aide d'iPSC obtenues à partir des cellules d'un patient porteur de cette mutation. Ces HB-iPSC ont, par la suite, été différenciées en hépatocytes et l'analyse de l'ARNm du *F9* dans ces cellules par séquençage haut débit a permis de confirmer l'épissage anormal prédit par un modèle bio-informatique de 2009 défini à partir des prélèvements réalisés sur les ossements du Tsarévitch Alexis, ainsi que par un modèle développé dans les cellules COS7. La détection d'un très faible niveau d'ARNm du *F9* muté dans les hépatocytes différenciés à partir des HB-iPSC par rapport aux cellules obtenues à partir des iPSC de sa mère a permis d'émettre l'hypothèse de la dégradation de ces ARNm par NMD (Nonsense Mediated Decay).

La modélisation de l'hémophilie B au sein du laboratoire nous a permis d'obtenir un clone HB-iPSC à partir de cellules d'un patient atteint d'une forme sévère de la maladie. J'ai, par la suite, inséré une cassette thérapeutique contenant un mini-gène du *F9* portant la mutation Padua, décrite comme augmentant d'un facteur 8 l'activité spécifique du FIX, par la technologie des CRISPR/Cas9, en ciblant le site génomique sûr *AAVS1*. Les HB-iPSC et corr-HB-iPSC ont ensuite été différenciées en hépatocytes, exprimant après 25 jours de différenciation des marqueurs hépatocytaires spécifiques comme HNF4 $\alpha$  ou encore l'albumine, observables au niveau RT-PCR et par immunofluorescence. L'apparition de l'ARNm du *F9* dès le 11e jour de différenciation (hépatoblastes) dans les corr-HB-iPSC a permis de confirmer l'expression de la cassette de correction à partir du promoteur *APOA2*. L'étude de l'expression de la protéine FIX produite après 30 jours de différenciation a cependant montré un très probable manque de maturation des cellules différenciées permettant certes la production de FIX, mais pas sa maturation et donc son activité. J'ai donc par la suite développé un protocole de différenciation en sphéroïdes afin d'améliorer l'efficacité de différenciation. Les résultats obtenus en RT-PCR quantitative et immunofluorescence ont confirmé que la culture en 3D améliore l'efficacité de différenciation. Les résultats obtenus sur l'étude du FIX en western blot semblent également confirmer cette amélioration, la taille de la protéine obtenue en 3D étant bien plus proche de celle obtenue dans le plasma humain par rapport aux cellules obtenues en 2D, laissant penser que ce système permet une maturation plus poussée de la protéine. Les tests d'activité seront réalisés dans les semaines qui viennent par l'équipe d'Olivier Christophe, et j'espère ainsi pouvoir valider la correction des cellules *in vitro* dans le surnageant de culture en attendant de pouvoir valider notre stratégie dans un modèle de souris *F9KO*.

Enfin, nous avons développé un protocole de différenciation hépatocytaire d'iPSC de singe qui permet d'obtenir des cellules exprimant des marqueurs spécifiques comme HNF4 $\alpha$  ou l'albumine. La transplantation chez le singe nécessitant un grand nombre de cellules différenciées, j'ai mis au point la différenciation de ces cellules à grande échelle, dans des systèmes de culture clos « cell factory stacks ». J'ai, par la suite, mis au point les conditions de congélation/décongélation permettant une bonne viabilité cellulaire des cellules adhérentes après 24h. La capacité de ces cellules à greffer et à proliférer *in vivo* chez le petit animal sera testée le plus rapidement possible, avant de réaliser la transplantation autologue chez le singe.

## RÉFÉRENCES

---

1. Kiley, J. E. *et al.* (1958). 'Ammonia Intoxication Treated by Hemodialysis'. *N. Engl. J. Med.* 259: 1156–1161.
2. Trey, C. *et al.* (1966). 'Treatment of Hepatic Coma by Exchange Blood Transfusion'. *N. Engl. J. Med.* 274: 473–481.
3. Sabin, S. (1968). 'Treatment of Hepatic Coma in Cirrhosis by Plasmapheresis and Plasma Infusion (Plasma Exchange)'. *Ann. Intern. Med.* 68: 1.
4. Mitzner, S. R. *et al.* (2001). 'Extracorporeal detoxification using the molecular adsorbent recirculating system for critically ill patients with liver failure'. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN.* 12 Suppl 17: S75-82.
5. Saliba, F. & Samuel, D. (2015). 'Artificial liver support: a real step forward'. *Minerva Med.* 106: 35–43.
6. Kimoto, S. (1959). 'The artificial liver: experiments and clinical application.' *Trans Am Soc Artif Intern Organs.* 5: 102–112.
7. Eiseman, B. *et al.* (1965). 'Heterologous liver perfusion in treatment of hepatic failure'. *Ann Surg.* 162: 329–345.
8. Levy, M. *et al.* (2000). 'Liver allotransplantation after extracorporeal hepatic support with transgenic (hCD55/hCD59) porcine livers: clinical results and lack of pig-to-human transmission of the porcine endogenous retrovirus'. *Transplantation.* 69: 272–280.
9. Xu, H. *et al.* (2003). 'Serologic analysis of anti-porcine endogenous retroviruses immune responses in humans after ex vivo transgenic pig liver perfusion'. *ASAIO J.* 49: 407–416.
10. Uchino, J. *et al.* (1988). 'A hybrid bioartificial liver composed of multiplated hepatocyte monolayers'. *ASAIO Trans.* 34: 972–977.
11. Rozga, J. *et al.* (1993). 'Development of a hybrid bioartificial liver'. *Ann Surg.* 217: 502–511.
12. Gerlach, J. *et al.* (1994). 'Bioreactor for a larger scale hepatocyte in vitro perfusion'. *Transplantation.* 58:
13. Shen, Y. *et al.* (2016). 'Survival Benefits With Artificial Liver Support System for Acute-on-Chronic Liver Failure: A Time Series-Based Meta-Analysis'. *Medicine (Baltimore).* 95: e2506.
14. Elaut, G. *et al.* (2006). 'Molecular mechanisms underlying the dedifferentiation process of isolated hepatocytes and their cultures'. *Curr. Drug Metab.* 7: 629–660.
15. Stéphenne, X. *et al.* (2010). 'Hepatocyte cryopreservation: Is it time to change the strategy?' *World J. Gastroenterol. WJG.* 16: 1–14.
16. Cho, C. H. *et al.* (2008). 'A new technique for primary hepatocyte expansion in vitro'. *Biotechnol. Bioeng.* 101: 345–356.
17. Watanabe, M. *et al.* (2016). 'Maintenance of Hepatic Functions in Primary Human Hepatocytes Cultured on Xeno-Free and Chemical Defined Human Recombinant Laminins'. *PLOS ONE.* 11: e0161383.
18. van de Kerkhove, M. P. *et al.* (2005). 'Liver support therapy: an overview of the AMC-bioartificial liver research'. *Dig. Surg.* 22: 254–264.
19. Fleig, S. V. *et al.* (2007). 'Hepatic accumulation of Hedgehog-reactive progenitors increases with severity of fatty liver damage in mice'. *Lab. Invest.* 87: 1227–1239.
20. Zajicek, G. *et al.* (1985). 'The streaming liver'. *Liver.* 5: 293–300.
21. Fellous, T. G. *et al.* (2009). 'Locating the stem cell niche and tracing hepatocyte lineages in human liver'. *Hepatology.* 49: 1655–1663.
22. Wright, N. *et al.* (2008). 'Enrichment of a bipotent hepatic progenitor cell from naïve adult liver tissue'. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 366: 367–372.
23. Sahin, M. B. *et al.* (2008). 'Isolation and characterization of a novel population of progenitor cells from unmanipulated rat liver'. *Liver Transpl.* 14: 333–345.

24. Chen, Y. *et al.* (2010). 'Hepatic differentiation of liver-derived progenitor cells and their characterization by microRNA analysis'. *Liver Transpl.* 16: 1086–1097.
25. Oertel, M. *et al.* (2006). 'Cell competition leads to a high level of normal liver reconstitution by transplanted fetal liver stem/progenitor cells'. *Gastroenterology.* 130: 507–520; quiz 590.
26. Schmelzer, E. *et al.* (2006). 'The Phenotypes of Pluripotent Human Hepatic Progenitors'. *Stem Cells.* 24: 1852–1858.
27. Haridass, D. *et al.* (2009). 'Repopulation Efficiencies of Adult Hepatocytes, Fetal Liver Progenitor Cells, and Embryonic Stem Cell-Derived Hepatic Cells in Albumin-Promoter-Enhancer Urokinase-Type Plasminogen Activator Mice'. *Am. J. Pathol.* 175: 1483–1492.
28. Lee, S.-G. *et al.* (2015). 'Bone marrow-derived progenitor cells in de novo liver regeneration in liver transplant: Liver Regeneration in Human Liver Transplants'. *Liver Transpl.* 21: 1186–1194.
29. Wang, M. *et al.* (2016). 'Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Reverse Liver Damage in a Carbon Tetrachloride-induced Mouse Model of Chronic Liver Injury'. *Vivo Athens Greece.* 30: 187–193.
30. Eggenhofer, E. *et al.* (2008). 'Allogeneic bone marrow transplantation restores liver function in Fah-knockout mice'. *Exp. Hematol.* 36: 1507–1513.
31. Vassilopoulos, G. *et al.* (2003). 'Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion'. *Nature.* 422: 901–904.
32. Fikry, H. *et al.* (2016). 'Therapeutic Potential of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells on Experimental Liver Injury Induced by *Schistosoma mansoni*: A Histological Study'. *Int. J. Stem Cells.* 9: 96–106.
33. Bi, H. *et al.* (2016). 'Liver extracellular matrix promotes BM-MSCs hepatic differentiation and reversal of liver fibrosis through activation of integrin pathway: BMMSCs reversal of liver fibrosis'. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*
34. Shi, D. *et al.* (2016). 'Quantitative evaluation of human bone mesenchymal stem cells rescuing fulminant hepatic failure in pigs'. *Gut.* gutjnl-2015-311146.
35. Russo, F. P. *et al.* (2006). 'The bone marrow functionally contributes to liver fibrosis'. *Gastroenterology.* 130: 1807–1821.
36. Banas, A. *et al.* (2007). 'Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes'. *Hepatol. Baltim. Md.* 46: 219–228.
37. Sgodda, M. *et al.* (2007). 'Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from rat peritoneal adipose tissue in vitro and in vivo'. *Exp. Cell Res.* 313: 2875–2886.
38. Aurich, H. *et al.* (2009). 'Hepatocyte differentiation of mesenchymal stem cells from human adipose tissue in vitro promotes hepatic integration in vivo'. *Gut.* 58: 570–581.
39. Khuu, D. N. *et al.* (2011). 'In Vitro Differentiated Adult Human Liver Progenitor Cells Display Mature Hepatic Metabolic Functions: A Potential Tool for in Vitro Pharmacotoxicological Testing'. *Cell Transplant.* 20: 287–302.
40. Scheers, I. *et al.* (2012). 'Adult-derived human liver progenitor cells in long-term culture maintain appropriate gatekeeper mechanisms against transformation'. *Cell Transplant.* 21: 2241–2255.
41. Defresne, F. *et al.* (2014). 'Biodistribution of adult derived human liver stem cells following intraportal infusion in a 17-year-old patient with glycogenosis type 1A'. *Nucl. Med. Biol.* 41: 371–375.
42. Sokal, E. M. *et al.* (2014). 'Liver engraftment and repopulation by in vitro expanded adult derived human liver stem cells in a child with ornithine carbamoyltransferase deficiency'. *JIMD Rep.* 13: 65–72.
43. Hay, D. C. *et al.* (2007). 'Direct Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Hepatocyte-like Cells Exhibiting Functional Activities'. *Cloning Stem Cells.* 9: 51–62.
44. Touboul, T. *et al.* (2010). 'Generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells under chemically defined conditions that recapitulate liver development'. *Hepatol. Baltim. Md.* 51: 1754–1765.
45. Si-Tayeb, K. *et al.* (2010). 'Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells'. *Hepatol. Baltim. Md.* 51: 297–305.

46. Sullivan, G. J. *et al.* (2010). 'Generation of functional human hepatic endoderm from human induced pluripotent stem cells'. *Hepatology*. 51: 329–335.
47. Ramalho-Santos, M. & Willenbring, H. (2007). 'On the origin of the term "stem cell"'. *Cell Stem Cell*. 1: 35–38.
48. Haeckel, E. (1877). 'Anthropogenie oder Entwicklungsgeschichte des Menschen'. 3rd Edn *Wilhelm Engelmann*.
49. Weismann, A. (1885). 'Die Continuität des Keimplasma's als Grundlage einer Theorie der Vererbung'. *Gustav Fisch*. 5–21.
50. Boveri, T. (1892). 'Ueber die Entstehung des Gegensatzes zwischen den Geschlechtszellen und den somatischen Zellen bei *Ascaris megalocephala*, nebst Bemerkungen zur Entwicklungsgeschichte der Nematoden'. *Sitzungsberichte Ges. Für Morphol. Physiol. Münch.* 8:
51. Askanazy, M. (1907). 'Die Teratome nach ihrem Bau, ihrem Verlauf, ihrer Genese und im Vergleich zum experimentellen Teratoid'. *Verhandlungen Dtsch. Pathol. Ges.* 39–82.
52. Stevens, L. (1954). 'Spontaneous Testicular Teratomas in an Inbred Strain of Mice'. *Proc Natl Acad Sci USA*. 40: 1080–1087.
53. Pierce, G. B. *et al.* (1959). 'Testicular teratomas.I. Demonstration of teratogenesis by metamorphosis of multipotential Cells'. *Cancer*. 12: 573–583.
54. Stevens, L. C. (1960). 'Embryonic potency of embryoid bodies derived from a transplantable testicular teratoma of the mouse'. *Dev. Biol.* 2: 285–297.
55. Pierce, G. B. *et al.* (1960). 'Teratocarcinogenic and tissue-forming potentials of the cell types comprising neoplastic embryoid bodies'. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 9: 583–602.
56. Evans, M. J. (1972). 'The isolation and properties of a clonal tissue culture strain of pluripotent mouse teratoma cells'. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 28: 163–176.
57. Mintz, B. & Illmensee, K. (1975). 'Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells'. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 72: 3585–3589.
58. Brinster, R. L. (1974). 'The effect of cells transferred into the mouse blastocyst on subsequent development'. *J. Exp. Med.* 140: 1049–1056.
59. Evans, M. J. & Kaufman, M. H. (1981). 'Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos'. *Nature*. 292: 154–156.
60. Andrews, P. W. (2002). 'From teratocarcinomas to embryonic stem cells'. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 357: 405–417.
61. Thomson, J. A. *et al.* (1998). 'Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts'. *Science*. 282: 1145–1147.
62. Takahashi, K. & Yamanaka, S. (2006). 'Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors'. *Cell*. 126: 663–676.
63. Takahashi, K. *et al.* (2007). 'Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors'. *Cell*. 131: 861–872.
64. Xu, C. *et al.* (2001). 'Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells'. *Nat. Biotechnol.* 19: 971–974.
65. Mei, Y. *et al.* (2010). 'Combinatorial development of biomaterials for clonal growth of human pluripotent stem cells'. *Nat. Mater.* 9: 768–778.
66. Sugii, S. *et al.* (2010). 'Human and mouse adipose-derived cells support feeder-independent induction of pluripotent stem cells'. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107: 3558–3563.
67. Meng, G. *et al.* (2012). 'Synergistic effect of medium, matrix, and exogenous factors on the adhesion and growth of human pluripotent stem cells under defined, xeno-free conditions'. *Stem Cells Dev.* 21: 2036–2048.
68. Chen, G. *et al.* (2011). 'Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture'. *Nat. Methods*. 8: 424–429.
69. Nakagawa, M. *et al.* (2014). 'A novel efficient feeder-free culture system for the derivation of human induced pluripotent stem cells'. *Sci. Rep.* 4: 3594.
70. Spemann, H. (1938). 'Embryonic development and induction'. *Yale Univ. Press N. Hav.*

71. Briggs, R. & King, T. J. (1952). 'Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs'. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 38: 455–463.
72. Gurdon, J. B. (1962). 'The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles'. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 10: 622–640.
73. Wakayama, T. *et al.* (1998). 'Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei'. *Nature.* 394: 369–374.
74. Byrne, J. A. *et al.* (2007). 'Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer'. *Nature.* 450: 497–502.
75. Polejaeva, I. A. *et al.* (2000). 'Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells'. *Nature.* 407: 86–90.
76. Chesné, P. *et al.* (2002). 'Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells'. *Nat. Biotechnol.* 20: 366–369.
77. Lee, B. C. *et al.* (2005). 'Dogs cloned from adult somatic cells'. *Nature.* 436: 641.
78. Shin, T. *et al.* (2002). 'A cat cloned by nuclear transplantation'. *Nature.* 415: 859.
79. Wani, N. A. *et al.* (2010). 'Production of the first cloned camel by somatic cell nuclear transfer'. *Biol. Reprod.* 82: 373–379.
80. Wilmut, I. *et al.* (1997). 'Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells'. *Nature.* 385: 810–813.
81. Tachibana, M. *et al.* (2013). 'Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer'. *Cell.* 153: 1228–1238.
82. Cowan, C. A. *et al.* (2005). 'Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells'. *Science.* 309: 1369–1373.
83. Wen, B. *et al.* (2017). 'Tetraploid embryonic stem cells can contribute to the development of chimeric fetuses and chimeric extraembryonic tissues'. *Sci. Rep.* 7:
84. Yang, Y. *et al.* (2017). 'Derivation of Pluripotent Stem Cells with In Vivo Embryonic and Extraembryonic Potency'. *Cell.* 169: 243–257.e25.
85. Weissman, I. L. *et al.* (2001). 'Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations'. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17: 387–403.
86. Smith, A. G. (2001). 'Embryo-derived stem cells: of mice and men'. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17: 435–462.
87. Hayflick, L. (1965). 'The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains'. *Exp. Cell Res.* 37: 614–636.
88. Sherr, C. J. & DePinho, R. A. (2000). 'Cellular senescence: mitotic clock or culture shock?' *Cell.* 102: 407–410.
89. Campisi, J. & Robert, L. (2014). 'Cell senescence: role in aging and age-related diseases'. *Interdiscip. Top. Gerontol.* 39: 45–61.
90. Zeng, X. (2007). 'Human embryonic stem cells: mechanisms to escape replicative senescence?' *Stem Cell Rev.* 3: 270–279.
91. Abkowitz, J. L. *et al.* (1990). 'Evidence for the maintenance of hematopoiesis in a large animal by the sequential activation of stem-cell clones'. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87: 9062–9066.
92. Smith, A. G. (2001). 'Embryo-derived stem cells: of mice and men'. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17: 435–462.
93. Rosler, E. S. *et al.* (2004). 'Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions'. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 229: 259–274.
94. Lim, U.-M. *et al.* (2006). 'Derivation of Motor Neurons from three Clonal Human Embryonic Stem Cell Lines'. *Curr. Neurovasc. Res.* 3: 281–288.
95. Xu, C. *et al.* (2002). 'Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells'. *Circ. Res.* 91: 501–508.
96. Gropp, M. *et al.* (2012). 'Standardization of the teratoma assay for analysis of pluripotency of human ES cells and biosafety of their differentiated progeny'. *PLoS One.* 7: e45532.
97. Allegrucci, C. *et al.* (2004). 'Stem-cell consequences of embryo epigenetic defects'. *Lancet Lond. Engl.* 364: 206–208.

98. Bibikova, M. (2006). 'Human embryonic stem cells have a unique epigenetic signature'. *Genome Res.* 16: 1075–1083.
99. Maitra, A. *et al.* (2005). 'Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells'. *Nat. Genet.* 37: 1099–1103.
100. Meshorer, E. *et al.* (2006). 'Hyperdynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent embryonic stem cells'. *Dev. Cell.* 10: 105–116.
101. Hong, S.-H. *et al.* (2011). 'Cell fate potential of human pluripotent stem cells is encoded by histone modifications'. *Cell Stem Cell.* 9: 24–36.
102. Mertzaniidou, A. *et al.* (2013). 'Microarray analysis reveals abnormal chromosomal complements in over 70% of 14 normally developing human embryos'. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 28: 256–264.
103. Yan, L. *et al.* (2013). 'Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells'. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20: 1131–1139.
104. Okamoto, I. *et al.* (2011). 'Eutherian mammals use diverse strategies to initiate X-chromosome inactivation during development'. *Nature.* 472: 370–374.
105. Roy, N. S. *et al.* (2006). 'Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes'. *Nat. Med.* 12: 1259–1268.
106. Kroon, E. *et al.* (2008). 'Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo'. *Nat. Biotechnol.* 26: 443–452.
107. Darabi, R. *et al.* (2008). 'Functional skeletal muscle regeneration from differentiating embryonic stem cells'. *Nat. Med.* 14: 134–143.
108. Ménard, C. *et al.* (2005). 'Transplantation of cardiac-committed mouse embryonic stem cells to infarcted sheep myocardium: a preclinical study'. *Lancet Lond. Engl.* 366: 1005–1012.
109. Blin, G. *et al.* (2010). 'A purified population of multipotent cardiovascular progenitors derived from primate pluripotent stem cells engrafts in postmyocardial infarcted nonhuman primates'. *J. Clin. Invest.* 120: 1125–1139.
110. Lebkowski, J. (2011). 'GRNOPC1: the world's first embryonic stem cell-derived therapy. Interview with Jane Lebkowski'. *Regen. Med.* 6: 11–13.
111. Keirstead, H. S. *et al.* (2005). 'Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury'. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 25: 4694–4705.
112. Scott, C. & Huggett, B. (2012). 'Geron's quixotic fate'. *Nat. Biotechnol.* 30: 497.
113. Priest, C. A. *et al.* (2015). 'Preclinical safety of human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitors supporting clinical trials in spinal cord injury'. *Regen. Med.* 10: 939–958.
114. Menasché, P. *et al.* (2015). 'Towards a clinical use of human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors: a translational experience'. *Eur. Heart J.* 36: 743–750.
115. Menasché, P. *et al.* (2015). 'Human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors for severe heart failure treatment: first clinical case report'. *Eur. Heart J.* 36: 2011–2017.
116. Avior, Y. *et al.* (2016). 'Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery'. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17: 170–182.
117. Greaves, P. *et al.* (2004). 'First dose of potential new medicines to humans: how animals help'. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3: 226–236.
118. Braam, S. R. *et al.* (2010). 'Prediction of drug-induced cardiotoxicity using human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes'. *Stem Cell Res.* 4: 107–116.
119. McNeish, J. *et al.* (2010). 'High-throughput screening in embryonic stem cell-derived neurons identifies potentiators of alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazolepropionate-type glutamate receptors'. *J. Biol. Chem.* 285: 17209–17217.
120. Guguen-Guillouzo, C. *et al.* (2010). 'Stem cell-derived hepatocytes and their use in toxicology'. *Toxicology.* 270: 3–9.
121. Abbott, A. *et al.* (2006). 'The lure of stem cell lines'. *Nature.* 442:
122. Alberts, B. (2008). 'Editorial: celebrating a year of Science'. *Science.* 322: 1757.

123. Yu, J. *et al.* (2007). 'Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells'. *Science*. 318: 1917–1920.
124. Brambrink, T. *et al.* (2008). 'Sequential Expression of Pluripotency Markers during Direct Reprogramming of Mouse Somatic Cells'. *Cell Stem Cell*. 2: 151–159.
125. Samavarchi-Tehrani, P. *et al.* (2010). 'Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming'. *Cell Stem Cell*. 7: 64–77.
126. Polo, J. *et al.* (2012). 'A Molecular Roadmap of Reprogramming Somatic Cells into iPS Cells'. *Cell*. 151: 1617–1632.
127. Stadtfeld, M. *et al.* (2008). 'Defining Molecular Cornerstones during Fibroblast to iPS Cell Reprogramming in Mouse'. *Cell Stem Cell*. 2: 230–240.
128. Li, R. *et al.* (2010). 'A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts'. *Cell Stem Cell*. 7: 51–63.
129. Mikkelsen, T. S. *et al.* (2008). 'Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis'. *Nature*. 454: 49–55.
130. Hansson, J. *et al.* (2012). 'Highly Coordinated Proteome Dynamics during Reprogramming of Somatic Cells to Pluripotency'. *Cell Rep*. 2: 1579–1592.
131. Puri, P. L. *et al.* (2001). 'Class I histone deacetylases sequentially interact with MyoD and pRb during skeletal myogenesis'. *Mol. Cell*. 8: 885–897.
132. Dominguez-Sola, D. *et al.* (2007). 'Non-transcriptional control of DNA replication by c-Myc'. *Nature*. 448: 445–451.
133. Knoepfler, P. S. (2008). 'Why myc? An unexpected ingredient in the stem cell cocktail'. *Cell Stem Cell*. 2: 18–21.
134. Huangfu, D. *et al.* (2008). 'Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds'. *Nat. Biotechnol.* 26: 795–797.
135. Huangfu, D. *et al.* (2008). 'Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2'. *Nat. Biotechnol.* 26: 1269–1275.
136. Golipour, A. *et al.* (2012). 'A late transition in somatic cell reprogramming requires regulators distinct from the pluripotency network'. *Cell Stem Cell*. 11: 769–782.
137. Eminli, S. *et al.* (2008). 'Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression'. *Stem Cells Dayt. Ohio*. 26: 2467–2474.
138. Pasque, V. *et al.* (2011). 'Epigenetic factors influencing resistance to nuclear reprogramming'. *Trends Genet.* 27: 516–525.
139. Sekiya, T. *et al.* (2009). 'Nucleosome-binding affinity as a primary determinant of the nuclear mobility of the pioneer transcription factor FoxA'. *Genes Dev.* 23: 804–809.
140. Zaret, K. S. *et al.* (2010). 'Nuclear mobility and mitotic chromosome binding: similarities between pioneer transcription factor FoxA and linker histone H1'. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 75: 219–226.
141. Iwafuchi-Doi, M. & Zaret, K. S. (2014). 'Pioneer transcription factors in cell reprogramming'. *Genes Dev.* 28: 2679–2692.
142. Soufi, A. *et al.* (2015). 'Pioneer transcription factors target partial DNA motifs on nucleosomes to initiate reprogramming'. *Cell*. 161: 555–568.
143. Kang, S.-J. *et al.* (2014). 'Sodium butyrate efficiently converts fully reprogrammed induced pluripotent stem cells from mouse partially reprogrammed cells'. *Cell. Reprogramming*. 16: 345–354.
144. Zhai, Y. *et al.* (2015). 'Histone deacetylase inhibitor valproic acid promotes the induction of pluripotency in mouse fibroblasts by suppressing reprogramming-induced senescence stress'. *Exp. Cell Res.* 337: 61–67.
145. Soufi, A. *et al.* (2012). 'Facilitators and Impediments of the Pluripotency Reprogramming Factors' Initial Engagement with the Genome'. *Cell*. 151: 994–1004.
146. Sridharan, R. *et al.* (2009). 'Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency'. *Cell*. 136: 364–377.

147. Onder, T. T. *et al.* (2012). 'Chromatin-modifying enzymes as modulators of reprogramming'. *Nature*. 483: 598–602.
148. Hu, X. *et al.* (2014). 'Tet and TDG mediate DNA demethylation essential for mesenchymal-to-epithelial transition in somatic cell reprogramming'. *Cell Stem Cell*. 14: 512–522.
149. Di Stefano, B. *et al.* (2014). 'C/EBP $\alpha$  poises B cells for rapid reprogramming into induced pluripotent stem cells'. *Nature*. 506: 235–239.
150. Marion, R. M. *et al.* (2009). 'Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cells'. *Cell Stem Cell*. 4: 141–154.
151. Pasque, V. *et al.* (2014). 'X chromosome reactivation dynamics reveal stages of reprogramming to pluripotency'. *Cell*. 159: 1681–1697.
152. Maherali, N. *et al.* (2007). 'Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution'. *Cell Stem Cell*. 1: 55–70.
153. Tomoda, K. *et al.* (2012). 'Derivation Conditions Impact X-Inactivation Status in Female Human Induced Pluripotent Stem Cells'. *Cell Stem Cell*. 11: 91–99.
154. Kim, K. *et al.* (2011). 'Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells'. *Nat. Biotechnol.* 29: 1117–1119.
155. Shipony, Z. *et al.* (2014). 'Dynamic and static maintenance of epigenetic memory in pluripotent and somatic cells'. *Nature*. 513: 115–119.
156. Bar-Nur, O. *et al.* (2011). 'Epigenetic memory and preferential lineage-specific differentiation in induced pluripotent stem cells derived from human pancreatic islet beta cells'. *Cell Stem Cell*. 9: 17–23.
157. Warren, L. *et al.* (2010). 'Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA'. *Cell Stem Cell*. 7: 618–630.
158. Zhou, H. *et al.* (2009). 'Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Using Recombinant Proteins'. *Cell Stem Cell*. 4: 381–384.
159. Yu, J. *et al.* (2009). 'Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences'. *Science*. 324: 797–801.
160. Tat, P. A. *et al.* (2011). 'The efficiency of cell fusion-based reprogramming is affected by the somatic cell type and the in vitro age of somatic cells'. *Cell. Reprogramming*. 13: 331–344.
161. Maherali, N. *et al.* (2008). 'A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells'. *Cell Stem Cell*. 3: 340–345.
162. Chang, C.-W. *et al.* (2009). 'Polycistronic lentiviral vector for "hit and run" reprogramming of adult skin fibroblasts to induced pluripotent stem cells'. *Stem Cells Dayt. Ohio*. 27: 1042–1049.
163. Hockemeyer, D. *et al.* (2008). 'A drug-inducible system for direct reprogramming of human somatic cells to pluripotency'. *Cell Stem Cell*. 3: 346–353.
164. Woltjen, K. *et al.* (2009). 'piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells'. *Nature*. 458: 766–770.
165. Ramalingam, S. *et al.* (2013). 'Generation and genetic engineering of human induced pluripotent stem cells using designed zinc finger nucleases'. *Stem Cells Dev.* 22: 595–610.
166. Mitani, K. & Kubo, S. (2002). 'Adenovirus as an integrating vector'. *Curr. Gene Ther.* 2: 135–144.
167. Fusaki, N. *et al.* (2009). 'Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome'. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 85: 348–362.
168. Anokye-Danso, F. *et al.* (2011). 'Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency'. *Cell Stem Cell*. 8: 376–388.
169. Ye, L. *et al.* (2013). 'Blood cell-derived induced pluripotent stem cells free of reprogramming factors generated by Sendai viral vectors'. *Stem Cells Transl. Med.* 2: 558–566.
170. Zhou, T. *et al.* (2011). 'Generation of induced pluripotent stem cells from urine'. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN*. 22: 1221–1228.
171. Štefková, K. *et al.* (2015). 'Alkaline phosphatase in stem cells'. *Stem Cells Int.* 2015: 628368.
172. Baghbaderani, B. A. *et al.* (2016). 'Detailed Characterization of Human Induced Pluripotent Stem Cells Manufactured for Therapeutic Applications'. *Stem Cell Rev.* 12: 394–420.

173. Hanna, J. *et al.* (2007). 'Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPSC cells generated from autologous skin'. *Science*. 318: 1920–1923.
174. Kanemura, H. *et al.* (2014). 'Tumorigenicity studies of induced pluripotent stem cell (iPSC)-derived retinal pigment epithelium (RPE) for the treatment of age-related macular degeneration'. *PLoS One*. 9: e85336.
175. Hallett, P. J. *et al.* (2015). 'Successful function of autologous iPSC-derived dopamine neurons following transplantation in a non-human primate model of Parkinson's disease'. *Cell Stem Cell*. 16: 269–274.
176. Ye, L. *et al.* (2014). 'Cardiac repair in a porcine model of acute myocardial infarction with human induced pluripotent stem cell-derived cardiovascular cells'. *Cell Stem Cell*. 15: 750–761.
177. Chakradhar, S. (2016). 'An eye to the future: Researchers debate best path for stem cell-derived therapies'. *Nat. Med.* 22: 116–119.
178. Garber, K. (2015). 'RIKEN suspends first clinical trial involving induced pluripotent stem cells'. *Nat. Biotechnol.* 33: 890–891.
179. Gibert, Y. *et al.* (2013). 'Zebrafish as a genetic model in pre-clinical drug testing and screening'. *Curr. Med. Chem.* 20: 2458–2466.
180. Schmitt, S. M. *et al.* (2014). 'Engineering *Xenopus* embryos for phenotypic drug discovery screening'. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 69–70: 225–246.
181. Vojnits, K. & Bremer, S. (2010). 'Challenges of using pluripotent stem cells for safety assessments of substances'. *Toxicology*. 270: 10–17.
182. Ko, H. C. & Gelb, B. D. (2014). 'Concise review: drug discovery in the age of the induced pluripotent stem cell'. *Stem Cells Transl. Med.* 3: 500–509.
183. Mathur, A. *et al.* (2015). 'Human iPSC-based cardiac microphysiological system for drug screening applications'. *Sci. Rep.* 5: 8883.
184. Zhao, W.-N. *et al.* (2012). 'A high-throughput screen for Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway modulators in human iPSC-derived neural progenitors'. *J. Biomol. Screen.* 17: 1252–1263.
185. Ware, B. R. *et al.* (2015). 'Prediction of Drug-Induced Liver Injury in Micropatterned Co-cultures Containing iPSC-Derived Human Hepatocytes'. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 145: 252–262.
186. Dimos, J. T. *et al.* (2008). 'Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons'. *Science*. 321: 1218–1221.
187. Park, I.-H. *et al.* (2008). 'Disease-specific induced pluripotent stem cells'. *Cell*. 134: 877–886.
188. HD iPSC Consortium. (2012). 'Induced pluripotent stem cells from patients with Huntington's disease show CAG-repeat-expansion-associated phenotypes'. *Cell Stem Cell*. 11: 264–278.
189. Soldner, F. *et al.* (2009). 'Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors'. *Cell*. 136: 964–977.
190. Israel, M. A. *et al.* (2012). 'Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells'. *Nature*. 482: 216–220.
191. Shoji, E. *et al.* (2015). 'Early pathogenesis of Duchenne muscular dystrophy modelled in patient-derived human induced pluripotent stem cells'. *Sci. Rep.* 5: 12831.
192. Rashid, S. T. *et al.* (2010). 'Modeling inherited metabolic disorders of the liver using human induced pluripotent stem cells'. *J. Clin. Invest.* 120: 3127–3136.
193. Chang, Y.-C. *et al.* (2014). 'The generation of induced pluripotent stem cells for macular degeneration as a drug screening platform: identification of curcumin as a protective agent for retinal pigment epithelial cells against oxidative stress'. *Front. Aging Neurosci.* 6: 191.
194. Ye, L. *et al.* (2009). 'Induced pluripotent stem cells offer new approach to therapy in thalassemia and sickle cell anemia and option in prenatal diagnosis in genetic diseases'. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106: 9826–9830.
195. Philippens, I. H. C. H. M. *et al.* (2010). 'The MPTP marmoset model of parkinsonism: a multi-purpose non-human primate model for neurodegenerative diseases'. *Drug Discov. Today*. 15: 985–990.

196. Bihel, E. *et al.* (2010). 'Permanent or transient chronic ischemic stroke in the non-human primate: behavioral, neuroimaging, histological, and immunohistochemical investigations'. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 30: 273–285.
197. Iwanami, A. *et al.* (2005). 'Transplantation of human neural stem cells for spinal cord injury in primates'. *J. Neurosci. Res.* 80: 182–190.
198. Sasaki, E. *et al.* (2009). 'Generation of transgenic non-human primates with germline transmission'. *Nature.* 459: 523–527.
199. Schatten, G. & Mitalipov, S. (2009). 'Developmental biology: Transgenic primate offspring'. *Nature.* 459: 515–516.
200. Thomson, J. A. *et al.* (1995). 'Isolation of a primate embryonic stem cell line'. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92: 7844–7848.
201. Blin, G. *et al.* (2010). 'A purified population of multipotent cardiovascular progenitors derived from primate pluripotent stem cells engrafts in postmyocardial infarcted nonhuman primates'. *J. Clin. Invest.* 120: 1125–1139.
202. Liu, H. *et al.* (2008). 'Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts'. *Cell Stem Cell.* 3: 587–590.
203. Wu, Y. *et al.* (2012). 'Nonhuman primate induced pluripotent stem cells in regenerative medicine'. *Stem Cells Int.* 2012: 767195.
204. Zhong, B. *et al.* (2011). 'Efficient generation of nonhuman primate induced pluripotent stem cells'. *Stem Cells Dev.* 20: 795–807.
205. Wunderlich, S. *et al.* (2012). 'Induction of pluripotent stem cells from a cynomolgus monkey using a polycistronic simian immunodeficiency virus-based vector, differentiation toward functional cardiomyocytes, and generation of stably expressing reporter lines'. *Cell. Reprogramming.* 14: 471–484.
206. Navara, C. S. *et al.* (2013). 'Derivation of induced pluripotent stem cells from the baboon: a nonhuman primate model for preclinical testing of stem cell therapies'. *Cell. Reprogramming.* 15: 495–502.
207. Ben-Nun, I. F. *et al.* (2011). 'Induced pluripotent stem cells from highly endangered species'. *Nat. Methods.* 8: 829–831.
208. Okamoto, S. & Takahashi, M. (2011). 'Induction of retinal pigment epithelial cells from monkey iPS cells'. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 52: 8785–8790.
209. Zhu, F. F. *et al.* (2011). 'Generation of pancreatic insulin-producing cells from rhesus monkey induced pluripotent stem cells'. *Diabetologia.* 54: 2325–2336.
210. Abed, S. *et al.* (2015). 'Transplantation of *Macaca cynomolgus* iPS-derived hematopoietic cells in NSG immunodeficient mice'. *Haematologica.* 100: e428–431.
211. Sourisseau, M. *et al.* (2013). 'Hepatic cells derived from induced pluripotent stem cells of pigtail macaques support hepatitis C virus infection'. *Gastroenterology.* 145: 966–969.e7.
212. Deleidi, M. *et al.* (2011). 'Development of histocompatible primate-induced pluripotent stem cells for neural transplantation'. *Stem Cells Dayt. Ohio.* 29: 1052–1063.
213. Emborg, M. E. *et al.* (2013). 'Induced pluripotent stem cell-derived neural cells survive and mature in the nonhuman primate brain'. *Cell Rep.* 3: 646–650.
214. Yunis, J. J. (1976). 'High resolution of human chromosomes'. *Science.* 191: 1268–1270.
215. Meisner, L. F. & Johnson, J. A. (2008). 'Protocols for cytogenetic studies of human embryonic stem cells'. *Methods San Diego Calif.* 45: 133–141.
216. Kallioniemi, A. *et al.* (1992). 'Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors'. *Science.* 258: 818–821.
217. Wang, D. G. *et al.* (1998). 'Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome'. *Science.* 280: 1077–1082.
218. Metzker, M. L. (2010). 'Sequencing technologies - the next generation'. *Nat. Rev. Genet.* 11: 31–46.
219. Pagnamenta, A. T. *et al.* (2012). 'Exome sequencing can detect pathogenic mosaic mutations present at low allele frequencies'. *J. Hum. Genet.* 57: 70–72.

220. Mayshar, Y. *et al.* (2010). 'Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells'. *Cell Stem Cell*. 7: 521–531.
221. Taapken, S. M. *et al.* (2011). 'Karyotypic abnormalities in human induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells'. *Nat. Biotechnol.* 29: 313–314.
222. Martins-Taylor, K. & Xu, R.-H. (2012). 'Concise review: Genomic stability of human induced pluripotent stem cells'. *Stem Cells Dayt. Ohio*. 30: 22–27.
223. Draper, J. S. *et al.* (2004). 'Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells'. *Nat. Biotechnol.* 22: 53–54.
224. Laurent, L. C. *et al.* (2011). 'Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture'. *Cell Stem Cell*. 8: 106–118.
225. Chin, M. H. *et al.* (2009). 'Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures'. *Cell Stem Cell*. 5: 111–123.
226. Hussein, S. M. *et al.* (2011). 'Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency'. *Nature*. 471: 58–62.
227. Abyzov, A. *et al.* (2012). 'Somatic copy number mosaicism in human skin revealed by induced pluripotent stem cells'. *Nature*. 492: 438–442.
228. Gore, A. *et al.* (2011). 'Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells'. *Nature*. 471: 63–67.
229. Ji, J. *et al.* (2012). 'Elevated coding mutation rate during the reprogramming of human somatic cells into induced pluripotent stem cells'. *Stem Cells Dayt. Ohio*. 30: 435–440.
230. Ruiz, S. *et al.* (2013). 'Analysis of protein-coding mutations in hiPSCs and their possible role during somatic cell reprogramming'. *Nat. Commun.* 4: 1382.
231. Young, M. A. *et al.* (2012). 'Background mutations in parental cells account for most of the genetic heterogeneity of induced pluripotent stem cells'. *Cell Stem Cell*. 10: 570–582.
232. Cheng, L. *et al.* (2012). 'Low incidence of DNA sequence variation in human induced pluripotent stem cells generated by nonintegrating plasmid expression'. *Cell Stem Cell*. 10: 337–344.
233. Ji, J. *et al.* (2012). 'Elevated coding mutation rate during the reprogramming of human somatic cells into induced pluripotent stem cells'. *Stem Cells Dayt. Ohio*. 30: 435–440.
234. Sugiura, M. *et al.* (2014). 'Induced pluripotent stem cell generation-associated point mutations arise during the initial stages of the conversion of these cells'. *Stem Cell Rep.* 2: 52–63.
235. Saini, N. *et al.* (2016). 'The Impact of Environmental and Endogenous Damage on Somatic Mutation Load in Human Skin Fibroblasts'. *PLOS Genet.* 12: e1006385.
236. Garinis, G. A. *et al.* (2008). 'DNA damage and ageing: new-age ideas for an age-old problem'. *Nat. Cell Biol.* 10: 1241–1247.
237. Martincorena, I. *et al.* (2015). 'Tumor evolution. High burden and pervasive positive selection of somatic mutations in normal human skin'. *Science*. 348: 880–886.
238. Jaiswal, S. *et al.* (2014). 'Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes'. *N. Engl. J. Med.* 371: 2488–2498.
239. Steichen, C. *et al.* (2014). 'Messenger RNA- Versus Retrovirus-Based Induced Pluripotent Stem Cell Reprogramming Strategies: Analysis of Genomic Integrity'. *Stem Cells Transl. Med.* 3: 686–691.
240. Bhutani, K. *et al.* (2016). 'Whole-genome mutational burden analysis of three pluripotency induction methods'. *Nat. Commun.* 7: 10536.
241. Gidekel, S. *et al.* (2003). 'Oct-3/4 is a dose-dependent oncogenic fate determinant'. *Cancer Cell*. 4: 361–370.
242. Boumahdi, S. *et al.* (2014). 'SOX2 controls tumour initiation and cancer stem-cell functions in squamous-cell carcinoma'. *Nature*. 511: 246–250.
243. Rowland, B. D. & Peeper, D. S. (2006). 'KLF4, p21 and context-dependent opposing forces in cancer'. *Nat. Rev. Cancer*. 6: 11–23.
244. Pelengaris, S. *et al.* (2002). 'c-MYC: more than just a matter of life and death'. *Nat. Rev. Cancer*. 2: 764–776.

245. Hart, A. H. *et al.* (2005). 'The pluripotency homeobox gene NANOG is expressed in human germ cell tumors'. *Cancer*. 104: 2092–2098.
246. West, J. A. *et al.* (2009). 'A role for Lin28 in primordial germ-cell development and germ-cell malignancy'. *Nature*. 460: 909–913.
247. Nakagawa, M. *et al.* (2008). 'Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts'. *Nat. Biotechnol.* 26: 101–106.
248. Hou, P. *et al.* (2013). 'Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds'. *Science*. 341: 651–654.
249. Douarin, N. M. (1975). 'An experimental analysis of liver development'. *Med. Biol.* 53: 427–455.
250. Tremblay, K. D. & Zaret, K. S. (2005). 'Distinct populations of endoderm cells converge to generate the embryonic liver bud and ventral foregut tissues'. *Dev. Biol.* 280: 87–99.
251. Bort, R. *et al.* (2006). 'Hex homeobox gene controls the transition of the endoderm to a pseudostratified, cell emergent epithelium for liver bud development'. *Dev. Biol.* 290: 44–56.
252. Gualdi, R. *et al.* (1996). 'Hepatic specification of the gut endoderm in vitro: cell signaling and transcriptional control'. *Genes Dev.* 10: 1670–1682.
253. Jung, J. *et al.* (1999). 'Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors'. *Science*. 284: 1998–2003.
254. Deutsch, G. *et al.* (2001). 'A bipotential precursor population for pancreas and liver within the embryonic endoderm'. *Dev. Camb. Engl.* 128: 871–881.
255. Serls, A. E. *et al.* (2005). 'Different thresholds of fibroblast growth factors pattern the ventral foregut into liver and lung'. *Dev. Camb. Engl.* 132: 35–47.
256. Rossi, J. M. *et al.* (2001). 'Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm'. *Genes Dev.* 15: 1998–2009.
257. Wandzioch, E. & Zaret, K. S. (2009). 'Dynamic signaling network for the specification of embryonic pancreas and liver progenitors'. *Science*. 324: 1707–1710.
258. McLin, V. A. *et al.* (2007). 'Repression of Wnt/beta-catenin signaling in the anterior endoderm is essential for liver and pancreas development'. *Dev. Camb. Engl.* 134: 2207–2217.
259. Gadue, P. *et al.* (2006). 'Wnt and TGF-beta signaling are required for the induction of an in vitro model of primitive streak formation using embryonic stem cells'. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103: 16806–16811.
260. Ober, E. A. *et al.* (2006). 'Mesodermal Wnt2b signalling positively regulates liver specification'. *Nature*. 442: 688–691.
261. Zhao, R. *et al.* (2005). 'GATA6 is essential for embryonic development of the liver but dispensable for early heart formation'. *Mol. Cell. Biol.* 25: 2622–2631.
262. Sosa-Pineda, B. *et al.* (2000). 'Hepatocyte migration during liver development requires Prox1'. *Nat. Genet.* 25: 254–255.
263. Margagliotti, S. *et al.* (2007). 'The Onecut transcription factors HNF-6/OC-1 and OC-2 regulate early liver expansion by controlling hepatoblast migration'. *Dev. Biol.* 311: 579–589.
264. Margagliotti, S. *et al.* (2008). 'Role of metalloproteinases at the onset of liver development'. *Dev. Growth Differ.* 50: 331–338.
265. Watt, A. J. *et al.* (2007). 'Development of the mammalian liver and ventral pancreas is dependent on GATA4'. *BMC Dev. Biol.* 7: 37.
266. Bossard, P. & Zaret, K. S. (1998). 'GATA transcription factors as potentiators of gut endoderm differentiation'. *Dev. Camb. Engl.* 125: 4909–4917.
267. Cirillo, L. A. *et al.* (2002). 'Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4'. *Mol. Cell.* 9: 279–289.
268. Lee, C. S. *et al.* (2005). 'The initiation of liver development is dependent on Foxa transcription factors'. *Nature*. 435: 944–947.
269. Cascio, S. & Zaret, K. S. (1991). 'Hepatocyte differentiation initiates during endodermal-mesenchymal interactions prior to liver formation'. *Dev. Camb. Engl.* 113: 217–225.

270. Zaret, K. S. (2002). 'Regulatory phases of early liver development: paradigms of organogenesis'. *Nat. Rev. Genet.* 3: 499–512.
271. Lokmane, L. *et al.* (2008). 'Crucial role of vHNF1 in vertebrate hepatic specification'. *Dev. Camb. Engl.* 135: 2777–2786.
272. Nishina, H. *et al.* (1999). 'Defective liver formation and liver cell apoptosis in mice lacking the stress signaling kinase SEK1/MKK4'. *Dev. Camb. Engl.* 126: 505–516.
273. Hilberg, F. *et al.* (1993). 'c-jun is essential for normal mouse development and hepatogenesis'. *Nature.* 365: 179–181.
274. Weinstein, M. *et al.* (2001). 'Smad proteins and hepatocyte growth factor control parallel regulatory pathways that converge on beta1-integrin to promote normal liver development'. *Mol. Cell. Biol.* 21: 5122–5131.
275. Lemaigre, F. P. (2009). 'Mechanisms of Liver Development: Concepts for Understanding Liver Disorders and Design of Novel Therapies'. *Gastroenterology.* 137: 62–79.
276. Ijpenberg, A. *et al.* (2007). 'Wt1 and retinoic acid signaling are essential for stellate cell development and liver morphogenesis'. *Dev. Biol.* 312: 157–170.
277. Hunter, M. P. *et al.* (2007). 'The homeobox gene Hhex is essential for proper hepatoblast differentiation and bile duct morphogenesis'. *Dev. Biol.* 308: 355–367.
278. Duncan, S. A. (2003). 'Mechanisms controlling early development of the liver'. *Mech. Dev.* 120: 19–33.
279. Li, J. *et al.* (2000). 'Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF-4alpha'. *Genes Dev.* 14: 464–474.
280. Mischoulon, D. *et al.* (1992). 'Growth-dependent inhibition of CCAAT enhancer-binding protein (C/EBP alpha) gene expression during hepatocyte proliferation in the regenerating liver and in culture'. *Mol. Cell. Biol.* 12: 2553–2560.
281. Tan, X. *et al.* (2008). 'Beta-catenin deletion in hepatoblasts disrupts hepatic morphogenesis and survival during mouse development'. *Hepatol. Baltim. Md.* 47: 1667–1679.
282. Jungermann, K. & Katz, N. (1989). 'Functional specialization of different hepatocyte populations'. *Physiol. Rev.* 69: 708–764.
283. Burke, Z. D. *et al.* (2009). 'Liver zonation occurs through a beta-catenin-dependent, c-Myc-independent mechanism'. *Gastroenterology.* 136: 2316-2324.e1–3.
284. Kaestner, K. H. (2009). 'In the zone: how a hepatocyte knows where it is'. *Gastroenterology.* 137: 425–427.
285. Jones, E. A. *et al.* (2002). 'Hepatic Differentiation of Murine Embryonic Stem Cells'. *Exp. Cell Res.* 272: 15–22.
286. Rambhatla, L. *et al.* (2003). 'Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells'. *Cell Transplant.* 12: 1–11.
287. Hay, D. C. *et al.* (2008). 'Highly efficient differentiation of hESCs to functional hepatic endoderm requires ActivinA and Wnt3a signaling'. *PNAS.* 105: 12301–12306.
288. Naujok, O. *et al.* (2014). 'The Generation of Definitive Endoderm from Human Embryonic Stem Cells is Initially Independent from Activin A but Requires Canonical Wnt-Signaling'. *Stem Cell Rev. Rep.* 10: 480–493.
289. D'Amour, K. A. *et al.* (2005). 'Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm'. *Nat. Biotechnol.* 23: 1534–1541.
290. Agarwal, S. *et al.* (2008). 'Efficient differentiation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells'. *Stem Cells Dayt. Ohio.* 26: 1117–1127.
291. Shim, J. H. *et al.* (2007). 'Directed differentiation of human embryonic stem cells towards a pancreatic cell fate'. *Diabetologia.* 50: 1228–1238.
292. D'Amour, K. A. *et al.* (2006). 'Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells'. *Nat. Biotechnol.* 24: 1392–1401.
293. Kelly, O. G. *et al.* (2011). 'Cell-surface markers for the isolation of pancreatic cell types derived from human embryonic stem cells'. *Nat. Biotechnol.* 29: 750–756.

294. Kunisada, Y. *et al.* (2012). 'Small molecules induce efficient differentiation into insulin-producing cells from human induced pluripotent stem cells'. *Stem Cell Res.* 8: 274–284.
295. Matsuno, K. *et al.* (2016). 'Redefining definitive endoderm subtypes by robust induction of human induced pluripotent stem cells'. *Differentiation.*
296. Teo, A. K. K. *et al.* (2012). 'Activin and BMP4 synergistically promote formation of definitive endoderm in human embryonic stem cells'. *Stem Cells Dayt. Ohio.* 30: 631–642.
297. Vallier, L. *et al.* (2009). 'Early cell fate decisions of human embryonic stem cells and mouse epiblast stem cells are controlled by the same signalling pathways'. *PLoS One.* 4: e6082.
298. Xu, X. *et al.* (2011). 'Activin, BMP and FGF pathways cooperate to promote endoderm and pancreatic lineage cell differentiation from human embryonic stem cells'. *Mech. Dev.* 128: 412–427.
299. Touboul, T. *et al.* (2016). 'Stage-specific regulation of the WNT/ $\beta$ -catenin pathway enhances differentiation of hESCs into hepatocytes'. *J. Hepatol.* 64: 1315–1326.
300. Jiang, W. *et al.* (2013). 'WNT3 is a biomarker capable of predicting the definitive endoderm differentiation potential of hESCs'. *Stem Cell Rep.* 1: 46–52.
301. Ninomiya, H. *et al.* (2015). 'Improved efficiency of definitive endoderm induction from human induced pluripotent stem cells in feeder and serum-free culture system'. *Vitro Cell. Dev. Biol. - Anim.* 51: 1–8.
302. McLean, A. B. *et al.* (2007). 'Activin efficiently specifies definitive endoderm from human embryonic stem cells only when phosphatidylinositol 3-kinase signaling is suppressed'. *Stem Cells Dayt. Ohio.* 25: 29–38.
303. Rashid, S. T. *et al.* (2010). 'Modeling inherited metabolic disorders of the liver using human induced pluripotent stem cells'. *J. Clin. Invest.* 120: 3127–3136.
304. Negishi, T. *et al.* (2010). 'Retinoic acid signaling positively regulates liver specification by inducing wnt2bb gene expression in medaka'. *Hepatol. Baltim. Md.* 51: 1037–1045.
305. Morris, S. A. *et al.* (2014). 'Dissecting engineered cell types and enhancing cell fate conversion via CellNet'. *Cell.* 158: 889–902.
306. Hay, D. C. *et al.* (2008). 'Efficient differentiation of hepatocytes from human embryonic stem cells exhibiting markers recapitulating liver development in vivo'. *Stem Cells Dayt. Ohio.* 26: 894–902.
307. Tanimizu, N. & Miyajima, A. (2004). 'Notch signaling controls hepatoblast differentiation by altering the expression of liver-enriched transcription factors'. *J. Cell Sci.* 117: 3165–3174.
308. Clotman, F. *et al.* (2005). 'Control of liver cell fate decision by a gradient of TGF beta signaling modulated by Onecut transcription factors'. *Genes Dev.* 19: 1849–1854.
309. Lv, L. *et al.* (2015). 'Self-renewal of hepatoblasts under chemically defined conditions by iterative growth factor and chemical screening'. *Hepatology.* 61: 337–347.
310. Pelletier, R. D. *et al.* (2013). 'Application of a substrate cocktail approach in the assessment of cytochrome P450 induction using cultured human hepatocytes'. *J. Biomol. Screen.* 18: 199–210.
311. Baxter, M. *et al.* (2015). 'Phenotypic and functional analyses show stem cell-derived hepatocyte-like cells better mimic fetal rather than adult hepatocytes'. *J. Hepatol.* 62: 581–589.
312. Fitzpatrick, E. *et al.* (2015). 'Coculture with mesenchymal stem cells results in improved viability and function of human hepatocytes'. *Cell Transplant.* 24: 73–83.
313. Bale, S. S. *et al.* (2015). 'Long-term coculture strategies for primary hepatocytes and liver sinusoidal endothelial cells'. *Tissue Eng. Part C Methods.* 21: 413–422.
314. Lange, C. *et al.* (2006). 'Hepatocytic differentiation of mesenchymal stem cells in cocultures with fetal liver cells'. *World J. Gastroenterol.* 12: 2394–2397.
315. Yu, Y.-D. *et al.* (2011). 'Hepatic differentiation from human embryonic stem cells using stromal cells'. *J. Surg. Res.* 170: e253-261.
316. Javed, M. S. *et al.* (2014). 'Generation of hepatocyte-like cells from human induced pluripotent stem (iPS) cells by co-culturing embryoid body cells with liver non-parenchymal cell line TWNT-1'. *J. Coll. Physicians Surg.--Pak. JCPSP.* 24: 91–96.

317. Kim, Y. *et al.* (2010). 'A comparative study of genome-wide transcriptional profiles of primary hepatocytes in collagen sandwich and monolayer cultures'. *Tissue Eng. Part C Methods*. 16: 1449–1460.
318. Page, J. L. *et al.* (2007). 'Gene expression profiling of extracellular matrix as an effector of human hepatocyte phenotype in primary cell culture'. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 97: 384–397.
319. Moghe, P. V. *et al.* (1996). 'Culture matrix configuration and composition in the maintenance of hepatocyte polarity and function'. *Biomaterials*. 17: 373–385.
320. Schyschka, L. *et al.* (2013). 'Hepatic 3D cultures but not 2D cultures preserve specific transporter activity for acetaminophen-induced hepatotoxicity'. *Arch. Toxicol.* 87: 1581–1593.
321. Hamilton, G. A. *et al.* (2001). 'Regulation of cell morphology and cytochrome P450 expression in human hepatocytes by extracellular matrix and cell-cell interactions'. *Cell Tissue Res*. 306: 85–99.
322. Treyer, A. & Müsch, A. (2013). 'Hepatocyte polarity'. *Compr. Physiol.* 3: 243–287.
323. Novik, E. I. *et al.* (2008). 'Augmentation of EB-directed hepatocyte-specific function via collagen sandwich and SNAP'. *Biotechnol. Prog.* 24: 1132–1141.
324. Lawton, B. R. *et al.* (2013). 'Effect of a matrigel sandwich on endodermal differentiation of human embryonic stem cells'. *Stem Cell Rev.* 9: 578–585.
325. Palakkan, A. *et al.* (2015). 'Polarisation and functional characterisation of hepatocytes derived from human embryonic and mesenchymal stem cells'. *Biomed. Rep.*
326. Klebe, R. (1988). 'Cytoscribing: A method for micropositioning cells and the construction of two- and three-dimensional synthetic tissues'. *Exp. Cell Res.* 179: 362–373.
327. Boland, T. *et al.* (2006). 'Application of inkjet printing to tissue engineering'. *Biotechnol. J.* 1: 910–917.
328. Matsusaki, M. *et al.* (2013). 'Three-dimensional human tissue chips fabricated by rapid and automatic inkjet cell printing'. *Adv. Healthc. Mater.* 2: 534–539.
329. Faulkner-Jones, A. *et al.* (2015). 'Bioprinting of human pluripotent stem cells and their directed differentiation into hepatocyte-like cells for the generation of mini-livers in 3D'. *Biofabrication*. 7: 044102.
330. Ma, X. *et al.* (2016). 'Deterministically patterned biomimetic human iPSC-derived hepatic model via rapid 3D bioprinting'. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113: 2206–2211.
331. Kang, Y. B. A. *et al.* (2015). 'Liver sinusoid on a chip: Long-term layered co-culture of primary rat hepatocytes and endothelial cells in microfluidic platforms'. *Biotechnol. Bioeng.* 112: 2571–2582.
332. van Midwoud, P. M. *et al.* (2010). 'A microfluidic approach for in vitro assessment of interorgan interactions in drug metabolism using intestinal and liver slices'. *Lab. Chip*. 10: 2778–2786.
333. Zheng, W. *et al.* (2012). 'A microfluidic flow-stretch chip for investigating blood vessel biomechanics'. *Lab. Chip*. 12: 3441–3450.
334. Sivaraman, A. *et al.* (2005). 'A microscale in vitro physiological model of the liver: predictive screens for drug metabolism and enzyme induction'. *Curr. Drug Metab.* 6: 569–591.
335. Vinci, B. *et al.* (2011). 'Modular bioreactor for primary human hepatocyte culture: medium flow stimulates expression and activity of detoxification genes'. *Biotechnol. J.* 6: 554–564.
336. Leclerc, E. *et al.* (2017). 'Comparison of the transcriptomic profile of hepatic human induced pluripotent stem like cells cultured in plates and in a 3D microscale dynamic environment'. *Genomics*. 109: 16–26.
337. Bell, C. C. *et al.* (2016). 'Characterization of primary human hepatocyte spheroids as a model system for drug-induced liver injury, liver function and disease'. *Sci. Rep.* 6: 25187.
338. Ohkura, T. *et al.* (2014). 'Evaluation of human hepatocytes cultured by three-dimensional spheroid systems for drug metabolism'. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 29: 373–378.
339. Sengupta, S. *et al.* (2014). 'Aggregate culture of human embryonic stem cell-derived hepatocytes in suspension are an improved in vitro model for drug metabolism and toxicity testing'. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 140: 236–245.
340. Chang, T. T. & Hughes-Fulford, M. (2014). 'Molecular mechanisms underlying the enhanced functions of three-dimensional hepatocyte aggregates'. *Biomaterials*. 35: 2162–2171.

341. Bhise, N. S. *et al.* (2016). 'A liver-on-a-chip platform with bioprinted hepatic spheroids'. *Biofabrication*. 8: 014101.
342. Gevaert, E. *et al.* (2014). 'High throughput micro-well generation of hepatocyte micro-aggregates for tissue engineering'. *PLoS One*. 9: e105171.
343. Li, C. Y. *et al.* (2014). 'Micropatterned cell-cell interactions enable functional encapsulation of primary hepatocytes in hydrogel microtissues'. *Tissue Eng. Part A*. 20: 2200–2212.
344. Malinen, M. M. *et al.* (2014). 'Differentiation of liver progenitor cell line to functional organotypic cultures in 3D nanofibrillar cellulose and hyaluronan-gelatin hydrogels'. *Biomaterials*. 35: 5110–5121.
345. Kim, J. H. *et al.* (2015). 'Enhanced Metabolizing Activity of Human ES Cell-Derived Hepatocytes Using a 3D Culture System with Repeated Exposures to Xenobiotics'. *Toxicol. Sci. Off. J. Soc. Toxicol.* 147: 190–206.
346. Schepers, A. *et al.* (2016). 'Engineering a perfusable 3D human liver platform from iPS cells'. *Lab. Chip*. 16: 2644–2653.
347. Lancaster, M. A. & Knoblich, J. A. (2014). 'Generation of cerebral organoids from human pluripotent stem cells'. *Nat. Protoc.* 9: 2329–2340.
348. Takebe, T. *et al.* (2012). 'Self-organization of human hepatic organoid by recapitulating organogenesis in vitro'. *Transplant. Proc.* 44: 1018–1020.
349. Abu-Absi, S. F. *et al.* (2004). 'Three-dimensional co-culture of hepatocytes and stellate cells'. *Cytotechnology*. 45: 125–140.
350. Thomas, R. J. *et al.* (2005). 'The effect of three-dimensional co-culture of hepatocytes and hepatic stellate cells on key hepatocyte functions in vitro'. *Cells Tissues Organs*. 181: 67–79.
351. Riccalton-Banks, L. *et al.* (2003). 'Long-term culture of functional liver tissue: three-dimensional coculture of primary hepatocytes and stellate cells'. *Tissue Eng.* 9: 401–410.
352. Takebe, T. *et al.* (2013). 'Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant'. *Nature*. 499: 481–484.
353. Strick-Marchand, H. *et al.* (2015). 'A novel mouse model for stable engraftment of a human immune system and human hepatocytes'. *PLoS One*. 10: e0119820.
354. Tolosa, L. *et al.* (2015). 'Transplantation of hESC-derived hepatocytes protects mice from liver injury'. *Stem Cell Res. Ther.* 6: 246.
355. Rashid, S. T. *et al.* (2010). 'Modeling inherited metabolic disorders of the liver using human induced pluripotent stem cells'. *J. Clin. Invest.* 120: 3127–3136.
356. Si-Tayeb, K. *et al.* (2016). 'Urine-sample-derived human induced pluripotent stem cells as a model to study PCSK9-mediated autosomal dominant hypercholesterolemia'. *Dis. Model. Mech.* 9: 81–90.
357. Satoh, D. *et al.* (2013). 'Establishment and directed differentiation of induced pluripotent stem cells from glycogen storage disease type Ib patient'. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* 18: 1053–1069.
358. Rosner, F. (1994). 'Hemophilia in classic rabbinic texts'. *J. Hist. Med. Allied Sci.* 49: 240–250.
359. Otto, J. C. (1803). 'An account of an hemorrhagic disposition existing in certain families'. *Med. Repos.* 6:
360. Nasse, C. F. (1820). 'Von einer erblichen neigung zu todtlichen blutungen'. *Arch Med Erfahr.*
361. Pavlovsky, A. (1947). 'Contribution to the pathogenesis of hemophilia'. *Blood*. 2: 185–191.
362. Lannoy, N. & Hermans, C. (2010). 'The "royal disease"--haemophilia A or B? A haematological mystery is finally solved'. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* 16: 843–847.
363. Aronova-Tiuntseva, Y. & Herreid, C. (1999). 'Hemophilia: "the Royal disease"'. *Natl. Cent. Case Study Teach. Sci.*
364. Bolton-Maggs, P. H. & Pasi, K. J. (2003). 'Haemophilias A and B'. *The Lancet*. 361: 1801–1809.
365. Esquilin, J. M. *et al.* (2012). 'Female factor IX deficiency due to maternally inherited X-inactivation'. *Clin. Genet.* 82: 583–586.
366. Taylor, S. A. *et al.* (1991). 'Somatic mosaicism and female-to-female transmission in a kindred with hemophilia B (factor IX deficiency)'. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88: 39–42.

367. Kurachi, K. & Davie, E. W. (1982). 'Isolation and characterization of a cDNA coding for human factor IX'. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79: 6461–6464.
368. Hamasaki-Katagiri, N. *et al.* (2012). 'Analysis of F9 point mutations and their correlation to severity of haemophilia B disease'. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* 18: 933–940.
369. Koeberl, D. D. *et al.* (1989). 'Functionally important regions of the factor IX gene have a low rate of polymorphism and a high rate of mutation in the dinucleotide CpG'. *Am. J. Hum. Genet.* 45: 448–457.
370. Rallapalli, P. M. *et al.* (2013). 'An interactive mutation database for human coagulation factor IX provides novel insights into the phenotypes and genetics of hemophilia B'. *J. Thromb. Haemost. JTH.* 11: 1329–1340.
371. Wilcox, J. N. *et al.* (1989). 'Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque'. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86: 2839–2843.
372. Banner, D. W. *et al.* (1996). 'The crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIIa with soluble tissue factor'. *Nature.* 380: 41–46.
373. Schmidt, A. E. & Bajaj, S. P. (2003). 'Structure-function relationships in factor IX and factor IXa'. *Trends Cardiovasc. Med.* 13: 39–45.
374. Giannelli, F. *et al.* (1998). 'Haemophilia B: database of point mutations and short additions and deletions--eighth edition'. *Nucleic Acids Res.* 26: 265–268.
375. Stafford, D. W. (2016). 'Extravascular FIX and coagulation'. *Thromb. J.* 14:
376. Brandstetter, H. & Bauer, M. (1995). 'X-ray structure of clotting factor IXa: Active site and module structure related to Xase activity and hemophilia B'. *Proc Natl Acad Sci.* 92: 9796–9800.
377. Stenflo, J. (1999). 'Contributions of Gla and EGF-like domains to the function of vitamin K-dependent coagulation factors'. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 9: 59–88.
378. Blanchette, V. S. (2010). 'Prophylaxis in the haemophilia population'. *Haemophilia.* 16: 181–188.
379. (2013). 'The Hemophilia Market: Steep but Surmountable Barriers for New Entrants'. *Morningstar Healthcare Observer.*
380. Shapiro, A. D. *et al.* (2005). 'The safety and efficacy of recombinant human blood coagulation factor IX in previously untreated patients with severe or moderately severe hemophilia B'. *Blood.* 105: 518–525.
381. O'Hara, J. *et al.* (2017). 'The cost of severe haemophilia in Europe: the CHES study'. *Orphanet J. Rare Dis.* 12: 106.
382. Bon, A. *et al.* (2015). 'Desensitization and immune tolerance induction in children with severe factor IX deficiency; inhibitors and adverse reactions to replacement therapy: a case-report and literature review'. *Ital. J. Pediatr.* 41: 12.
383. DiMichele, D. (2007). 'Inhibitor development in haemophilia B: an orphan disease in need of attention'. *Br. J. Haematol.* 138: 305–315.
384. Mannucci, P. M. & Franchini, M. (2014). 'Emerging drugs for hemophilia B'. *Expert Opin. Emerg. Drugs.* 19: 407–414.
385. Peters, R. T. *et al.* (2010). 'Prolonged activity of factor IX as a monomeric Fc fusion protein'. *Blood.* 115: 2057–2064.
386. Powell, J. S. *et al.* (2013). 'Phase 3 study of recombinant factor IX Fc fusion protein in hemophilia B'. *N. Engl. J. Med.* 369: 2313–2323.
387. (2014). 'FDA Approves Biogen Idec's ALPROLIX™, the First Hemophilia B Therapy to Reduce Bleeding Episodes with Prophylactic Infusions Starting at Least a Week Apart'. *Biogen Idec press release.*
388. Østergaard, H. *et al.* (2011). 'Prolonged half-life and preserved enzymatic properties of factor IX selectively PEGylated on native N-glycans in the activation peptide'. *Blood.* 118: 2333–2341.
389. Negrier, C. *et al.* (2011). 'Enhanced pharmacokinetic properties of a glycoPEGylated recombinant factor IX: a first human dose trial in patients with hemophilia B'. *Blood.* 118: 2695–2701.
390. Cooley, B. *et al.* (2016). 'Prophylactic efficacy of BeneFIX vs Alprolix in hemophilia B mice'. *Blood.* 128: 286–292.

391. Cheung, W. F. *et al.* (1996). 'Identification of the endothelial cell binding site for factor IX'. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 11068–11073.
392. Gui, T. *et al.* (2009). 'Abnormal hemostasis in a knock-in mouse carrying a variant of factor IX with impaired binding to collagen type IV'. *J. Thromb. Haemost. JTH.* 7: 1843–1851.
393. Kavakli, K. *et al.* (2016). 'Once-weekly prophylactic treatment vs. on-demand treatment with nonacog alfa in patients with moderately severe to severe haemophilia B'. *Haemoph. Off. J. World Fed. Hemoph.* 22: 381–388.
394. Lowman, A. M. *et al.* (1999). 'Oral delivery of insulin using pH-responsive complexation gels'. *J. Pharm. Sci.* 88: 933–937.
395. Horava, S. D. & Peppas, N. A. (2016). 'Design of pH-Responsive Biomaterials to Enable the Oral Route of Hematological Factor IX'. *Ann. Biomed. Eng.* 44: 1970–1982.
396. Biffi, A. *et al.* (2013). 'Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy'. *Science.* 341: 1233158.
397. Aiuti, A. *et al.* (2013). 'Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome'. *Science.* 341: 1233151.
398. Zsebo, K. *et al.* (2014). 'Long-term effects of AAV1/SERCA2a gene transfer in patients with severe heart failure: analysis of recurrent cardiovascular events and mortality'. *Circ. Res.* 114: 101–108.
399. Walsh, C. E. & Batt, K. M. (2013). 'Hemophilia clinical gene therapy: brief review'. *Transl. Res. J. Lab. Clin. Med.* 161: 307–312.
400. Kay, M. A. *et al.* (2000). 'Evidence for gene transfer and expression of factor IX in haemophilia B patients treated with an AAV vector'. *Nat. Genet.* 24: 257–261.
401. Manno, C. S. *et al.* (2003). 'AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B'. *Blood.* 101: 2963–2972.
402. Manno, C. S. *et al.* (2006). 'Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response'. *Nat. Med.* 12: 342–347.
403. Mingozzi, F. & High, K. A. (2007). 'Immune responses to AAV in clinical trials'. *Curr. Gene Ther.* 7: 316–324.
404. Gao, G.-P. *et al.* (2002). 'Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy'. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99: 11854–11859.
405. Nathwani, A. C. *et al.* (2006). 'Self-complementary adeno-associated virus vectors containing a novel liver-specific human factor IX expression cassette enable highly efficient transduction of murine and nonhuman primate liver'. *Blood.* 107: 2653–2661.
406. Nathwani, A. C. *et al.* (2007). 'Safe and efficient transduction of the liver after peripheral vein infusion of self-complementary AAV vector results in stable therapeutic expression of human FIX in nonhuman primates'. *Blood.* 109: 1414–1421.
407. Nathwani, A. C. *et al.* (2011). 'Adenovirus-Associated Virus Vector-Mediated Gene Transfer in Hemophilia B'. *N. Engl. J. Med.* 365: 2357–2365.
408. Nathwani, A. C. *et al.* (2014). 'Long-Term Safety and Efficacy of Factor IX Gene Therapy in Hemophilia B'. *N. Engl. J. Med.* 371: 1994–2004.
409. High, K. A. (2012). 'The gene therapy journey for hemophilia: are we there yet?' *Blood.* 120: 4482–4487.
410. Hortelano, G. *et al.* (1996). 'Delivery of human factor IX in mice by encapsulated recombinant myoblasts: a novel approach towards allogeneic gene therapy of hemophilia B'. *Blood.* 87: 5095–5103.
411. Qiu, X. *et al.* (1996). 'Implantation of autologous skin fibroblast genetically modified to secrete clotting factor IX partially corrects the hemorrhagic tendencies in two hemophilia B patients'. *Chin. Med. J. (Engl.)*. 109: 832–839.
412. Watanabe, N. *et al.* (2013). 'Genetically modified adipose tissue-derived stem/stromal cells, using simian immunodeficiency virus-based lentiviral vectors, in the treatment of hemophilia B'. *Hum. Gene Ther.* 24: 283–294.

413. Chen, Y. *et al.* (2014). 'Platelet gene therapy by lentiviral gene delivery to hematopoietic stem cells restores hemostasis and induces humoral immune tolerance in FIX(null) mice'. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 22: 169–177.
414. Fair, J. H. *et al.* (2005). 'Correction of factor IX deficiency in mice by embryonic stem cells differentiated in vitro'. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102: 2958–2963.
415. Lyu, C. *et al.* (2017). 'The State of Skewed X Chromosome Inactivation is Retained in the Induced Pluripotent Stem Cells from a Female with Hemophilia B'. *Stem Cells Dev.* 26: 1003–1011.
416. Porteus, M. H. & Baltimore, D. (2003). 'Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells'. *Science.* 300: 763.
417. Klug, A. (2010). 'The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation'. *Annu. Rev. Biochem.* 79: 213–231.
418. Kim, Y. G. *et al.* (1996). 'Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain'. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 1156–1160.
419. Li, H. *et al.* (2011). 'In vivo genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia'. *Nature.* 475: 217–221.
420. Anguela, X. M. *et al.* (2013). 'Robust ZFN-mediated genome editing in adult hemophilic mice'. *Blood.* 122: 3283–3287.
421. Guo, J. *et al.* (2010). 'Directed Evolution of an Enhanced and Highly Efficient FokI Cleavage Domain for Zinc Finger Nucleases'. *J. Mol. Biol.* 400: 96–107.
422. Schierling, B. *et al.* (2012). 'A novel zinc-finger nuclease platform with a sequence-specific cleavage module'. *Nucleic Acids Res.* 40: 2623–2638.
423. Christian, M. *et al.* (2010). 'Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases'. *Genetics.* 186: 757–761.
424. Bogdanove, A. J. *et al.* (2010). 'TAL effectors: finding plant genes for disease and defense'. *Curr. Opin. Plant Biol.* 13: 394–401.
425. Boch, J. *et al.* (2009). 'Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors'. *Science.* 326: 1509–1512.
426. Park, C.-Y. *et al.* (2014). 'Targeted inversion and reversion of the blood coagulation factor 8 gene in human iPSCs using TALENs'. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111: 9253–9258.
427. Wu, Y. *et al.* (2016). 'In situ genetic correction of F8 intron 22 inversion in hemophilia A patient-specific iPSCs'. *Sci. Rep.* 6: 18865.
428. Bjelke, B. *et al.* (1988). 'Survival of adenohipophyseal homologous transplants in the rat striatum associated with prolactin-like immunoreactivity in the surrounding neuropil of the striatum'. *Neurosci. Lett.* 93: 139–145.
429. Valton, J. *et al.* (2012). 'Overcoming Transcription Activator-like Effector (TALE) DNA Binding Domain Sensitivity to Cytosine Methylation'. *J. Biol. Chem.* 287: 38427–38432.
430. Sharma, R. *et al.* (2015). 'In vivo genome editing of the albumin locus as a platform for protein replacement therapy'. *Blood.* 126: 1777–1784.
431. Yang, L. *et al.* (Humana Press, 2014). in *Gene Correction.* (ed. Storici, F.) 1114: 245–267.
432. Deltcheva, E. *et al.* (2011). 'CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III'. *Nature.* 471: 602–607.
433. Cho, S. W. *et al.* (2013). 'Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease'. *Nat. Biotechnol.* 31: 230–232.
434. Beumer, K. J. *et al.* (2013). 'Comparing Zinc Finger Nucleases and Transcription Activator-Like Effector Nucleases for Gene Targeting in Drosophila'. *G3amp58 GenesGenomesGenetics.* 3: 1717–1725.
435. Ding, Q. *et al.* (2013). 'Enhanced Efficiency of Human Pluripotent Stem Cell Genome Editing through Replacing TALENs with CRISPRs'. *Cell Stem Cell.* 12: 393–394.
436. Guan, Y. *et al.* (2016). 'CRISPR/Cas9-mediated somatic correction of a novel coagulator factor IX gene mutation ameliorates hemophilia in mouse'. *EMBO Mol. Med.* 8: 477–488.
437. Ohmori, T. *et al.* (2017). 'CRISPR/Cas9-mediated genome editing via postnatal administration of AAV vector cures haemophilia B mice'. *Sci. Rep.* 7:

438. Ramírez, L. *et al.* (2010). 'The "royal disease" mutation in a Spanish patient'. *J. Thromb. Haemost. JTH.* 8: 2316–2317.
439. Rogaev, E. I. *et al.* (2009). 'Genotype analysis identifies the cause of the "royal disease"'. *Science.* 326: 817.
440. Giorgetti, A. *et al.* (2010). 'Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood cells with only two factors: Oct4 and Sox2'. *Nat. Protoc.* 5: 811–820.
441. Dianat, N. *et al.* (2014). 'Generation of functional cholangiocyte-like cells from human pluripotent stem cells and HepaRG cells'. *Hepatology.* 60: 700–714.
442. Kurachi, S. *et al.* (1995). 'Role of intron I in expression of the human factor IX gene'. *J. Biol. Chem.* 270: 5276–5281.
443. Simioni, P. *et al.* (2009). 'X-Linked Thrombophilia with a Mutant Factor IX (Factor IX Padua)'. *N. Engl. J. Med.* 361: 1671–1675.
444. Torres, R. *et al.* (2014). 'An integration-defective lentivirus-based resource for site-specific targeting of an edited safe-harbour locus in the human genome'. *Gene Ther.* 21: 343–352.
445. Subramanian, K. *et al.* (2014). 'Spheroid culture for enhanced differentiation of human embryonic stem cells to hepatocyte-like cells'. *Stem Cells Dev.* 23: 124–131.
446. Messina, A. *et al.* (2017). 'Self-assembly of tissue spheroids on polymeric membranes'. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 11: 2090–2103.
447. Dagher, I. *et al.* (2006). 'Efficient Hepatocyte Engraftment in a Nonhuman Primate Model After Partial Portal Vein Embolization'. *Transplantation.* 82: 1067–1073.
448. Dagher, I. *et al.* (2009). 'Efficient hepatocyte engraftment and long-term transgene expression after reversible portal embolization in nonhuman primates'. *Hepatology.* 49: 950–959.
449. Yu, J. *et al.* (2009). 'Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences'. *Science.* 324: 797–801.
450. Piao, Y. *et al.* (2014). 'Efficient generation of integration-free human induced pluripotent stem cells from keratinocytes by simple transfection of episomal vectors'. *Stem Cells Transl. Med.* 3: 787–791.
451. Yagi, T. *et al.* (2011). 'Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells'. *Hum. Mol. Genet.* 20: 4530–4539.
452. HD iPSC Consortium. (2012). 'Induced pluripotent stem cells from patients with Huntington's disease show CAG-repeat-expansion-associated phenotypes'. *Cell Stem Cell.* 11: 264–278.
453. Brennand, K. J. *et al.* (2011). 'Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells'. *Nature.* 473: 221–225.
454. Chen, H. *et al.* (2014). 'Modeling ALS with iPSCs Reveals that Mutant SOD1 Misregulates Neurofilament Balance in Motor Neurons'. *Cell Stem Cell.* 14: 796–809.
455. Williams, E. C. *et al.* (2014). 'Mutant astrocytes differentiated from Rett syndrome patients-specific iPSCs have adverse effects on wild-type neurons'. *Hum. Mol. Genet.* 23: 2968–2980.
456. Stepniewski, J. *et al.* (2015). 'Induced pluripotent stem cells as a model for diabetes investigation'. *Sci. Rep.* 5: 8597.
457. Cayo, M. A. *et al.* (2012). 'JD induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes faithfully recapitulate the pathophysiology of familial hypercholesterolemia'. *Hepatol. Baltim. Md.* 56: 2163–2171.
458. Ghodsizadeh, A. *et al.* (2010). 'Generation of liver disease-specific induced pluripotent stem cells along with efficient differentiation to functional hepatocyte-like cells'. *Stem Cell Rev.* 6: 622–632.
459. Jia, B. *et al.* (2014). 'Modeling of hemophilia A using patient-specific induced pluripotent stem cells derived from urine cells'. *Life Sci.* 108: 22–29.
460. Park, C.-Y. *et al.* (2015). 'Functional Correction of Large Factor VIII Gene Chromosomal Inversions in Hemophilia A Patient-Derived iPSCs Using CRISPR-Cas9'. *Cell Stem Cell.* 17: 213–220.
461. Pang, J. *et al.* (2016). 'Targeting of the human F8 at the multicopy rDNA locus in Hemophilia A patient-derived iPSCs using TALENICKases'. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 472: 144–149.

462. He, Q. *et al.* (2017). 'Genetic Correction and Hepatic Differentiation of Hemophilia B-specific Human Induced Pluripotent Stem Cells'. *Chin. Med. Sci. J. Chung-Kuo Hsueh Ko Hsueh Tsa Chih.* 32: 135–144.
463. Lefèvre, C. *et al.* (2010). 'Premature senescence of vascular cells is induced by HIV protease inhibitors: implication of prelamin A and reversion by statin'. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30: 2611–2620.
464. Caron, M. *et al.* (2007). 'Human lipodystrophies linked to mutations in A-type lamins and to HIV protease inhibitor therapy are both associated with prelamin A accumulation, oxidative stress and premature cellular senescence'. *Cell Death Differ.* 14: 1759–1767.
465. Zuo, B. *et al.* (2012). 'Influences of lamin A levels on induction of pluripotent stem cells'. *Biol. Open.* 1: 1118–1127.
466. Kleinstiver, B. P. *et al.* (2015). 'Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities'. *Nature.* 523: 481–485.
467. Zetsche, B. *et al.* (2015). 'Cpf1 Is a Single RNA-Guided Endonuclease of a Class 2 CRISPR-Cas System'. *Cell.* 163: 759–771.
468. Trevino, A. E. & Zhang, F. (Elsevier, 2014). in *Methods in Enzymology.* 546: 161–174.
469. Fu, Y. *et al.* (2014). 'Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs'. *Nat. Biotechnol.* 32: 279–284.
470. Ran, F. A. *et al.* (2015). 'In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9'. *Nature.* 520: 186–191.
471. Lakich, D. *et al.* (1993). 'Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A'. *Nat. Genet.* 5: 236–241.
472. Nishida, K. *et al.* (2016). 'Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems'. *Science.* 353: aaf8729-aaf8729.
473. Shimatani, Z. *et al.* (2017). 'Targeted base editing in rice and tomato using a CRISPR-Cas9 cytidine deaminase fusion'. *Nat. Biotechnol.* 35: 441–443.
474. Cho, S. W. *et al.* (2014). 'Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases'. *Genome Res.* 24: 132–141.
475. Gabriel, R. *et al.* (2011). 'An unbiased genome-wide analysis of zinc-finger nuclease specificity'. *Nat. Biotechnol.* 29: 816–823.
476. Pattanayak, V. *et al.* (2011). 'Revealing off-target cleavage specificities of zinc-finger nucleases by in vitro selection'. *Nat. Methods.* 8: 765–770.
477. Ding, X. *et al.* (2008). 'Localization and cellular distribution of CPNE5 in embryonic mouse brain'. *Brain Res.* 1224: 20–28.
478. Dong, D. *et al.* (2017). 'Structural basis of CRISPR-SpyCas9 inhibition by an anti-CRISPR protein'. *Nature.* 546: 436–439.
479. Chen, Z. *et al.* (2016). 'Generation of functional hepatocytes from human spermatogonial stem cells'. *Oncotarget.* 7: 8879–8895.
480. Huang, P. *et al.* (2011). 'Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors'. *Nature.* 475: 386–389.
481. Sekiya, S. & Suzuki, A. (2011). 'Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors'. *Nature.* 475: 390–393.
482. Guo, R. *et al.* (2017). 'Chemical Cocktails Enable Hepatic Reprogramming of Mouse Fibroblasts with a Single Transcription Factor'. *Stem Cell Rep.* 9: 499–512.
483. Kang, K. *et al.* (2017). 'Three-dimensional bio-printing of hepatic structures with direct-converted hepatocyte-like cells'. *Tissue Eng. Part A.*
484. Huang, P. *et al.* (2014). 'Direct Reprogramming of Human Fibroblasts to Functional and Expandable Hepatocytes'. *Cell Stem Cell.* 14: 370–384.
485. Shi, X.-L. *et al.* (2016). 'Improved survival of porcine acute liver failure by a bioartificial liver device implanted with induced human functional hepatocytes'. *Cell Res.* 26: 206–216.
486. Shafa, M. *et al.* (2012). 'Expansion and long-term maintenance of induced pluripotent stem cells in stirred suspension bioreactors'. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 6: 462–472.

487. Tigges, J. *et al.* (2014). 'The hallmarks of fibroblast ageing'. *Mech. Ageing Dev.* 138: 26–44.
488. Wallin, R. & Hutson, S. M. (1991). 'Dexamethasone stimulates vitamin K-dependent carboxylase activity in neonatal rats and cultured fetal hepatocytes'. *Pediatr. Res.* 30: 281–285.
489. Hassan, H. J. *et al.* (1990). 'Blood coagulation factors in human embryonic-fetal development: preferential expression of the FVII/tissue factor pathway'. *Blood.* 76: 1158–1164.
490. Gieseck, R. L. *et al.* (2014). 'Maturation of induced pluripotent stem cell derived hepatocytes by 3D-culture'. *PLoS One.* 9: e86372.
491. Sant, S. & Johnston, P. A. (2017). 'The production of 3D tumor spheroids for cancer drug discovery'. *Drug Discov. Today Technol.* 23: 27–36.
492. Zhang, D. *et al.* (2014). 'A 3D Alzheimer's disease culture model and the induction of P21-activated kinase mediated sensing in iPSC derived neurons'. *Biomaterials.* 35: 1420–1428.
493. Topouzi, H. *et al.* (2017). 'Methods for the isolation and 3D culture of dermal papilla cells from human hair follicles'. *Exp. Dermatol.* 26: 491–496.
494. Santi, P. A. (2011). 'Light sheet fluorescence microscopy: a review'. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 59: 129–138.
495. Campbell, I. M. *et al.* (2015). 'Somatic mosaicism: implications for disease and transmission genetics'. *Trends Genet.* 31: 382–392.
496. Ruiz, S. *et al.* (2012). 'Identification of a specific reprogramming-associated epigenetic signature in human induced pluripotent stem cells'. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109: 16196–16201.
497. Amps, K. *et al.* (2011). 'Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage'. *Nat. Biotechnol.* 29: 1132–1144.
498. Garitaonandia, I. *et al.* (2015). 'Increased Risk of Genetic and Epigenetic Instability in Human Embryonic Stem Cells Associated with Specific Culture Conditions'. *PLOS ONE.* 10: e0118307.
499. Corrales, N. L. L. *et al.* (2012). 'Copy number variations (CNVs) in human pluripotent cell-derived neuroprogenitors'. *Gene.* 506: 377–379.
500. MacDonald, J. R. *et al.* (2014). 'The Database of Genomic Variants: a curated collection of structural variation in the human genome'. *Nucleic Acids Res.* 42: D986–D992.
501. McLaren, W. *et al.* (2016). 'The Ensembl Variant Effect Predictor'. *Genome Biol.* 17:
502. Narva, E. (2012). 'PLURIPOTENCY AND GENETIC STABILITY OF HUMAN PLURIPOTENT STEM CELLS'.
503. Weber, A. *et al.* (2010). 'Human foetal hepatocytes: isolation, characterization, and transplantation'. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ.* 640: 41–55.
504. Sehgal, A. *et al.* (2015). 'An RNAi therapeutic targeting antithrombin to rebalance the coagulation system and promote hemostasis in hemophilia'. *Nat. Med.* 21: 492–497.
505. Nowrouzi, A. *et al.* (2012). 'Integration Frequency and Intermolecular Recombination of rAAV Vectors in Non-human Primate Skeletal Muscle and Liver'. *Mol. Ther.* 20: 1177–1186.
506. Li, H. *et al.* (2011). 'Assessing the potential for AAV vector genotoxicity in a murine model'. *Blood.* 117: 3311–3319.
507. Nathwani, A. C. *et al.* (2014). 'Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B'. *N. Engl. J. Med.* 371: 1994–2004.
508. Patel, N. *et al.* (2014). 'Progress towards gene therapy for haemophilia B'. *Int. J. Hematol.* 99: 372–376.
509. Lee, K. *et al.* (2017). 'Nanoparticle delivery of Cas9 ribonucleoprotein and donor DNA in vivo induces homology-directed DNA repair'. *Nat. Biomed. Eng.*
510. Mandai, M. *et al.* (2017). 'Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration'. *N. Engl. J. Med.* 376: 1038–1046.
511. Rim, Y. A. *et al.* (2017). 'Recent Progress of National Banking Project on Homozygous HLA-typed Induced Pluripotent Stem Cells in South Korea'. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*
512. Okita, K. *et al.* (2011). 'A more efficient method to generate integration-free human iPS cells'. *Nat. Methods.* 8: 409–412.
513. Nakatsuji, N. *et al.* (2008). 'HLA-haplotype banking and iPS cells'. *Nat. Biotechnol.* 26: 739–740.

514. Taylor, C. J. *et al.* (2012). 'Generating an iPSC bank for HLA-matched tissue transplantation based on known donor and recipient HLA types'. *Cell Stem Cell*. 11: 147–152.
515. Gourraud, P.-A. *et al.* (2012). 'The role of human leukocyte antigen matching in the development of multiethnic "haplobank" of induced pluripotent stem cell lines'. *Stem Cells Dayt. Ohio*. 30: 180–186.
516. Takebe, T. *et al.* (2014). 'Generation of a vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant'. *Nat. Protoc.* 9: 396–409.
517. Rodriguez, E. (2016). 'Ethical Issues in Genome Editing using Crispr/Cas9 System'. *J. Clin. Res. Bioeth.* 07:
518. Tang, L. *et al.* (2017). 'CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human zygotes using Cas9 protein'. *Mol. Genet. Genomics*. 292: 525–533.
519. Ma, H. *et al.* (2017). 'Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos'. *Nature*. 548: 413–419.
520. Harrison, S. E. *et al.* (2017). 'Assembly of embryonic and extraembryonic stem cells to mimic embryogenesis in vitro'. *Science*. 356: eaal1810.

# ANNEXES

---

## Articles publiés non présentés dans le manuscrit

- Messenger RNA- versus retrovirus-based iPSC reprogramming strategies: analysis of genomic integrity - Stem Cells Translational Medicine

Clara Steichen, [Eléonor Luce](#), Jérôme Maluenda, Lucie Tosca, Inmaculada Moreno-Gimeno, Christophe Desterke, Noushin Dianat, Sylvie Goulinet-Mainot, Sarah Awan-Toor, Deborah Burks, Joëlle Marie, Anne Weber, Gérard Tachdjian, Judith Melki, Anne Dubart-Kupperschmitt.

*Stem Cells Transl Med.* 2014 Jun; 3(6):686-91. doi: 10.5966/sctm.2013-0158 - Article de recherche

- An atypical hiPSC line with a complex, stable and balanced genomic rearrangement including a large de novo 1q uniparental disomy - Stem Cells Translational Medicine

Clara Steichen, Jérôme Maluenda\*, Lucie Tosca\*, [Eléonor Luce](#), Dominique Pineau, Noushin Dianat, Zara Hannoun, Gérard Tachdjian, Judith Melki, Anne Dubart-Kupperschmitt

\* co-authorship

*Stem Cells Transl Med.* 2015 Mar; 4(3):224-9. doi: 10.5966/sctm.2014-0186 - Article de recherche

## Article en cours de soumission non présenté dans le manuscrit

Soumis pour publication – Article de recherche :

- Low-Density Lipoprotein Receptor-deficient hepatocytes differentiated from induced pluripotent stem cells allow Familial Hypercholesterolemia modelling, CRISPR/Cas-mediated genetic correction, and productive hepatitis C virus infection

Jérôme Caron, Véronique Pène, Laia Tolosa, Maxime Villaret, [Eléonor Luce](#), Angélique Fourrier, Samir Saheb, Eric Bruckert, María José Gómez-Lechón, Arielle Rosenberg, Tuan Huy Nguyen, Anne Weber\*, Anne Dubart-Kupperschmitt\*

\* co-authorship

En préparation pour publication – Articles de revues

- The genomic integrity of human induced pluripotent stem cells (hiPSCs): from reprogramming to differentiation and its subsequent impact for hiPSC-based cell therapy

Clara Steichen, Zara Hannoun, [Eléonor Luce](#), Anne Dubart-Kupperschmitt

- Advanced protocols for pluripotent stem cell differentiation into hepatocytes: are we getting closer to the clinic?

[Eléonor Luce](#), Antonietta Messina, Anne Dubart-Kupperschmitt



## Messenger RNA- Versus Retrovirus-Based Induced Pluripotent Stem Cell Reprogramming Strategies: Analysis of Genomic Integrity

CLARA STEICHEN,<sup>a,b,c</sup> ELÉANOR LUCE,<sup>a,b,c</sup> JÉRÔME MALUENDA,<sup>d,\*</sup> LUCIE TOSCA,<sup>e,\*</sup>  
INMACULADA MORENO-GIMENO,<sup>f</sup> CHRISTOPHE DESTERKE,<sup>a,b,c</sup> NOUSHIN DIANAT,<sup>a,b,c</sup>  
SYLVIE GOULINET-MAINOT,<sup>a,b,c</sup> SARAH AWAN-TOOR,<sup>a,b,c</sup> DEBORAH BURKS,<sup>f</sup> JOËLLE MARIE,<sup>g</sup>  
ANNE WEBER,<sup>a,b,c</sup> GÉRARD TACHDJIAN,<sup>e</sup> JUDITH MELKI,<sup>d</sup> ANNE DUBART-KUPPERSCHMITT<sup>a,b,c</sup>

**Key Words.** iPSCs • mRNA reprogramming • Genome integrity • SNP/CNV analysis • Hepatic differentiation

### ABSTRACT

The use of synthetic messenger RNAs to generate human induced pluripotent stem cells (iPSCs) is particularly appealing for potential regenerative medicine applications, because it overcomes the common drawbacks of DNA-based or virus-based reprogramming strategies, including transgene integration in particular. We compared the genomic integrity of mRNA-derived iPSCs with that of retrovirus-derived iPSCs generated in strictly comparable conditions, by single-nucleotide polymorphism (SNP) and copy number variation (CNV) analyses. We showed that mRNA-derived iPSCs do not differ significantly from the parental fibroblasts in SNP analysis, whereas retrovirus-derived iPSCs do. We found that the number of CNVs seemed independent of the reprogramming method, instead appearing to be clone-dependent. Furthermore, differentiation studies indicated that mRNA-derived iPSCs differentiated efficiently into hepatoblasts and that these cells did not load additional CNVs during differentiation. The integration-free hepatoblasts that were generated constitute a new tool for the study of diseased hepatocytes derived from patients' iPSCs and their use in the context of stem cell-derived hepatocyte transplantation. Our findings also highlight the need to conduct careful studies on genome integrity for the selection of iPSC lines before using them for further applications. *STEM CELLS TRANSLATIONAL MEDICINE* 2014;3:686–691

### INTRODUCTION

Induced pluripotent stem cells (iPSCs) have considerable potential for use in regenerative medicine, including for liver diseases [1, 2]. However, the genomic stability of these cells remains a matter of concern. Copy number variations (CNVs) [3–5] and single-nucleotide variations (SNVs) [6, 7] have been reported in recent years. These mutations may already be present in the fibroblast population [8] or may be acquired during reprogramming [9]. Efforts to overcome this genomic instability generally focus on generating human iPSCs devoid of integrated reprogramming transgenes and on defining a robust reprogramming protocol with a minimal impact on genome integrity.

Many reprogramming strategies are used, but two methods excluding the use of DNA are particularly appealing: Sendai virus-based vectors [10] and synthetic mRNAs [11]. The synthetic mRNA approach has an advantage over the Sendai vector approach in that no clean-up phase is required to eliminate viral proteins. However, this

method is technically challenging, repeated transfections are stressful for the cells, and little is known about the genomic integrity of the iPSCs generated.

We report in this study the generation of human iPSCs by transfection with mRNAs produced in the laboratory. We investigated the genomic integrity of these cell lines by single-nucleotide polymorphism (SNP) and CNV analyses on whole-genome microarrays, comparing the results with those obtained for retrovirus-derived iPSC clones generated in parallel from the same fibroblasts and cultured in identical conditions. Moreover, their genomic integrity was also evaluated after differentiation into hepatoblasts.

### MATERIALS AND METHODS

We generated iPSC lines by the daily transfection of fibroblasts, for 16 days, with mRNAs produced in the laboratory or by a single transduction with a polycistronic retroviral vector. All the iPSC lines were generated by the same experimenter and were cultured in identical conditions.

<sup>a</sup>INSERM Unité Mixte de Recherche S972, <sup>b</sup>Université Paris-Sud, Unité Mixte de Recherche S972, and <sup>c</sup>Département Hospitalo-Universitaire Hépatinov, Paul Brousse Hospital, Villejuif, France; <sup>d</sup>INSERM Unité Mixte de Recherche S986, Institut Fédératif de Recherche 93, Bicêtre Hospital, Kremlin-Bicêtre, France; <sup>e</sup>Department of Cytogenetics, INSERM U935, Bécélère Hospital, Clamart, France; <sup>f</sup>Centros de Investigación Biomédica en Red de Diabetes y Obesidad, Centro de Investigación Príncipe Felipe, Eduardo Primo Yúfera 3, Valencia, Spain; <sup>g</sup>Molecular Genetics Center, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Propre de Recherche 3404, Gif-sur-Yvette, Université Paris-Sud, Orsay, France

\* Contributed equally to this work.

Correspondence: Anne Dubart-Kupperschmitt, Ph.D., INSERM Unité Mixte de Recherche-S972, Paul Brousse Hospital, Villejuif, F-94807, France. Telephone: 0033145595138; E-Mail: anne.dubart@inserm.fr

Received August 30, 2013; accepted for publication February 17, 2014; first published online in *SCTM EXPRESS* April 15, 2014.

©AlphaMed Press  
1066-5099/2014/\$20.00/0

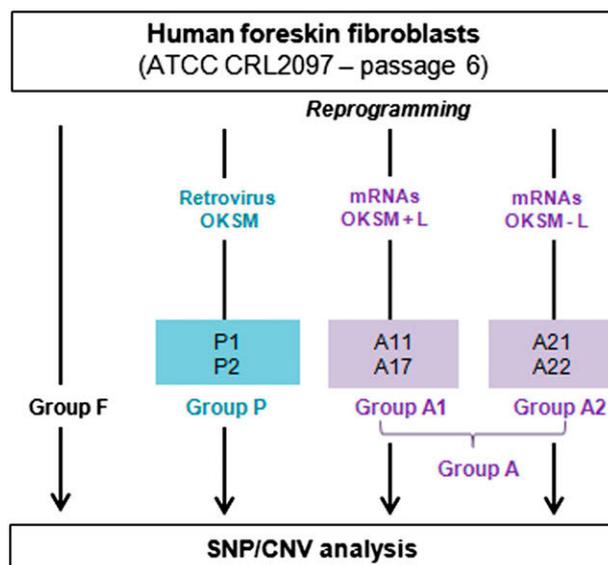
<http://dx.doi.org/10.5966/sctm.2013-0158>

Two samples of parental fibroblasts and six iPSC lines were analyzed with Affymetrix SNP 6.0 microarrays (Santa Clara, CA, <http://www.affymetrix.com>) and oligonucleotide-based array CGH 135K (Fig. 1) (see details in supplemental online data).

## RESULTS/DISCUSSION

Two independent reprogramming assays with the reprogramming mRNA cocktail OCT4, KLF4, SOX2, cMYC with or without LIN28 gave rise to embryonic stem cell-like colonies (approximately 20 colonies per  $10^4$  parental fibroblasts, efficiency of approximately 0.2%). The removal of LIN28 from the reprogramming cocktail in the second experiment (Fig. 1) had no effect on reprogramming efficiency. The characterization of these mRNA-derived iPSCs, and of the retrovirus-derived iPSCs obtained in parallel (referred to hereafter as mRNA-iPSCs and retrovirus-iPSCs, respectively), showed that all these clones had the typical features of human pluripotent stem cells. The expression of stemness markers was analyzed by immunostaining, flow cytometry, and RT-PCR (Fig. 2A–2E; supplemental online Table 3). Pluripotency was initially demonstrated *in vitro* by the generation of embryoid bodies expressing markers from the three germ layers (Fig. 2F). Secondly, the *in vivo* injection of these cells into immunodeficient mice resulted in teratomas (Fig. 2G). Finally, all the selected iPSC lines had a normal karyotype (46,XY) (supplemental online Table 2). Based on published protocols [12–14], we demonstrated that mRNA-iPSCs differentiated efficiently into definitive endoderm, one of the critical barriers to the generation of iPSC-derived hepatocytes *in vitro* [15]. These cells differentiated further, into a homogeneous population of cells expressing a specific combination of markers of hepatoblasts, including  $\alpha$ -fetoprotein,  $\alpha$ 1 antitrypsin, cytokeratin 19, and hepatic nuclear factor 4 $\alpha$  (Fig. 2H, 2I). Our results indicate that the use of modified mRNAs is an efficient and flexible strategy for generating nonintegrative human iPSCs that can be induced to differentiate efficiently into cells of the hepatic lineage.

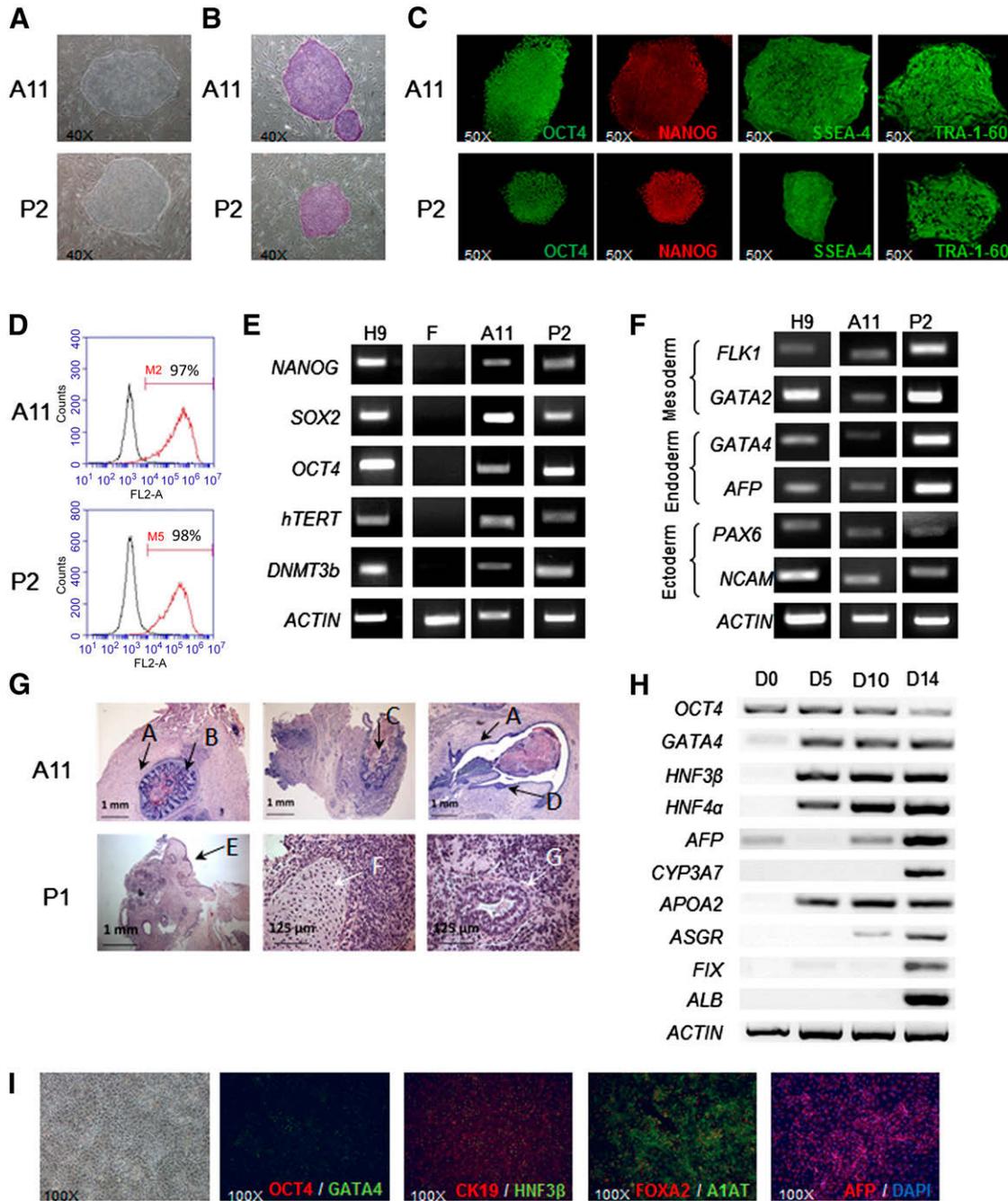
We analyzed the 763,953 SNPs that gave a result for all samples and had a confidence value  $\geq 99.95\%$ . We determined the number of SNVs between each iPSC line and each of the two parental fibroblast samples separately. SNV numbers were between 494 and 2,067. The number of SNVs between a given iPSC line and each of the two fibroblast samples was very similar, demonstrating the robustness of the analysis (Fig. 3A). The two fibroblast samples corresponded to separate genomic DNA extractions, both at passage 6, in two independent experiments, and were thus genetically identical. The presence of 504 SNVs between these two samples corresponds to the background of our microarray analysis. This value is consistent with the threshold of  $\geq 99.95\%$  selected for the confidence value, implying that we would expect approximately 500 false SNP calls for every million SNPs analyzed. We therefore removed the 504 SNPs identified as SNVs between the two fibroblast samples, resulting in a new list of 763,449 SNPs. In this list, the number of SNVs between a given iPSC line and the fibroblasts was between 340 and 1,799 (Fig. 3B). A mean of 1,575 SNVs was found for group P, versus 352 and 416 for groups A1 and A2, respectively, corresponding to a fourfold difference ( $p$  value = .0006). Thus, the SNP profile of retrovirus-iPSC lines was more affected by the reprogramming



**Figure 1.** Experimental protocol. Human foreskin fibroblasts were expanded up to passage 6 and reprogrammed to pluripotency with two methods, in parallel: retroviral transduction (induced pluripotent stem cell [iPSC] lines P1 and P2 = group P) or synthetic mRNAs, in two independent experiments using different reprogramming cocktails, OKSM with or without LIN28 (iPSC lines A11 and A17 = group A1; iPSC lines A21 and A22 = group A2). All the iPSC lines were amplified up to passages 8–11 before DNA extraction for pangenomic analyses. Abbreviations: ATCC, American Type Culture Collection; CNV, copy number variation; L, LIN28; OKSM, OCT4, KLF4, SOX2, cMYC; SNP, single-nucleotide polymorphism.

process than that of mRNA-iPSC lines. Principal component analysis and hierarchical clustering were performed on our quantitative data (Fig. 3C) and revealed the existence of two clusters, corresponding to the reprogramming methods. Groups A1 and A2 clustered together, closer to the fibroblast population than group P, consistent with higher levels of genomic integrity in these mRNA-iPSC lines. Our analysis was based on SNV at sites throughout the genome that were known to be polymorphic. Our results are not directly comparable to those of studies based on exome capture, which have reported a mean of six protein-coding mutations per iPSC genome [7]. Overall, these results show that mRNA-iPSCs do not differ significantly from the parental fibroblasts in SNP analyses, whereas retrovirus-iPSCs do. This could be explained by the limited period of time needed for mRNA reprogramming (colonies appeared from day 12), which avoids the overexpression of reprogramming factors as a result of the persistence of retroviral vectors.

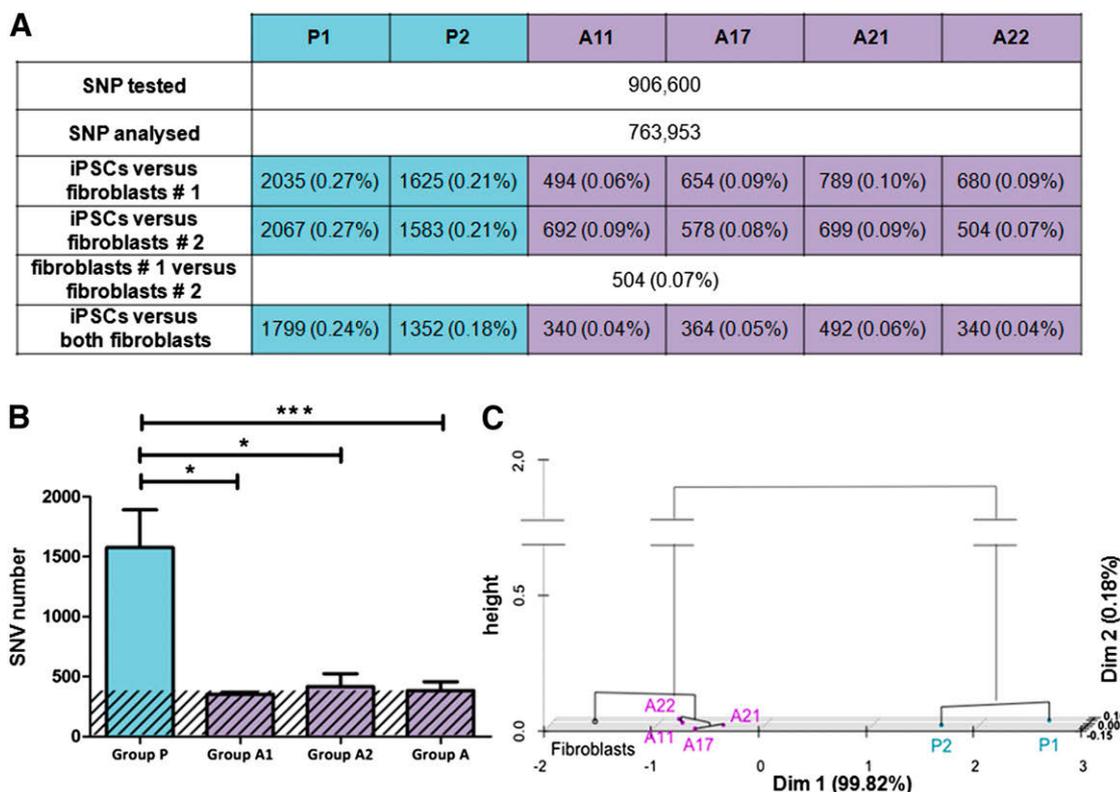
The Affymetrix 6.0 microarray contains approximately 946,000 CNV probes. We looked for large areas of CNV, with a minimal size of 100 kb, and found three deletions and four duplications in the fibroblast samples (versus the Hg19 reference sequence). All these CNVs are polymorphic (reported in the Database of Genomic Variants), and their presence was confirmed in all the iPSC lines. We then focused on additional CNVs detected in at least one iPSC line (Fig. 4A). The number of deletions for each iPSC line, with respect to the parental fibroblasts, was between 0 and 7, and the number of duplications was between 0 and 4. Results were highly heterogeneous, depending on the iPSC line considered: some iPSC lines seemed less affected (P1, A22) than



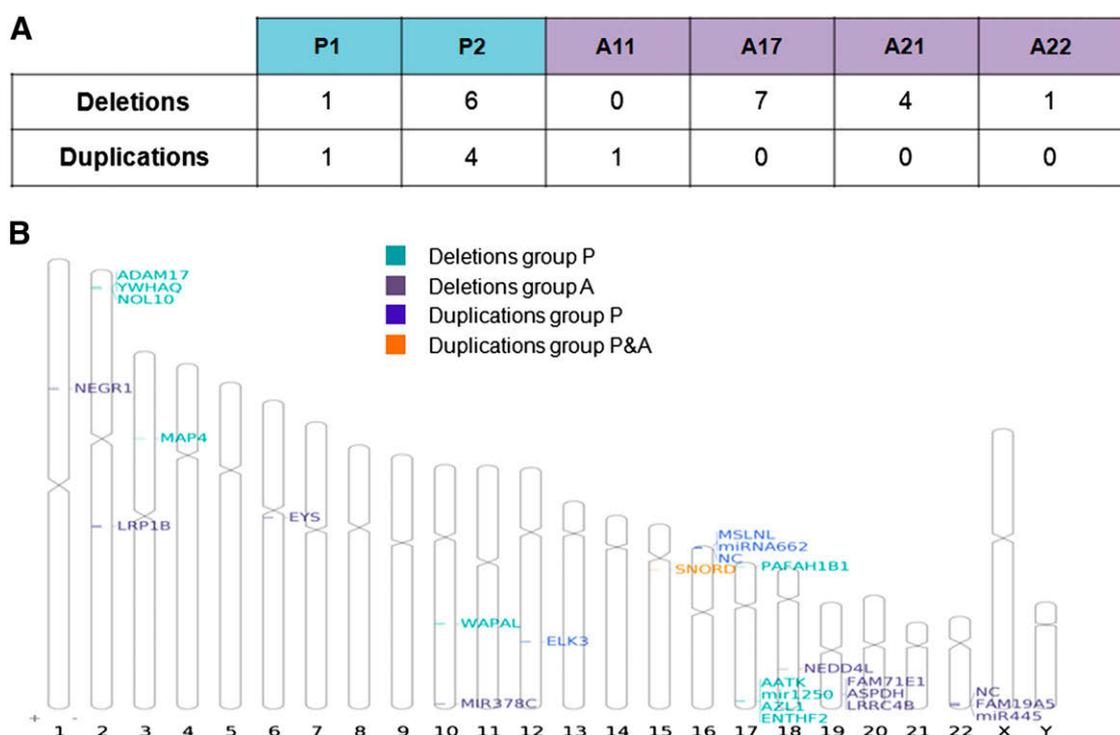
**Figure 2.** Characterization of mRNA-induced pluripotent stem cell (iPSC) lines and their capacity for hepatic differentiation. **(A):** Morphology on phase-contrast microscopy ( $\times 4$  objective). **(B):** Alkaline phosphatase-positive colonies. **(C):** Immunofluorescence labeling for stemness markers OCT4, NANOG, SSEA-4, and TRA-1-60 ( $\times 50$ ). **(D):** Flow cytometry analyses of SSEA-4. **(E):** Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analyses of stemness marker mRNA levels. The primers used for *OCT4* and *SOX2* specifically detect the endogenous transcripts. **(F):** RT-PCR analyses of differentiation marker expression after EB formation. **(G):** Histological analyses of teratomas containing derivatives of all three embryonic germ layers. A, smooth muscle; B, gastrointestinal epithelium; C, mucin-producing glands; D and E, squamous epithelium; F, cartilage; G, gastric epithelium. **(H):** Hepatic differentiation of mRNA-iPSC clone A29: RT-PCR analyses at day 0 (undifferentiated), day 5 (definitive endoderm), day 10 (specified endoderm), and day 14 (hepatoblasts). **(I):** Morphology and immunocytochemistry analysis of mRNA-iPSC-derived hepatoblasts. Abbreviation: DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole.

others (P2, A17). However, by contrast to our observations for SNV analyses, no clear relationship was found between the number of CNVs and the reprogramming method, suggesting that the reprogramming method used had no direct impact on the CNV number. This should be confirmed by analyzing a larger number

of iPSC lines. The visualization of these CNVs on an ideogram (Fig. 4B) showed that they had no preferential localization. Fourteen of the 16 variants contained the coding region of at least one gene (supplemental online Table 1). Interestingly, two CNVs contained tumor suppressor genes, such as *NEDD4L* [16] or *LRP1B*, which is



**Figure 3.** SNV analysis. **(A):** Absolute number of SNV detected for each iPSC line with respect to fibroblast samples 1 and 2, and percentage (in brackets) of the total number of SNPs analyzed. **(B):** Histograms representing the mean number  $\pm$  SD of SNV per reprogramming group. The background (% confidence  $\times$  number of SNPs analyzed) of the SNP analysis is indicated by the hatched area. The difference between group P and group A (four mRNA-iPSC lines) was highly significant ( $p = .0006$ ), with the presence of four times as many SNVs in group P (\*,  $p \leq .05$ , \*\*\*,  $p < .001$ , Student's *t* test). **(C):** Principal component analysis and hierarchical clustering based on SNV values for each iPSC line with respect to the two fibroblast samples. Abbreviations: iPSC, induced pluripotent stem cell; SNP, single-nucleotide polymorphism; SNV, single-nucleotide variation.



**Figure 4.** Copy number variation (CNV) analysis. **(A):** Number of deletions and duplications for each induced pluripotent stem cell line with respect to the parental fibroblasts. **(B):** Ideogram showing the localization of each CNV and the genes included in the mutated region.

located in a common fragile site [17, 18] already shown to be affected in iPSC lines [3]. Some genes affected by CNVs are involved in cell division (*WAPAL*) [19]. Two of the four genes affected by duplications, *RAB40C* and *ELK3* [20, 21], have been reported to be associated with tumorigenicity. We completed this analysis by oligonucleotide-based array CGH 135K, which made it possible to detect smaller CNVs, but with a lower resolution than for Affymetrix 6.0 microarray. These two techniques did not cover the same regions of the genome and were used in this study as complementary techniques, although one deletion was confirmed by both methods (supplemental online Table 1). Our results confirmed that some clones were more affected than others, whatever the reprogramming method used. Five of these CNVs affected genes associated with cancer or cell proliferation (supplemental online Table 1), including duplications of oncogenes that were confirmed by fluorescence in situ hybridization analysis (supplemental online Fig. 1). Eighteen of the 54 CNVs detected with both techniques were common to at least two iPSC lines, and 11 were found in iPSCs reprogrammed by different methods. This probably reflects the presence of these CNVs in a subpopulation of fibroblasts before reprogramming, as previously described [3]. All our iPSC lines were analyzed at comparable early passages, to prevent the long-term passaging effect, which tends to select against highly damaged iPSCs [3]. Finally, these data are consistent with the findings of another study based on the comparison of iPSC lines generated with retrovirus or piggyBac transposon systems [3].

Finally, we extended our study with Affymetrix SNP 6.0 microarrays by comparing genomic analysis of iPSCs before and after differentiation into hepatoblasts in three independent differentiation experiments (supplemental online Fig. 2A). Interestingly, using the same criteria as previously described, no additional CNV was acquired by the cells during differentiation. Furthermore, the percentage of SNVs between undifferentiated iPSCs and hepatoblasts was not different from those measured between either the same undifferentiated iPSCs at two successive passages or two different iPSC lines derived with the two reprogramming methods (supplemental online Fig. 2B).

## CONCLUSION

Our study demonstrates that the mRNA reprogramming strategy yields iPSCs that do not differ significantly from the parental fibroblasts in SNP analysis by contrast to retrovirus-iPSC lines. However, like other reprogramming techniques, this strategy can lead to the occurrence of CNV that are either selected or acquired during reprogramming or early passages whatever the reprogramming method used. This highlights the need for careful studies of genomic integrity to select iPSC lines, even though this nonintegrative technology appears safer for therapeutic applications.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Vincent Saravaki, Dominique Pineau, and Mélanie Point for excellent technical assistance. C.S. and N.D. were supported by fellowships from Association Française Contre les Myopathies and Région Ile de France (DIM Stem Pôle), respectively. E.L. was supported by Grant 2011-Rare-006 “HEMO-iPS,” and S.A.-T. by FP7-HEALTH.2011.1.4-2-278152 “InnovaLiv.” This work was supported by ANR-2010-RFCS-004 “Liv-iPS” and FP7-HEALTH.2011.1.4-2-278152 “InnovaLiv.”

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

C.S. and E.L.: conception and design, collection and assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing; J. Maluenda, L.T., and I.M.-G.: collection and assembly of data, data analysis and interpretation; C.D.: data analysis and interpretation; N.D., S.G.-M., and S.A.-T.: collection and assembly of data; D.B., G.T., and J. Marie: data analysis and interpretation; J. Melki and A.W.: conception and design, data analysis and interpretation; A.D.-K.: conception and design, data analysis and interpretation, manuscript writing.

## DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The authors indicate no potential conflicts of interest.

## REFERENCES

- Dianat N, Steichen C, Vallier L et al. Human pluripotent stem cells for modelling human liver diseases and cell therapy. *Curr Gene Ther* 2013;13:120–132.
- Lanzoni G, Oikawa T, Wang Y et al. Concise review: Clinical programs of stem cell therapies for liver and pancreas. *STEM CELLS* 2013;31:2047–2060.
- Hussein SM, Batada NN, Vuoristo S et al. Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature* 2011;471:58–62.
- Laurent LC, Ulitsky I, Slavin I et al. Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. *Cell Stem Cell* 2011;8:106–118.
- Mayshar Y, Ben-David U, Lavon N et al. Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2010;7:521–531.
- Cheng L, Hansen NF, Zhao L et al; NISC Comparative Sequencing Program. Low incidence of DNA sequence variation in human induced pluripotent stem cells generated by nonintegrating plasmid expression. *Cell Stem Cell* 2012;10:337–344.
- Gore A, Li Z, Fung HL et al. Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011;471:63–67.
- Young MA, Larson DE, Sun CW et al. Background mutations in parental cells account for most of the genetic heterogeneity of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2012;10:570–582.
- Ji J, Ng SH, Sharma V et al. Elevated coding mutation rate during the reprogramming of human somatic cells into induced pluripotent stem cells. *STEM CELLS* 2012;30:435–440.
- Fusaki N, Ban H, Nishiyama A et al. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad, Ser B, Phys Biol Sci* 2009;85:348–362.
- Warren L, Manos PD, Ahfeldt T et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 2010;7:618–630.
- Ma X, Duan Y, Tschudy-Seney B et al. Highly efficient differentiation of functional hepatocytes from human induced pluripotent stem cells. *STEM CELLS TRANSLATIONAL MEDICINE* 2013;2:409–419.
- Medine CN, Lucendo-Villarín B, Zhou W et al. Robust generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cell populations. *J Vis Exp* 2011;(56):e2969.
- Touboul T, Hannan NR, Corbinau S et al. Generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells under chemically defined conditions that recapitulate liver development. *Hepatology* 2010;51:1754–1765.
- D’Amour KA, Agulnick AD, Eliazar S et al. Efficient differentiation of human embryonic

stem cells to definitive endoderm. *Nat Biotechnol* 2005;23:1534–1541.

**16** Gao C, Pang L, Ren C et al. Decreased expression of Nedd4L correlates with poor prognosis in gastric cancer patient. *Med Oncol* 2012;29:1733–1738.

**17** Ding D, Lou X, Hua D et al. Recurrent targeted genes of hepatitis B virus in the liver cancer genomes identified by a next-generation

sequencing-based approach. *PLoS Genet* 2012; 8:e1003065.

**18** Ferber MJ, Thorland EC, Brink AA et al. Preferential integration of human papillomavirus type 18 near the c-myc locus in cervical carcinoma. *Oncogene* 2003;22:7233–7242.

**19** Peters JM, Nishiyama T. Sister chromatid cohesion. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012; 4:pil:a011130.

**20** Wasylyk C, Zheng H, Castell C et al. Inhibition of the Ras-Net (Elk-3) pathway by a novel pyrazole that affects microtubules. *Cancer Res* 2008;68:1275–1283.

**21** Yang Q, Jie Z, Cao H et al. Low-level expression of let-7a in gastric cancer and its involvement in tumorigenesis by targeting RAB40C. *Carcinogenesis* 2011;32: 713–722.



See [www.StemCellsTM.com](http://www.StemCellsTM.com) for supporting information available online.

**Titre :** Hépatocytes différenciés à partir de cellules souches pluripotentes induites: modèle pour la thérapie cellulaire et génique autologue de l'hémophilie B et modèle préclinique chez le primate

**Mots clés :** Cellules souches pluripotentes induites, Hémophilie B, différenciation hépatocytaire, CRISPR/Cas9

**Résumé :** Ce projet de thèse vise à modéliser puis à apporter la preuve de concept d'une thérapie cellulaire et génique autologue de maladies héréditaires du foie par la transplantation d'hépatocytes différenciés à partir des cellules souches pluripotentes induites (iPSC) spécifiques du patient, une fois celles-ci corrigées du défaut génétique. L'hémophilie B (HB) est une maladie héréditaire causée par une mutation du gène *F9*, codant le facteur IX (FIX) de la coagulation synthétisé dans le foie par les hépatocytes. Des fibroblastes d'un patient porteur de la « mutation royale » ont été reprogrammés en iPSC puis différenciés en hépatocytes. L'étude de l'ARNm du *F9* par séquençage haut débit a confirmé la présence d'un site d'épissage anormal codant une protéine tronquée. D'autres iPSC ont été obtenues à partir des cellules d'un second patient HB exprimant un FIX inactif. Après insertion ciblée d'une cassette thérapeutique codant le FIX dans un site génomique sûr à l'aide d'endonucléases artificielles (CRISPR/Cas9), nous avons différencié les iPSC corrigées et non corrigées en hépatocytes (respectivement corr-HB-iHeps et HB-iHeps) et confirmé une expression plus importante de l'ARNm du *F9* et de la protéine FIX dans les corr-HB-iHeps. En revanche, nous n'avons pas détecté d'activité du FIX transgénique sans doute à cause d'une différenciation incomplète des hépatocytes. Nous avons alors développé un protocole de différenciation en sphéroïdes permettant une différenciation plus efficace confirmée aux niveaux ARN et protéine FIX. L'analyse de l'activité du FIX produit nous permettra de valider la correction *in vitro* avant de la valider *in vivo* en transplantant les corr-HB-iHeps dans un modèle de souris *F9KO*. Finalement, la dernière partie de ce travail a consisté à développer un protocole de différenciation d'iPSC de singe en hépatocytes en vue d'une transplantation autologue dans le foie de l'animal donneur pour valider la faisabilité et la sécurité de cette approche chez le gros animal.

**Title :** Hepatocytes differentiated from induced pluripotent stem cells: model for autologous cell and gene therapy of hemophilia B and preclinical model in primate

**Keywords :** Induced pluripotent stem cells, Hemophilia B, hepatocyte differentiation, CRISPR/Cas9

**Abstract:** This PhD project aims to model and to bring a proof of concept for autologous cell/gene therapy of inherited liver diseases by transplanting hepatocytes differentiated from patient-specific induced pluripotent stem cells (iPSCs), after correction of the genetic defect. Hemophilia B (HB) is an inherited disease caused by a mutation in the *F9* gene encoding clotting factor IX (FIX), synthesized in the liver by hepatocytes. Fibroblasts of a patient with the "royal mutation" were reprogrammed in iPSCs then differentiated into hepatocytes. The study of the *F9* mRNA by high-throughput sequencing confirmed the presence of an abnormal splice site leading to a truncated protein explaining hemophilia. Other iPSCs were obtained and characterized from the cells of a second HB patient expressing an inactive FIX. By targeting in these iPSCs the insertion of a therapeutic cassette encoding FIX into a safe harbor site using artificial endonucleases (CRISPR/Cas9), we differentiated the corrected and non-corrected iPSC into hepatocytes. Quantitative analyzes confirmed a higher expression of *F9* mRNA and FIX protein in the corrected clones. In contrast, we did not detect transgenic FIX activity due to a lack of post-translational modifications necessary for FIX activity. We then developed a protocol of differentiation in spheroids quantitatively more efficient to produce FIX. Detection of FIX activity will validate our *in vitro* approach before validation *in vivo* by transplanting the corrected hepatocytes in a *F9KO* mouse model. Finally, the last part of this work consisted in the development of a differentiation protocol of nonhuman primate iPSCs into hepatocytes for autologous transplantation into the liver of the donor animal in order to validate the feasibility and the safety of such an approach in the large animal.