



HAL
open science

Utilisation de technologies d'édition du génome afin de générer des cardiomyocytes matures à partir de cellules souches pluripotentes humaines induites

Ahmed Khedher

► **To cite this version:**

Ahmed Khedher. Utilisation de technologies d'édition du génome afin de générer des cardiomyocytes matures à partir de cellules souches pluripotentes humaines induites. Biotechnologie. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASL002 . tel-03948124

HAL Id: tel-03948124

<https://theses.hal.science/tel-03948124>

Submitted on 20 Jan 2023

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.

Utilisation de technologies d'édition
du génome afin de générer des
cardiomyocytes matures à partir de
cellules souches pluripotentes
humaines induites

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°582 : oncologie : biologie - médecine - santé (CBMS),
Spécialité de doctorat : aspects moléculaires et cellulaires de la biologie
Unité de recherche : Structure et Instabilité des Génomes
Référent : Faculté de médecine

**Thèse présentée et soutenue à Paris,
le 19/01/2021, par
Ahmed H.Y. KHEDHER**

Composition du Jury

Onnik AGBULUT Professeur, Sorbonne Université	Président
Patricia LEMARCHAND Professeure des Universités - Praticienne Hospitalière, Université de Nantes	Rapporteuse & Examinatrice
Albano Carlo MELI Chargé de Recherche Inserm, HDR, Université de Montpellier	Rapporteur & Examinateur
Nathalie GABORIT Chargée de Recherche CNRS, Université de Nantes	Examinatrice
Ana-Maria GÓMEZ Directrice de Recherche Inserm, Université Paris-Saclay	Examinatrice
Carine GIOVANNANGELI Directrice de Recherche CNRS, MNHN	Directrice de thèse
Jean-Paul CONCORDET Chargé de Recherche Inserm, MNHN	Co-Encadrant
Jean-Michel ITIER Chercheur, Sanofi R&D	Co-Encadrant

Table des matières

Liste des figures	5
Liste des abréviations	7
Objectifs généraux de la thèse	10
Introduction	12
I. Les cardiomyocytes dérivés des cellules souches pluripotentes induites humaines ...	12
I.1 Les cellules souches.....	12
I.2 La reprogrammation cellulaire	13
I.3 La différenciation cardiaque <i>in vivo</i>	15
I.4 La différenciation <i>in vitro</i> des hPSCs vers le lignage cardiaque	17
I.5 La différenciation des hiPSCs en différents sous-types de CMs et autres types cellulaires cardiaques	23
I.6 L'utilisation des hiPSC-CMs pour la recherche biomédicale.....	28
II. Les hiPSC-CMs sont immatures	40
II.1 Morphologie	40
II.2 Mitochondries et Métabolisme	40
II.3 Tubules Transverses	40
II.4 Electrophysiologie.....	41
II.5 Gestion du calcium	44
II.6 Organisation et taille des sarcomères.....	45
II.7 Appareil contractile et force de contraction	46
II.8 Transcriptome.....	48
III. Approches pour améliorer la maturation des hiPSC-CMs	49
III.1 Co-Culture	49
III.2 Milieux de Maturation.....	50
III.3 Hormones et signaux biochimiques	50
III.4 Rigidité de la surface de culture et « <i>Patterning</i> »	51
III.5 Culture en 3D.....	52
III.6 Edition du génome.....	53
IV. Le gène <i>KCNJ2</i>	54
IV.1 Expression et régulation du gène <i>KCNJ2</i>	54
IV.2 Structure de la sous-unité α Kir2.1	54
IV.3 Fonction du canal Kir2.1	55
IV.4 Mutations de <i>KCNJ2</i> associées à des pathologies humaines	56
V. Le gène <i>CASQ2</i>	58
V.1 Expression et régulation du gène <i>CASQ2</i>	58

V.2 Structure de la protéine CASQ2	58
V.3 Fonctions.....	58
V.4 Mutations de CASQ2 associées à des pathologies humaines	60
VI. L'édition du génome avec le système CRISPR/Cas9	63
VI.1 Le développement des nucléases pour l'ingénierie du génome	63
VI.2 Les systèmes CRISPR/Cas.....	65
VI.3 Le système CRISPR/Cas9 de <i>Streptococcus pyogenes</i>	65
VI.4 Réparation des cassures d'ADN double brin par la voie cNHEJ	66
VI.5 Réparation des cassures d'ADN double brin par la voie HDR	68
VI.6 Les limites du système CRISPR/Cas9	70
VI.7 Les variants du système CRISPR/Cas9.....	70
Résultats	72
I. Amélioration de la maturation des hiPSC-CMs par la surexpression des gènes <i>KCNJ2</i> et <i>CASQ2</i> par édition génomique et application en toxicologie prédictive	72
Article 1	73
II. Amélioration de l'édition du génome par la fusion Cas9-CtIP : évaluation dans les hiPSCs	110
Article 2	113
Discussion	138
I. Stimulation de la maturation par co-expression des gènes <i>KCNJ2</i> et <i>CASQ2</i>	138
II. Limites des modèles développés et expériences complémentaires	142
III. Approches complémentaires pour augmenter la maturation des hiPSC-CMs.....	143
IV. L'amélioration de la maturité des hiPSC-CMs est nécessaire pour une meilleure prédiction des effets indésirables induits par les médicaments candidats.....	146
Références Bibliographiques	149
Remerciements	173

Liste des figures

Figure 1. Chemins de la différenciation, reprogrammation et transdifférenciation cellulaire	p14
Figure 2. Développement cardiaque embryonnaire chez la souris.....	p16
Figure 3. La différenciation <i>in vitro</i> des hPSCs en CMs récapitule le développement embryonnaire cardiaque.....	p18
Figure 4. Principales méthodes de différenciation cardiaque à partir d'hiPSCs	p20
Figure 5. Méthodes les plus fréquemment utilisées pour obtenir des CMs à partir d'hESCes et d'hiPSCs.....	p22
Figure 6. Représentation schématique du système de conduction cardiaque et de la corrélation entre les potentiels d'action des cardiomyocytes dans les différentes régions du cœur et l'électrocardiogramme de surface.....	p25
Figure 7. Protocoles de différenciation cellulaire utilisés pour générer les différents lignages cardiaques à partir d'hiPSCs.....	p27
Figure 8. Aperçu des maladies congénitales cardiaques modélisées avec des hiPSC-CMs.....	p31
Figure 9. Diagrammes illustrant la relation entre l'allongement de la durée de repolarisation et les torsades de Pointes.....	p36
Figure 10. Principes électrophysiologiques de l'activité électrique des CMs.....	p42
Figure 11. Couplage excitation-contraction dans les CMs.....	p45
Figure 12. Structure du sarcomère et des protéines associées.....	p46

Figure 13. Diagrammes illustrant les changements dans la composition des isoformes des filaments fins et épais entre le stade fœtal et le stade adulte dans les CMs ventriculaires gauches murins (rouge) et humains (bleu).....	p48
Figure 14. Structure de la sous-unité α Kir2.1	p53
Figure 15. Relation intensité-voltage du courant I_{K1}	p56
Figure 16. Stockage et régulation du relargage du Ca^{2+} par la CASQ2 dans le réticulum sarcoplasmique.....	p60
Figure 17. Représentation graphique illustrant les mutations faux-sens dans la CASQ2 associées à des maladies chez l'homme.....	p62
Figure 18. Les nucléases artificielles pour l'édition du génome.....	p64
Figure 19. Représentation schématique de la réparation d'une cassure double brin par la voie cNHEJ.....	p67
Figure 20. Représentation schématique de la réparation d'une cassure double brin par la voie HDR.....	p69

Liste des abréviations

AAV9, *Adeno-Associated Viral vector serotype 9*
APLF, *Aprataxin-and-PNK-like factor*
ARVD, dysplasie ventriculaire droite arythmogène
ARNpeg, *prime editing guide RNA*
ASCs, Cellules Souches Adultes
ATS, Syndrome d'Andersen-Tawil
AVN, Nœud Auriculo-Ventriculaire
bFGF, *basic Fibroblast Growth Factor*
BMP, *Bone Morphogenetic Protein*
Cas, gène associé à CRISPR
CASQ2, Calsequestrine 2
CICR, *Ca²⁺ - induced Ca²⁺ - release* / Libération du Ca²⁺ induite par le Ca²⁺
CIFRE, Convention Industrielle de Formation par la Recherche
CiPA, *Comprehensive In Vitro Proarrhythmia Assay*
CMs, Cardiomyocytes
cNHEJ, *canonical Non-Homologous End-Joining*
CRISPR/Cas9, *Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeat/CRISPR associated protein9*
crRNA, ARN CRISPR
CRU, Unité de Relargage du Calcium
Cx43, Connexine 43
CPVT2, Tachycardie Ventriculaire Polymorphe Catecholaminergique de type 2
DAD, *Delayed After Depolarization*
DNA-PKcs, *DNA-dependent Protein Kinase, catalytic subunit*
DKK1, *Dickkopf-related protein -1*
EAD, *Early After Depolarization*
EBs, corps embryoïdes
ECC, Couplage Excitation-Contraction
ECG, Electrocardiogramme
FDA, *Food and Drug Administration*
GSK3β, *Glycogene Synthase Kinase 3β*
HDR, *Homology Directed Repair* (voie de réparation dirigée par des séquences homologues)

hERG, *human Ether-à-go-go-Related Gene*
hESC, Cellules Souches Embryonnaires humaines
IGF1, *Insulin-like Growth Factor-1*
FHF, premier champ cardiaque
hiPSCs, Cellules Souches Pluripotentes induites humaines
hiPSC-CMs, Cardiomyocytes dérivés de Cellules Souches Pluripotentes induites humaines
ICH, international d'harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement des médicaments à usage humain ICH
IWP-2, *Inhibitor of Wnt production 2*
iPSCs, Cellules Souches Pluripotentes induites
jSR, SR jonctionnel
JN, Junctine
LQTS, Syndrome du QT long
LTCC, Canaux Calciques voltage-dépendant de Type L
MEA, *Microelectrode Array*
MEC, Matrice Extracellulaire
MEF2, *Myocyte Enhancer Factor-2*
MHC, chaîne lourde de la myosine
M-MLV RT, Rétrotranscriptase *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*
NFAT, *Nuclear Factor of Activated T-cells*
PA, Potentiel d'Action
PDGF, *Platelet-Derived Growth Factor*
PAM, *Protospacer Adjacent Motif*
RALDH2, Rétinaldéhyde-Deshydrogenase 2
RPA, *Replication Protein A*
RyR2, Récepteur à la Ryanodine de type 2
RFP, *Red Fluorescent Protein*
SAN, Nœud Sinusal ou Sino-Auriculaire
SERCA-2a, *Sarco reticulum calcium ATPase type-2a*
SHF, second champ cardiaque
Shh, *Sonic hedgehog*
SARS-CoV-2, *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*
Spacer, séquence variable d'ADN
Sp, *Streptococcus pyogenes*
SQTS, syndrome du QT court

SQTS3, syndrome du QT court de type 3
SR, Réticulum Sarcoplasmique
SRF, *Serum Response transcription Factor*
TALEN, *Trans Activator-Like Effector Nucleases*
tracrRNA, ARN transactivateur
TRD-1, Triadine 1
TGF- β , *Transforming Growth Factor- β*
TNNT2, Troponine T2
VEGF, *Vascular Endothelial Growth Factor*
Wnt, *Wingless-related Integration site*
XLF, *XRCC4-like factor*
XRCC4, *X-Ray Cross Complementing protein 4*
ZNF, Nucléase à Doigts de Zinc

Objectifs généraux de la thèse

Du fait de leur capacité à se différencier vers la plupart des types cellulaires, les cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPSCs) permettent d'établir des modèles cellulaires pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires des maladies et donnent la possibilité d'avoir accès à une source illimitée de cellules humaines différenciées pour la thérapie cellulaire, la découverte de médicaments ou bien la toxicologie prédictive.

En particulier, la capacité à différencier les hiPSCs vers le lignage cardiaque a considérablement progressé au cours de ces vingt dernières années. Les protocoles de différenciation cardiaque les plus robustes et les plus efficaces impliquent l'activation et l'inhibition spécifiques de différentes voies de signalisation dans des conditions de cultures définies, récapitulant les étapes clés du développement cardiaque chez l'embryon précoce (Mummery et al., 2012). Malgré ces progrès, des améliorations qualitatives sont encore nécessaires dans la mesure où les cardiomyocytes (CMs) obtenus restent immatures et sont phénotypiquement proches du stade fœtal du développement du cœur. En effet, les cardiomyocytes dérivés de cellules souches pluripotentes induites humaines (hiPSC-CMs) se contractent de manière spontanée, ont un potentiel de repos membranaire élevé, démontrent une gestion du calcium atténuée et disposent d'une force contractile modeste ainsi que d'un métabolisme dépendant du glucose (Karakikes et al., 2015a).

Diverses stratégies inspirées de la physiologie cardiaque ont déjà été décrites pour différencier les hiPSC-CMs vers un état plus mature en utilisant par exemple la stimulation électromécanique, l'ajout d'acide gras dans le milieu de culture, l'utilisation d'hormones de maturation ou bien encore l'incorporation des CMs dans des structures tissulaires en trois dimensions (Karbassi et al., 2020). De plus, l'impact de la surexpression de gènes cardiaques clés a également été étudié. C'est le cas pour les gènes *KCNJ2* et *CASQ2*, impliqués respectivement dans les propriétés électrophysiologiques et la gestion du calcium des CMs, qui sont très peu exprimés dans les hiPSC-CMs en comparaison aux CMs adultes. Des études ont décrit que l'expression individuelle de l'un ou l'autre de ces gènes apportait un certain bénéfice sur la maturation des propriétés électrophysiologiques et l'utilisation du calcium (M. Li et al., 2017; Liu et al., 2009).

Cette thèse a pour objectif principal d'exprimer les gènes *KCNJ2* et *CASQ2* dans une même cellule afin de combiner leurs effets et d'améliorer ainsi potentiellement la maturation

des hiPSC-CMs. Nous avons donc généré des lignées stables d'hiPSCs à partir desquelles nous avons différencié des CMs qui expriment de manière inductible, individuellement ou simultanément, *KCNJ2* et *CASQ2*. Nous avons examiné leurs phénotypes fonctionnels et électrophysiologiques à l'aide de différentes méthodes d'analyses complémentaires. Nous avons ensuite évalué le bénéfice fonctionnel de l'expression de ces transgènes en testant des molécules agonistes ou antagonistes de canaux ioniques utilisées classiquement comme références dans le cadre des essais précliniques de toxicité cardiaque.

Parallèlement, mon travail de thèse a contribué à développer une approche pour améliorer l'efficacité d'intégration ciblée de transgènes à l'aide du système CRISPR/Cas9 en évaluant dans les hiPSCs une nouvelle variante de la protéine Cas9 fusionnée à un domaine de CtIP, une protéine impliquée dans la réparation de l'ADN par recombinaison homologue.

Cette thèse a été réalisée sous l'encadrement du Dr Jean-Michel Itier (Sanofi, Vitry-sur-Seine) et du Dr Jean-Paul Concordet (Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris) dans le cadre d'une Convention Industrielle de Formation par la Recherche (CIFRE). L'équipe du Dr Jean-Michel Itier développe des modèles translationnels de maladies humaines et utilise notamment les hiPSC-CMs pour, modéliser *in vitro* des pathologies cardiaques, identifier et valider de nouvelles approches thérapeutiques. Le laboratoire du Dr Jean-Paul Concordet et du Dr Carine Giovannangeli étudie les voies de réparation des cassures double brin de l'ADN afin d'améliorer les stratégies d'édition du génome par le biais de nucléases artificielles programmables.

Introduction

Dans l'introduction de ma thèse, j'aborderai le thème des cellules souches pluripotentes induites humaines et des cardiomyocytes dérivés de ces dernières, ensuite j'évoquerai les différents aspects de la différenciation des cardiomyocytes dérivés des cellules souches pluripotentes induites humaines ainsi que les approches qui ont été développées pour améliorer leur maturation puis je présenterai les gènes *KCNJ2* et *CASQ2*. Enfin, je décrirai les principes de l'édition du génome avec le système CRISPR/Cas9.

I. Les cardiomyocytes dérivés des cellules souches pluripotentes induites humaines

I.1 Les cellules souches

Les cellules souches sont définies comme étant des cellules capables à la fois de s'autorenouveler et de se différencier en cellule spécialisée. Il existe deux types de cellules souches dans l'organisme humain, les cellules souches embryonnaires humaines (hESCs) et les cellules souches adultes (ASCs) (de Wert and Mummery, 2003). Les hESCs sont dérivées de la masse cellulaire interne des blastocytes cinq jours après une fécondation *in vitro* de l'ovocyte (Thomson et al., 1998). Ces cellules sont pluripotentes, ce qui signifie qu'elles sont capables de générer tous les tissus humains mais contrairement aux cellules souches totipotentes, elles ne peuvent pas donner naissance aux tissus extra-embryonnaires tels que le placenta ou le cordon ombilical. En 1998, deux équipes de recherches ont réussi à cultiver et caractériser les hESCs (Shamblott et al., 1998; Thomson et al., 1998). Leurs propriétés de pluripotence ont été mises en évidence *in vitro* par l'expression de la phosphatase alcaline, l'expression des marqueurs spécifiques SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, un caryotype intact ainsi que la capacité à se différencier vers les trois feuilletts embryonnaires : le mésoderme, l'endoderme et l'ectoderme. Malgré leur potentialité, l'utilisation des hESCs pour la recherche fondamentale et biomédicale soulèvent de nombreuses questions éthiques dans la mesure où leurs prélèvements nécessitent la destruction d'un embryon humain.

Quant aux ASCs, on les retrouve dans différents tissus, comme le cerveau (Ma et al., 2009), le muscle squelettique (Cooper et al., 2006) ou la moelle osseuse (Kumar et al., 2019). Elles contribuent au renouvellement naturel des cellules (comme, par exemple, les cellules souches hématopoïétiques) ou à la réparation du tissu après son altération en restant quiescentes tant qu'elles ne sont pas activées. La présence de cellules souches dans le cœur a été controversée chez l'homme (Lázár et al., 2017). Il est maintenant admis qu'il n'existe pas de démonstration de leur existence au cours du développement ou chez l'adulte (Sadek and Olson, 2020)

1.2 La reprogrammation cellulaire

Pendant longtemps, il était admis que la différenciation cellulaire était un processus unidirectionnel où l'on passait irréversiblement d'un état pluripotent à un état différencié. Ce paradigme pouvait être représenté par le diagramme de Conrad Waddington qui dépeignait le développement cellulaire comme une balle roulant du sommet d'une montagne jusqu'à arriver au pied de la vallée (Figure 1A). Cependant, de nombreuses expériences réalisées au cours de la deuxième moitié du XXe siècle, allant du transfert d'un noyau somatique dans l'ovocyte énucléé de xénope (Gurdon, 1962) jusqu'au clonage de la brebis Dolly (Wilmut et al., 1997), ont montré que tous les gènes nécessaires pour obtenir un organisme entier étaient conservés dans le noyau d'une cellule spécialisée et pouvaient être activés lors d'une exposition à des facteurs de reprogrammation présents dans un ovocyte. Il découlait de ces résultats que, d'une part, la spécialisation des cellules adultes trouvait son origine dans la modification de l'expression de gènes et non pas dans le changement du contenu du génome, et que d'autre part, le processus de différenciation pouvait être inversé (Figure 1B). La découverte du facteur de détermination myogénique MyoD et sa capacité à convertir des cellules différenciées en myoblastes a montré qu'il était aussi possible de changer d'état de différenciation selon un processus de transdifférenciation (Tapscott et al., 1988) (Figure 1C). Par la suite, en 2006, une avancée majeure a été apportée par le groupe de Shinya Yamanaka, en montrant que la surexpression de quatre facteurs de transcription permet de reprogrammer des fibroblastes en cellules pluripotentes (Takahashi and Yamanaka, 2006). Ces cellules ont été nommées cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) et les quatre facteurs - OCT4, SOX2, KLF4 et c-MYC - ont été nommés les facteurs de Yamanaka (Figure 1B). Les iPSCs possèdent les mêmes propriétés que les ESCs telles que l'expression des marqueurs de pluripotence, la capacité à former des tératomes composés de cellules dérivés des trois feuilletts embryonnaires lorsqu'elles sont greffées dans des souris *nude* et

l'aptitude à contribuer au développement d'un embryon lorsqu'elles sont injectées dans un blastocyste hôte. Un an plus tard, les équipes de Shinya Yamanaka et James E. Thomson sont parvenues à reprogrammer des fibroblastes humains en hiPSCs (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007).



Figure 1. Chemins de la différenciation, reprogrammation et transdifférenciation cellulaire (Baedke, 2013)

(A) Processus de différenciation cellulaire au cours du développement embryonnaire (B) Au cours de la reprogrammation cellulaire, des cellules souches pluripotentes induites sont formées (balle grise). (C) Une cellule mature est dédifférenciée vers un stade progéniteur (balle grise) ou directement transdifférenciée en une autre cellule mature (balle blanche). (B) et (C) montrent des processus expérimentalement induits.

Cette découverte a ouvert des perspectives considérables pour la recherche biomédicale. Dans l'optique d'une utilisation des cellules dérivées des hiPSCs pour la médecine régénérative et la médecine personnalisée, de nombreuses méthodes ont ainsi été développées pour que les cellules n'intègrent pas de manière stable les facteurs de reprogrammation en utilisant par exemple des virus Sendai non intégratifs (Fusaki et al., 2009), des vecteurs épisomaux (Yu et al., 2009) ou via la transfection du cocktail des facteurs de Yamanaka sous forme d'ARNm (Warren et al., 2010) ou de protéines recombinantes (Kim et al., 2009). Du fait de leurs nombreux avantages tels que leur origine humaine, leur relative facilité de génération, leur aptitude quasi-illimitée de prolifération ainsi que leur capacité à se différencier vers la majorité des types cellulaires humains, leur utilisation est très prisée pour les applications biomédicales comme la modélisation de maladies, le criblage de molécules thérapeutiques ainsi que pour la toxicologie prédictive et la médecine régénérative (Bellin et al., 2012). De plus, dans l'optique de la création de modèles cellulaires de maladies d'origine génétique, elles présentent même un avantage par rapport aux hESCs puisqu'il est possible d'obtenir des cellules d'un patient porteur des

anomalies génétiques responsables de la maladie.

La différenciation des hiPSCs vers un nombre toujours croissant de types cellulaires différents de même que leurs utilisations en recherche biomédicale font l'objet de très nombreux travaux (Avior et al., 2016; Passier et al., 2016; Rowe and Daley, 2019). La description de la différenciation cellulaire de ces cellules et de leurs applications potentielles sera focalisée ci-après sur les CMs dérivés d'hiPSCs (hiPSC-CMs).

I.3 La différenciation cardiaque *in vivo*

L'étude du développement embryonnaire *in vivo* dans les modèles animaux, notamment chez la souris, a permis de mettre en évidence les cascades temporelles d'expressions de gènes et de signalisations impliquées dans la différenciation des CMs. Le mésoderme cardiaque se met en place lors de la gastrulation pour donner naissance à deux populations de progéniteurs cardiaques formant le premier et le second champ cardiaque (FHF et SHF). Ces progéniteurs participent à un ensemble de processus morphogénétiques complexes. Le FHF forme le croissant cardiaque à E7.5, soit l'équivalent de la deuxième semaine du développement embryonnaire chez l'homme (Figure 2A) et donne naissance au tube cardiaque primitif à E8.0 (troisième semaine du développement embryonnaire chez l'homme) par migration vers la ligne médiane ventrale. Le tube cardiaque possède deux extrémités : un pôle artériel situé antérieurement et un pôle veineux situé postérieurement. Les cellules du SHF, situées dorsalement au tube cardiaque, participent alors à son élongation par addition progressive de progéniteurs au niveau des deux pôles (Figure 2B). A E8.5, le tube cardiaque, va se courber vers la droite ce qui contribue au début du positionnement correct des chambres cardiaques dans le cœur embryonnaire. Cette étape a lieu lors de la quatrième semaine de développement chez l'homme (Figure 2C). A E10.5, les cellules de la crête neurale cardiaque migrent des arcs pharyngés vers le pôle artériel pour participer à la séparation de l'aorte, du tronc pulmonaire et à la formation des structures dérivées des arcs pharyngés (Figure 2D). Enfin, le développement cardiaque implique une série d'événements de cloisonnement (et de trabéculatation myocardique) qui se traduit par un cœur à quatre chambres intégrées au système circulatoire observable à E15,5 (septième semaine de gestation chez l'homme) (Figure 2E) (Brade et al., 2013)

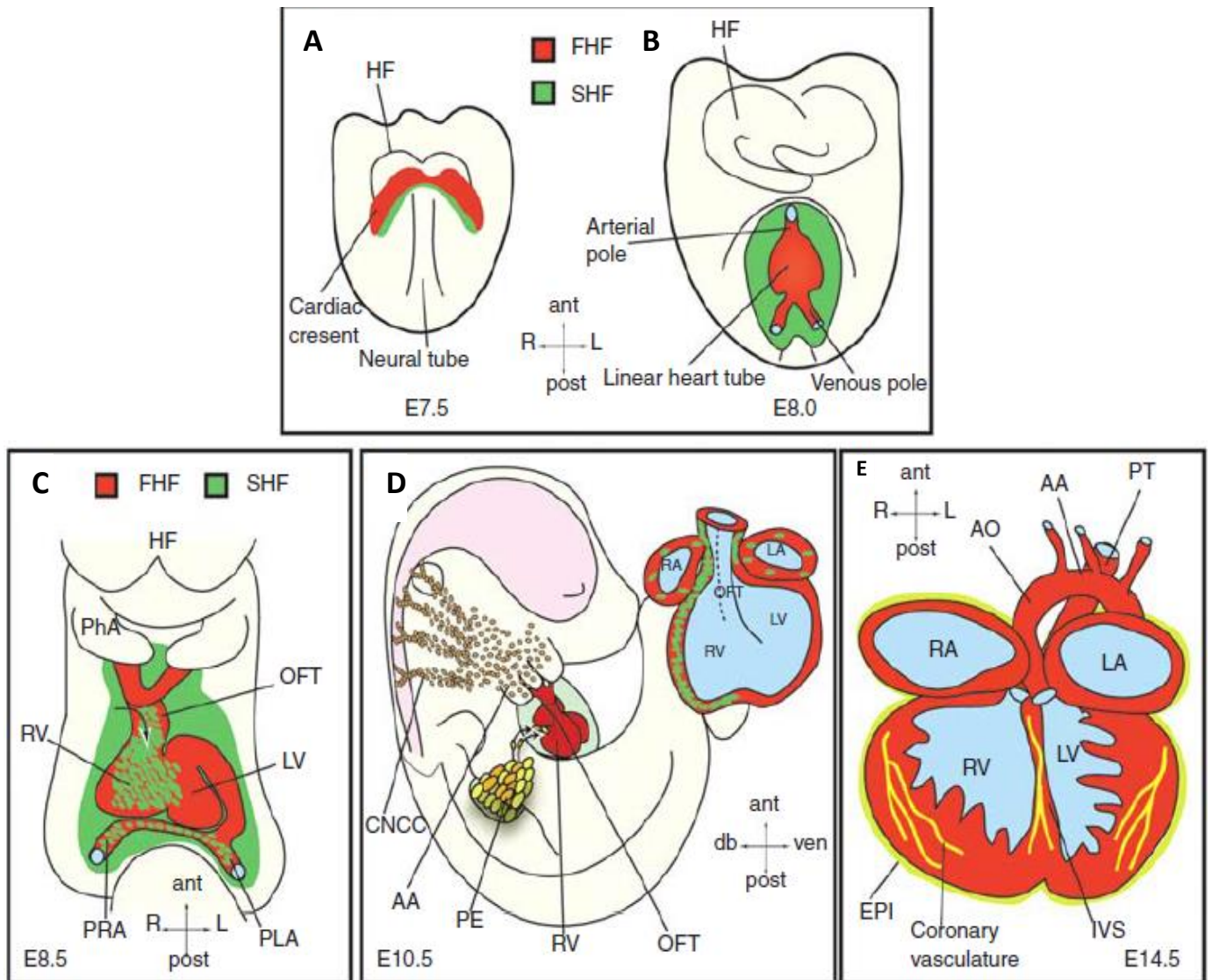


Figure 2. Développement cardiaque embryonnaire chez la souris (Brade et al., 2013)
Abréviations: AA (arc aortique); ant (antérieur); AO (aorte dorsale); CNCC (cellules de la crête neurale cardiaque); db (dorsal); EPI (epicardium); FHF (premier champ cardiaque); HF (*headfolds*); IVS (septum interventriculaire); L (gauche); LA (oreillette gauche); LV (ventricule gauche); OFT (chambre de chasse); PE (proepicardium); PhA (arcs pharyngés); PLA (oreillette gauche primitive); post (postérieur); PRA (oreillette droite primitive); PT (tronc pulmonaire); R (droite); RA (oreillette droite); RV (ventricule droit); SHF (second champ cardiaque); ven (ventral).

Au cours de ces processus, les progéniteurs cardiaques sont exposés à de nombreux facteurs sécrétés et expriment plusieurs facteurs de transcription spécifiques des différentes étapes de différenciation. Ainsi, les cellules du FHF sont exposées aux cytokines de la voie *Bone Morphogenetic Protein* (BMP) (Schultheiss et al., 1997) et *Fibroblast Growth Factor* (FGF) (Reifers et al., 2000) ainsi qu'aux inhibiteurs de la voie *Wingless-related Integration*

site (Wnt) (Nosedá Michela et al., 2011) entraînant la différenciation cardiaque marquée par l'expression de régulateurs clés, à savoir Nkx2.5 (Lints et al., 1993), Gata-4 (Arceci et al., 1993; Heikinheimo et al., 1994; Zeisberg et al., 2005) et Tbx5 (Harvey, 2002). Le développement des cellules du SHF est, quant à lui, contrôlé par de nombreuses voies de signalisation différentes. Parmi eux, la signalisation FGF dans le SHF favorise la prolifération des cellules progénitrices. Les signaux stimulant la voie *Sonic hedgehog* (Shh) (sécrétés par l'endoderme) et la signalisation canonique Wnt (médiée par le tube neural) sont importants pour le maintien d'un état prolifératif et l'inhibition de la différenciation (Kelly, 2012). Ensuite, les facteurs BMP (sécrétés par le mésoderme de la plaque latérale) ainsi que les signaux Notch et Wnt non canoniques favorisent la différenciation cardiaque des cellules du SHF (Vincent and Buckingham, 2010).

1.4 La différenciation *in vitro* des hPSCs vers le lignage cardiaque

Les protocoles de différenciation cardiaque des hPSCs récapitulent la cascade de signalisation du développement embryonnaire du cœur (Figure 3).

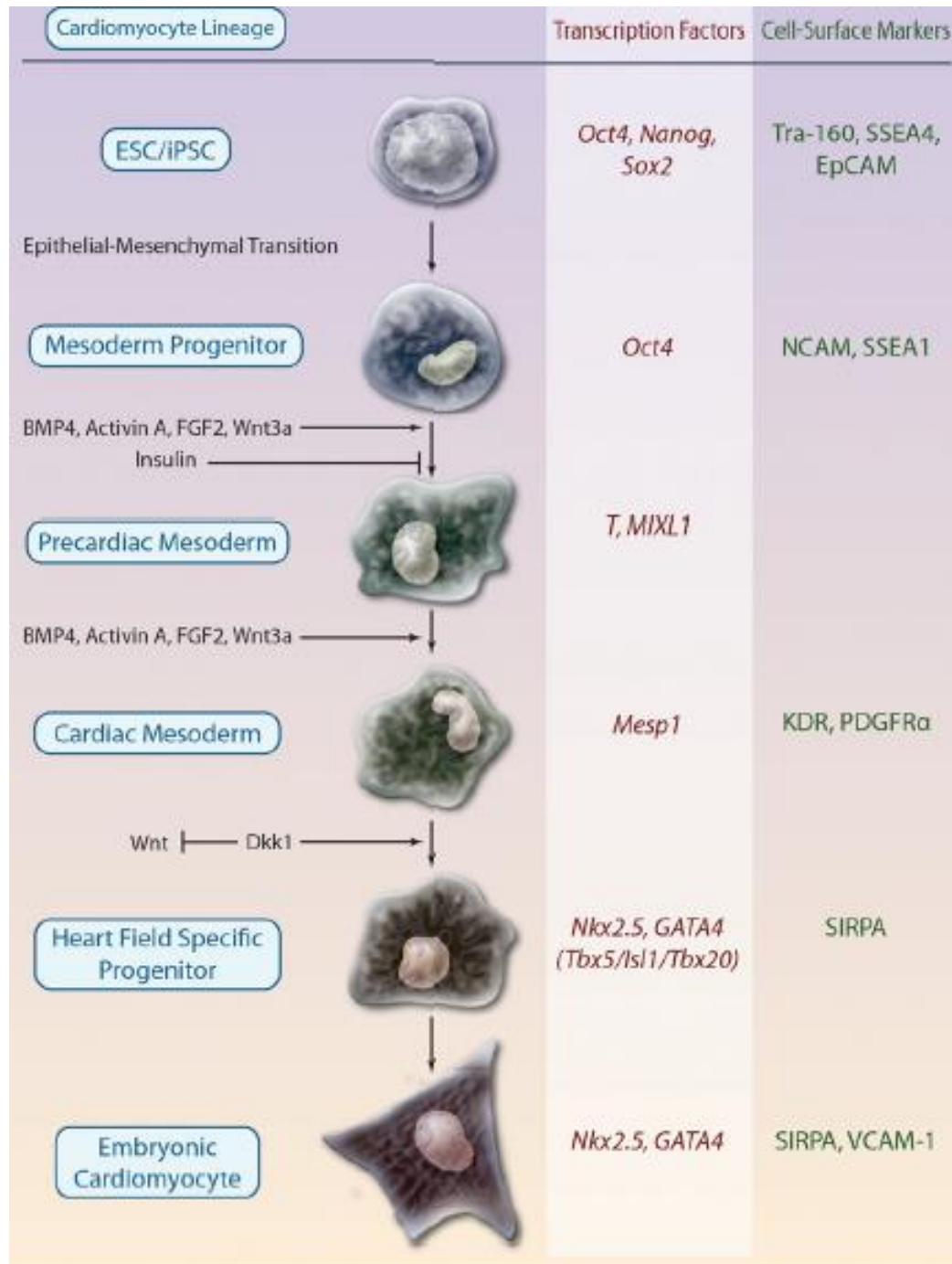


Figure 3. La différenciation *in vitro* des hPSCs en CMs récapitule le développement embryonnaire cardiaque (Mummery et al., 2012)

Le tableau récapitule les différentes étapes de différenciation des hPSCs en CMs en indiquant les facteurs de transcription et marqueurs de surface spécifiques de chaque étape. Indépendamment du protocole utilisé, la différenciation cardiaque *in vitro* des hPSCs implique cinq étapes durant lesquelles la concentration et la durée de traitement avec les différentes cytokines sont cruciales : i) transition du stade hiPSC au stade de progéniteur mésodermique faisant intervenir la transition épithélio-mésenchymateuse ii) passage de progéniteur mésodermique vers une cellule du mésoderme précardiaque iii) Spécification de la cellule du mésoderme précardiaque en cellule du mésoderme cardiaque iv) Spécialisation de la cellule mésodermale cardiaque en cellule progénitrice cardiaque v) Passage d'une cellule progénitrice cardiaque vers un CM immature. La différenciation

cardiaque *in vitro* reflète fidèlement le développement *in vivo* en ce qui concerne les marqueurs d'expression qui sont utilisés pour distinguer les différentes étapes de la différenciation.

Au cours des deux dernières décennies, de nombreuses méthodes de différenciation *in vitro* ont été développées afin d'obtenir des cellules cardiaques à partir d'hPSCs. Les trois méthodes principales sont 1) la formation de corps embryoides (EBs) 2) la culture en monocouche cellulaire et 3) la coculture avec des cellules END2 de type endodermique (Figure 4).

Chacune de ces méthodes a des avantages et des inconvénients qui doivent être pris en compte pour choisir le protocole adéquat à l'objectif fixé. D'une part, les approches basées sur la culture en monocouche présentent des avantages pratiques car elles sont techniquement plus faciles à réaliser, elles dispensent des étapes d'agrégation et de réensemencement des cellules et elles permettent une exposition homogène aux facteurs de différenciation. D'autre part, les approches basées sur les EBs fournissent aux cellules un contexte 3D qui reproduit de manière plus fidèle l'environnement du développement embryonnaire.

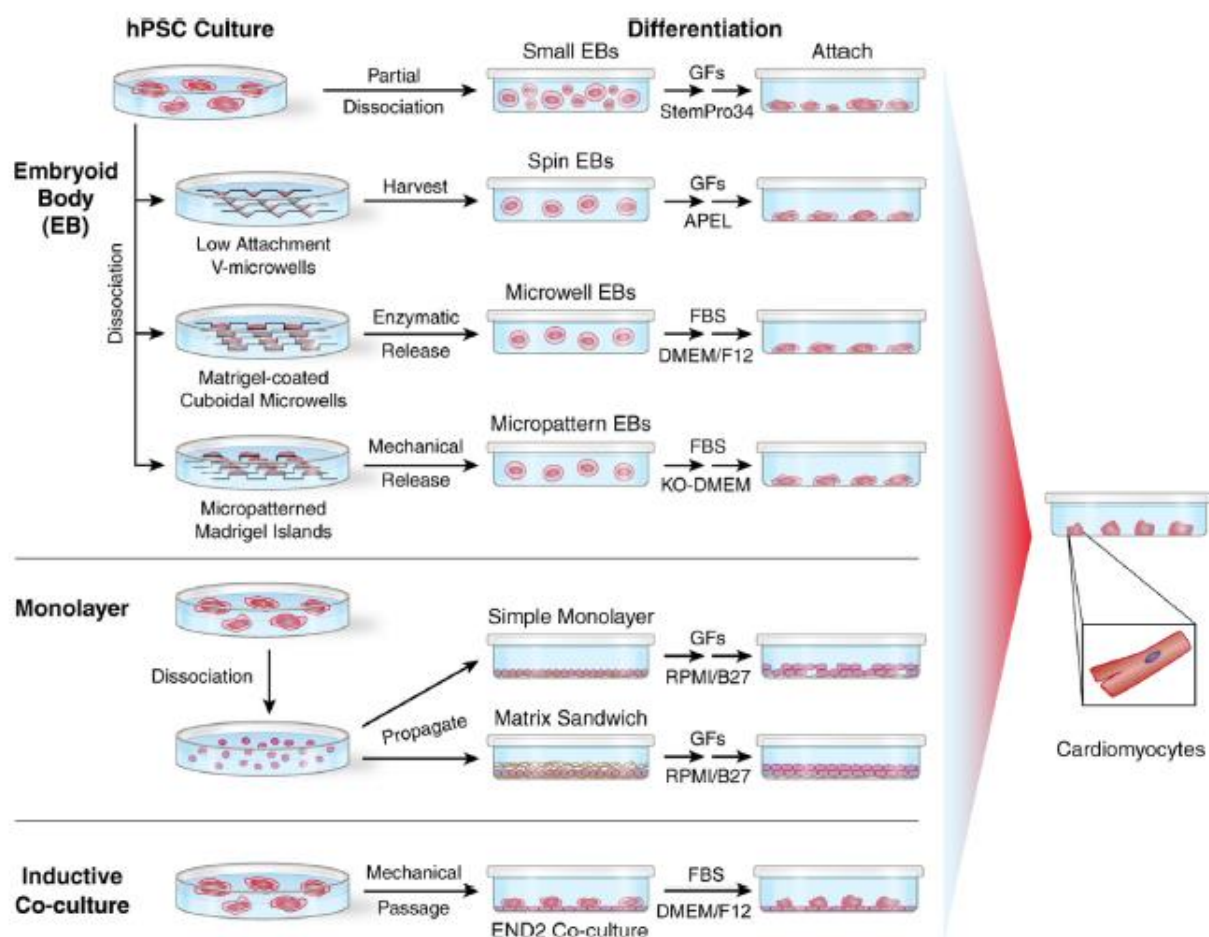


Figure 4. Principales méthodes de différenciation cardiaque à partir d'hPSCs (Mummery et al., 2012)

Les trois approches principales de différenciation des cellules souches pluripotentes humaines (hPSCs) en CMs sont : la formation de corps embryoides (EB), la culture en monocouche et la co-culture avec des cellules de type endodermique (END2).

Abréviations : GF (facteurs de croissance), APEL (albumine, alcool polyvinyl, lipides essentiels), DMEM/F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12*), FBS (Sérum de Veau Foetal), KO (*knockout serum*), RPMI (*Roswell Park Memorial Institute Medium*).

Concernant les protocoles basés sur la coculture, Mummery et ses collaborateurs ont montré que la coculture des hESCs avec les cellules endodermiques END2 ou la culture dans un milieu conditionné par les cellules END2 permet la différenciation en CMs avec une efficacité d'environ 25% au bout de 10 jours (Mummery et al., 2007). Les facteurs sécrétés provenant des cellules END2 contiennent notamment les facteurs cardiogéniques TGF- β , FGF et le BMP2. Ce protocole nécessite l'absence d'insuline dans le milieu de culture pour ne pas favoriser la différenciation des hESCs vers le lignage neuroectodermale (Freund et al., 2008).

Par ailleurs, les méthodes pour générer des CMs à partir d'EBs sont nombreuses, allant de la dissociation partielle des colonies de hPSCs par traitement enzymatique qui produit une population de sphéroïdes de tailles hétérogènes et peu reproductibles (He Jia-Qiang et al., 2003), à des méthodes plus précises pour maîtriser le nombre et la taille des EBs telles que le recours à la centrifugation afin de forcer l'agrégation des colonies de hPSCs dans des micro-puits (Burridge et al., 2007) ou l'ensemencement des colonies hPSCs dans des micro-puits préparés avec un revêtement de matrigel (Mohr et al., 2010) (Figure 4). Ces dernières méthodes permettent d'obtenir des corps embryoïdes avec un nombre de cellules déterminé qui est propice à la différenciation efficace vers le lignage cardiaque. Ensuite, la modulation précise de l'induction vers le mésoderme suivie par la différenciation cardiaque précoce est réalisée par l'application séquentielle des facteurs de croissance qui régulent les quatre voies de signalisation impliquées dans le développement cardiaque : les voies de signalisation BMP, *Transforming growth factor-β* (TGF-β, incluant activine et Nodal), Wnt et FGF (Mummery et al., 2012). Les cellules passent par les étapes spécifiques de différenciation comprenant la formation du mésoderme, la spécification du mésoderme cardiaque et enfin la spécialisation vers le lignage cardiaque. Par exemple, Yang et ses collègues ont développé un protocole qui permet d'obtenir 40% de CMs à partir d'hESCs ou d'hiPSCs (Yang et al., 2008). Brièvement, les corps embryoïdes sont cultivés dans un milieu sans sérum supplémenté en BMP4 pendant 24 heures. Puis, l'activine A et le bFGF sont ajoutés au milieu de culture. Les cellules sont cultivées pendant trois jours dans ce milieu pour induire la formation du mésoderme. Les cellules sont ensuite traitées avec l'inhibiteur de Wnt *Dickkopf-related protein-1* (DKK1), le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) ainsi que le bFGF pendant 6 jours pour induire l'expansion de la lignée cardiovasculaire (Figure 5D).

Du fait de l'expertise technique requise pour ces protocoles basés sur les EBs et du coût des facteurs de croissance, des équipes de recherches sont parvenues à mettre au point des approches alternatives avec des traitements par des petites molécules pour récapituler les voies de signalisation impliquées dans la cardiogenèse (Burridge et al., 2014; Ren et al., 2011). Par exemple, Lian et ses collègues ont développé un protocole de différenciation cardiaque basé sur la modulation temporelle de la voie de signalisation Wnt avec la petite molécule CHIR99021, qui est un inhibiteur de la *Glycogene Synthase Kinase 3β* (GSK3β), suivie de l'inhibition de cette même voie par la petite molécule *Inhibitor of Wnt production 2* (IWP-2). En bref, les hiPSCs, cultivées en monocouche, sont traitées avec la molécule CHIR99021 pendant 24 heures. Ensuite, les cellules sont traitées avec l'inhibiteur IWP2

pendant 48 heures. Selon les lignées d'hiPSCs utilisées, des cultures composées de 89% à 95% de CMs ont pu être obtenues (Lian et al., 2013) (Figure 5E).

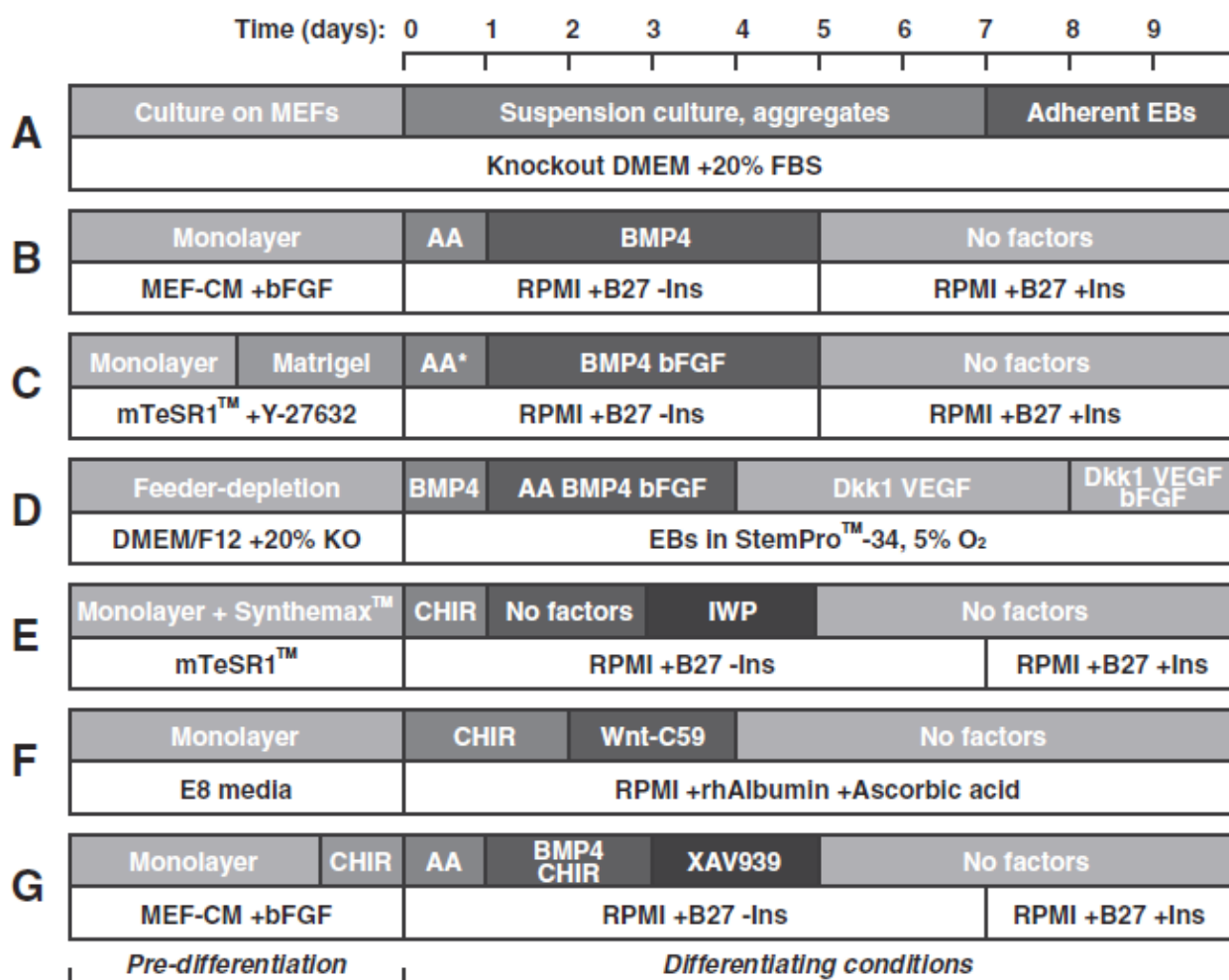


Figure 5. Méthodes les plus fréquemment utilisées pour obtenir des CMs à partir d'hESCs et d'hiPSCs (Hartman et al., 2016)

La barre supérieure de chaque protocole indique les facteurs spécifiques et les conditions de culture utilisées, tandis que la barre inférieure représente les milieux de culture et les compléments utilisés. Ces différentes interventions sont représentées selon une chronologie précise (le jour 0 indiquant l'induction initiale de la différenciation cardiaque).

Abréviations : AA (activine A), AA * (activine A avec Matrigel), BMP4 (Bone Morphogenetic Protein 4), bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), CHIR (CHIR99021, inhibiteur de la glycogène synthase kinase 3 β), Dkk1 (*Dickkopf-related protein 1*); DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), FBS (Sérum de Veau Fœtal), IWP (inhibiteur de la protéine Wnt), KO (*knockout serum*), MEF (fibroblastes embryonnaires de souris), MEF-CM (milieu conditionné de MEF), RPMI (*Roswell Park Memorial Institute Medium*), VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), Wnt-C59 (inhibiteur de Wnt-3a), XAV939 (inhibiteur de la tankyrase), Y-27632 (inhibiteur des Rho kinases).

Pour toutes ces méthodes, les rendements en hiPSC-CMs peuvent varier d'une expérience à une autre et d'un expérimentateur à un autre. La découverte de marqueurs de surface spécifiques des CMs tels que SIRPA (aussi connu sous le nom de SHPS-1 ou CD172a, Dubois et al., 2011) ou VCAM1 (aussi connu sous le nom de CD106, Uosaki et al., 2011) permet d'isoler les CMs, au sein de la population cellulaire qui a subi le processus de différenciation, par tri cellulaire. Par ailleurs, une autre méthode utilisée pour la purification des hPSC-CMs est basée sur la modification génétique des hPSCs afin de gouverner l'expression d'un gène de résistance à un antibiotique ou d'un gène rapporteur fluorescent par le biais d'un promoteur cardiaque spécifique. L'enrichissement en hPSC-CMs peut ainsi être réalisé par un traitement antibiotique pour éliminer les cellules qui n'expriment pas le gène de résistance ou par un tri cellulaire afin d'isoler les cellules fluorescentes. Plusieurs études ont rapporté l'utilisation de divers promoteurs cardiaques spécifiques tels que *NKX2.5* (Elliot et al., 2011), *MYH6* (Ma et al., 2011; Ritner et al. 2011) ou encore *MYL2* (Bizy et al., 2013 ; Huber et al., 2007). Enfin, Tohyama et ses collègues ont développé une méthode élégante de purification des hPSC-CMs en se basant uniquement sur les propriétés métaboliques des CMs (Tohyama et al., 2013). En effet, les auteurs ont observé que lorsque des cellules dérivées de hPSC étaient cultivées dans un milieu contenant du lactate et dépourvu de glucose, seuls les hPSC-CMs survivaient et ils obtenaient ainsi des populations pures à 99%.

1.5 La différenciation des hiPSCs en différents sous-types de CMs et autres types cellulaires cardiaques

Les hiPSC-CMs obtenus à partir des différents protocoles décrits ci-dessus conduisent à un mélange en proportions variables de CMs de type ventriculaire, auriculaire ou nodal (cellules du noeud sinusal et cellules du noeud atrio-ventriculaire), qui peuvent être caractérisés par leurs signatures électrophysiologiques, ainsi que d'autres types cellulaires cardiaques telles que des cellules endothéliales ou des cellules musculaires lisses. De ce fait, l'optimisation des protocoles pour orienter la différenciation cellulaire vers des sous-types cardiaques spécifiques a fait l'objet de nombreuses investigations au cours de ces dernières années. La régulation précise de la différenciation cardiaque vers un sous-type spécifique de CMs pourrait, en effet, être cruciale pour plusieurs applications translationnelles des hiPSC-CMs.

I.5.1 Différenciation en CMs ventriculaires ou auriculaires.

La plupart des protocoles produisent majoritairement des CMs ventriculaires du fait de l'absence d'acide rétinoïque dans le milieu de culture. En effet, plusieurs études ont démontré que l'acide rétinoïque permet d'induire la spécialisation vers le lignage auriculaire (Devalla et al., 2015; Zhang et al., 2011). De plus, Lee *et al.* ont mis en évidence la fenêtre temporelle (entre J3 et J5) au cours de laquelle l'acide rétinoïque induisait cette spécification. Cette étude a montré que les CMs ventriculaires et auriculaires dérivent de deux sous-populations mésodermes identifiables respectivement par l'expression de CD235A et de la rétinoldehydrogène 2 (RALDH2). Ils ont également montré qu'il était possible d'augmenter la proportion de CMs ventriculaires au sein des progéniteurs cardiaques CD235A+ en augmentant le ratio Activin A/BMP4 lors du 4^e jour de différenciation cardiaque (Lee et al., 2017) (Figure 7).

Ainsi, des cultures pures en CMs ventriculaires, dépourvues de CMs atriaux et de cellules du tissu nodal, constituerait la population candidate idéale pour développer des thérapies cellulaires visant à remuscler la paroi ventriculaire chez les patients ayant souffert d'un infarctus du myocarde. En effet, l'élimination des CMs non-ventriculaires pourrait réduire les arythmies observées chez les modèles animaux après transplantation de populations mixtes de hPSC-CMs (Chong et al., 2014; Shiba et al., 2016).

Par ailleurs, le fait de pouvoir générer spécifiquement des CMs auriculaires pourrait aider à identifier de nouveaux médicaments pour traiter la fibrillation auriculaire. En effet, la fibrillation auriculaire est un trouble du rythme cardiaque caractérisé par une activité électrique anarchique et rapide des oreillettes, qui se traduit par la contraction désordonnée et inefficace de celles-ci. Il s'agit de l'arythmie cardiaque la plus fréquente dans le monde, affectant plus de 33 millions de personnes (Chugh Sumeet S. et al., 2014) et les traitements actuels sont limités (Eisen Alon et al., 2016). Dans la mesure où la fibrillation auriculaire est cliniquement associée à des changements morphologiques dans le myocarde auriculaire (Gupta et al., 2002), le fait de pouvoir reproduire la pathophysiologie de manière spécifique avec des hiPSC-CMs atriaux pourrait permettre d'identifier de nouvelles molécules thérapeutiques pour soigner ce type d'arythmie.

I.5.2 La différenciation des hiPSCs vers les CMs du système de conduction

Le système de conduction cardiaque est composé du nœud sinusal (ou sino-auriculaire, SAN), du nœud auriculo-ventriculaire (AVN), du faisceau de His et du réseau de Purkinje (Christoffels Vincent M. and Moorman Antoon F.M., 2009). Chacun de ces acteurs est constitué de CMs spécialisés qui fonctionnent de façon coordonnée pour contrôler les contractions du myocarde. Effectivement, le courant est initié par le SAN qui est situé au sommet de l'oreillette droite et se propage dans les oreillettes jusqu'à leur base déclenchant alors leur contraction. Ensuite, ces signaux électriques convergent vers l'AVN. Celui-ci va conduire l'influx électrique en direction des ventricules tout en le ralentissant afin de permettre aux chambres ventriculaires de se remplir avant leurs contractions. Ainsi le signal électrique chemine concomitamment dans les deux ventricules via des voies conductrices très rapides (le faisceau de His et le réseau de Purkinje), jusqu'à la pointe du cœur, provoquant la contraction des ventricules (Figure 6).

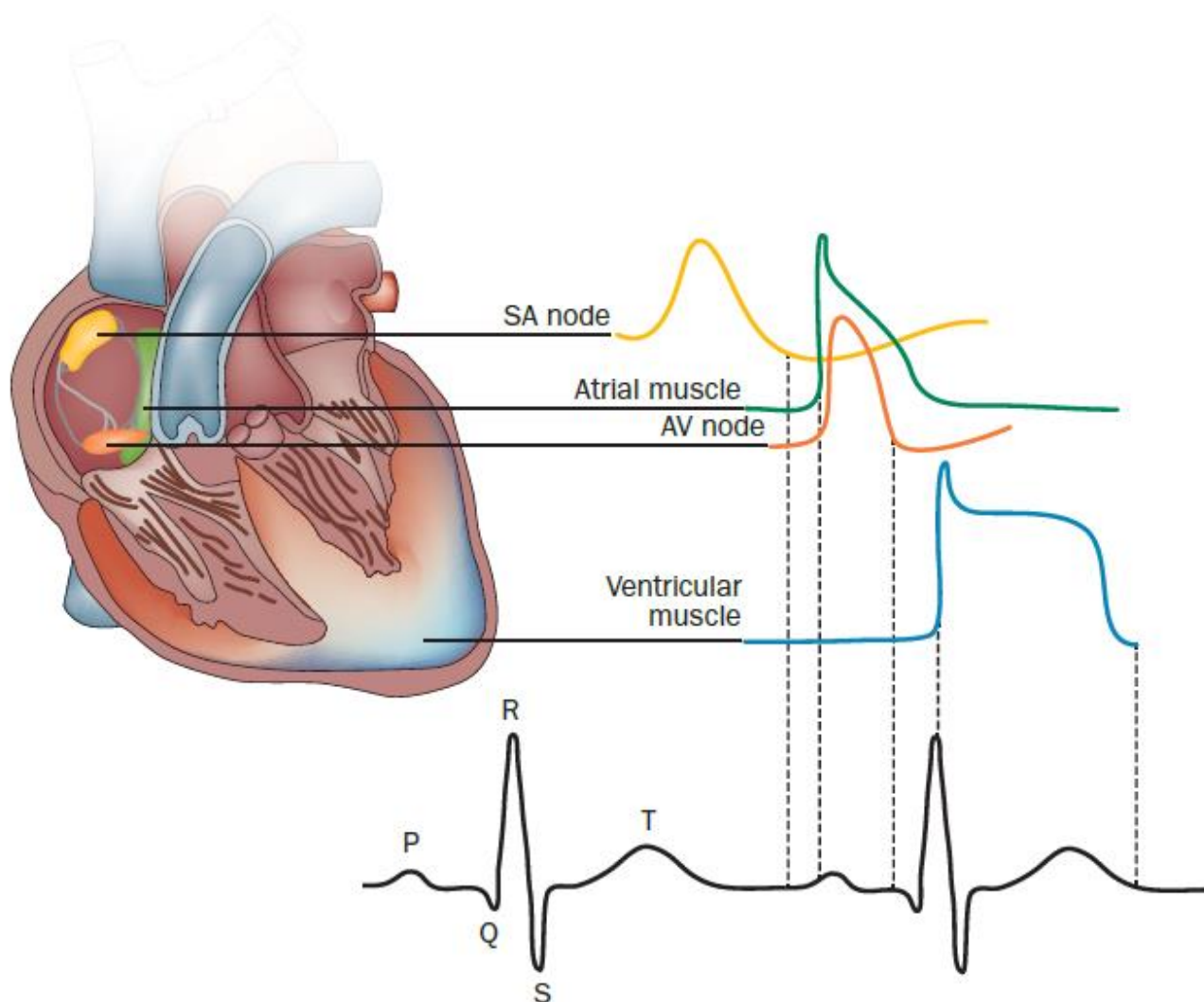


Figure 6. Représentation schématique du système de conduction cardiaque et de la corrélation entre les potentiels d'action des cardiomyocytes dans les différentes régions du cœur et l'électrocardiogramme de surface (Giudicessi and Ackerman, 2012)
Abréviations : SA node (noeud sino-auriculaire), AV node (nœud auriculo-ventriculaire).

La possibilité de pouvoir générer des CMs du système de conduction (ou cellules cardionectrices) à partir d'hiPSCs présente un grand intérêt pour la recherche biomédicale. En effet, cela pourrait permettre de développer des *pacemakers* biologiques afin de traiter les patients atteints de troubles du système de conduction. A l'heure actuelle, les travaux de recherche sur cet aspect de la différenciation cardiaque se sont concentrés sur la génération de cellules pacemaker du SAN à partir d'hiPSCs. Ainsi, Protze *et al.* sont parvenus à produire ces cellules en modulant l'activation des voies de signalisation BMP et de l'acide rétinoïque tout en inhibant celles de Nodal et du FGF lorsque les cellules sont induites vers le lignage mésodermique (Protze *et al.*, 2017) (Figure 7).

1.5.3 La différenciation des hiPSCs vers les autres types cellulaires constituant le cœur

Les CMs ne représentent que 30% du volume du cœur et ceux-ci sont en contact avec plusieurs populations cellulaires. En effet, le cœur est composé de l'épicarde, l'endocarde, de fibroblastes, de cellules musculaires lisses ou bien encore de cellules endothéliales.

L'épicarde est un feuillet épithélial qui entoure le cœur. Il est composé de CMs, de fibroblastes cardiaques, de cellules musculaires lisses et de cellules endothéliales (Katz *et al.*, 2012; Lie-Venema *et al.*, 2007). Ce tissu est nécessaire pour la formation du myocarde compact en favorisant notamment la prolifération des CMs (Brade *et al.*, 2011; Merki *et al.*, 2005). Il a été montré qu'il était possible de générer des fibroblastes cardiaques et des cellules musculaires lisses dérivant de l'épicarde, à partir d'hESCs et d'hiPSCs, en modulant les voies de signalisation FGF, TGF- β et *Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)* (Iyer *et al.*, 2015; Witty *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2016) (Figure 7).

L'endocarde correspond à une population cellulaire constituée de cellules endothéliales qui tapissent les oreillettes et les ventricules. Une étude récente a mis en

évidence la différenciation d'hiPSC en cellules spécifiques de ce tissu en utilisant différentes cytokines, notamment le VEGF, le FGF2 et le FGF8, qui spécialisaient les cellules du mésoderme cardiaque vers l'endocarde (Neri et al., 2019).

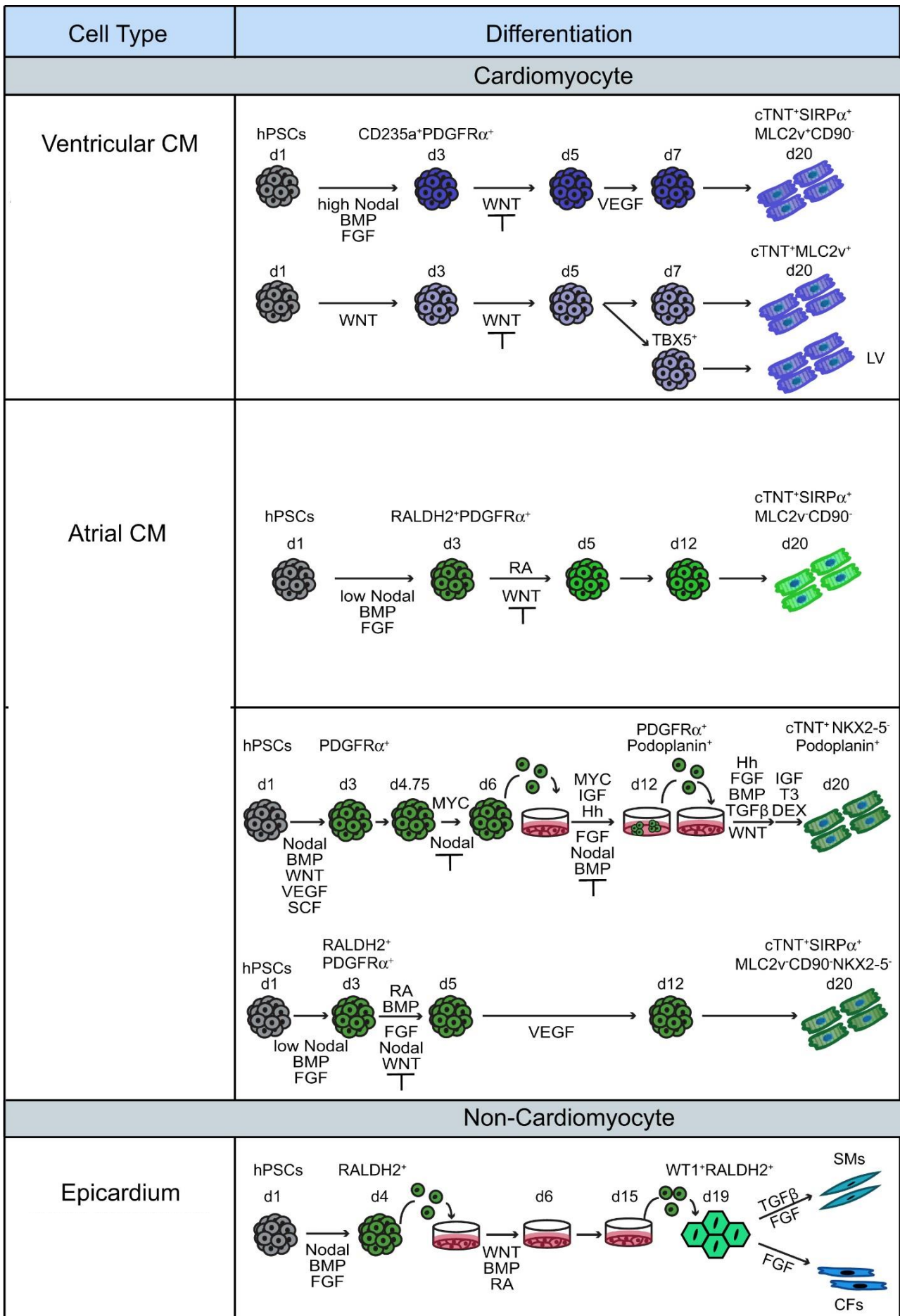


Figure 7. Protocoles de différenciation cellulaire utilisés pour générer les différents lignages cardiaques à partir d'hiPSCs (Protze et al., 2019)

Les marqueurs définis pour l'analyse cellulaire par cytométrie en flux sont mis en évidence au-dessus de chaque protocole.

Abréviations : BMP (Protéine Osseuse Morphogénétique / *Bone Morphogenetic Protein*), FGF (Facteur de croissance des fibroblastes / *Fibroblast Growth Factor*), VEGF (Facteur de Croissance de l'Endothélium Vasculaire / *Vascular Endothelial Growth Factor*), RA (Acide Rétinoïque), SCF (*Stem Cell Factor*), HH (Hedgehog), TGF β (Facteur de Croissance Transformant beta / *Transforming Growth Factor beta*), IGF (Facteur de Croissance ressemblant à l'Insuline / *Insulin-like Growth Factor*), T3 (Triiodothyronine), Dex (Dexaméthasone), LV (Ventricule Gauche), CFs (Fibroblastes Cardiaques), SMs (Muscles Lisses). APD30/90, (Durée du Potentiel d'Action à 30/90% de la repolarisation) , Vmax (pente ascendante du potentiel d'action / *Maximum Upstroke Velocity*), I_f (courant *funny*), I_{Na} (courant sodique), I_{KACH} (courant potassique activé par l'acétylcholine), I_{Kur} (courant potassique ultra rapide), I_{CaT} (courant calcique de type T).

Ces différentes populations cellulaires pourraient être utilisées pour récapituler des maladies cardiaques complexes qui impliquent plusieurs types cellulaires. En effet, certaines maladies cardiaques héréditaires telles que la dysplasie ventriculaire droite arythmogène (ARVD) peuvent avoir une étiologie indépendante des CMs. Des études ont suggéré que des altérations de l'épicarde pouvaient contribuer au phénotype de ces maladies (Corrado Domenico et al., 2016). Grâce à ces nouveaux protocoles, des modèles cellulaires hétérotypiques pourraient être générés pour modéliser ce type d'altération et ainsi permettre une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires de la pathologie.

1.6 L'utilisation des hiPSC-CMs pour la recherche biomédicale

1.6.1 Utilisation des hiPSC-CMs pour la modélisation de pathologies

La possibilité de générer des hiPSC-CMs à partir de cellules de patients a permis la modélisation *in vitro* de différents types de maladies cardiovasculaires humaines d'origine génétique (Brandão et al., 2017) Ces approches permettent ainsi de surmonter les problèmes liés aux modèles animaux murins qui présentent des divergences physiologiques importantes avec l'homme (Kaese and Verheule, 2012). Parmi ces différences, on retrouve notamment des rythmes cardiaques distincts (56 à 101 battements par minute pour l'homme contre 500 à 724 battements par minute pour la souris), des différences dans la contribution

des courants calciques et potassiques dans le potentiel d'action cardiaque (par exemple, l'intervalle QT, qui correspond à l'intervalle observé sur un électrocardiogramme entre la fin de la dépolarisation et la fin de la repolarisation ventriculaire, est compris entre 385 et 430 ms chez l'homme contre 29 à 109 ms chez la souris ; la vitesse de conduction ventriculaire d'environ 80 cm/s chez l'homme contre 30 à 60 cm/s chez la souris). De ce fait, les modèles murins de syndrome de long QT ne récapitulent pas les phénotypes retrouvés chez l'homme, en particulier les syndromes impliquant les courants potassiques (Salama and London, 2007).

Comme alternative à la souris, il est possible d'avoir recours à de grands animaux, tels que le chien, le cochon ou le singe pour la modélisation de maladies cardiaques. En effet, ces modèles sont physiologiquement et médicalement plus pertinents que les modèles murins et les méthodes de mesures de la fonction cardiaque réalisées sur l'homme sont transposables à ces modèles. Par exemple, du fait des grandes similarités entre le cœur humain et canin, notamment au niveau de l'électrophysiologie et du couplage excitation-contraction, certaines maladies cardiaques incluant l'ARVC (Basso et al., 2004), les cardiomyopathies dilatées (DCM, (Meurs et al., 2012)) et la myopathie de Duchenne (DMD, (Cassano et al., 2012; Howell et al., 1997)) ont pu être fidèlement modélisées avec différentes espèces de chiens (ex. Boxer, Golden Retriever, Doberman Pinscher). En revanche, l'utilisation de tels modèles est très onéreuse, nécessite des infrastructures spécialisées ainsi que des expérimentateurs qualifiés et leurs usages sont soumis à des dispositifs réglementaires stricts. De plus, il est plus difficile de retrouver des modèles de certaines maladies cardiaques humaines (ex. les syndromes du QT long et les tachycardies ventriculaires polymorphes catécholaminergiques) ou de générer des modèles transgéniques avec ces animaux.

Idéalement, les modèles expérimentaux doivent être peu onéreux, facilement manipulables et biologiquement représentatifs des maladies humaines tout en respectant l'éthique de l'expérimentation animale et humaine. Ainsi, l'émergence des hiPSCs représente une alternative sans précédent pour modéliser les maladies humaines. En effet, les premières lignées d'hiPSCs dérivées de patients ont été générées seulement un an après les travaux de recherche décrivant la reprogrammation des cellules somatiques humaines (Park et al., 2008) . Dès lors, les canalopathies (maladies dues à des mutations touchant les gènes codant pour les canaux ioniques) et les cardiomyopathies (pathologies dues à des mutations affectant les gènes codant pour les protéines des sarcomères et du

cytosquelette) ont pu être modélisées avec les hiPSC-CMs dans la mesure où les phénotypes associés peuvent être observés indépendamment de l'environnement de la cellule *in vivo*. Ainsi, plusieurs canalopathies héréditaires ont été étudiées en utilisant les modèles hiPSC-CMs : les syndromes du QT long (LQTS1 (Moretti et al., 2010); LQTS2 (Itzhaki et al., 2011); LQTS8 (Yazawa et al., 2011)) ou les syndromes du QT court (SQTS (Shinnawi et al., 2019)) le syndrome de Brugada (BrS (Liang et al., 2016)) et les tachycardies ventriculaires polymorphes catécholaminergiques (CPVT1 (Acimovic et al., 2018; Preininger et al., 2016) ; CPVT2 (Lodola et al., 2016)). De même, il a été possible de modéliser certaines cardiomyopathies telles que les DCM (Jelinkova et al., 2020; Sun et al., 2012; Wu et al., 2015), les cardiomyopathies hypertrophiques (HCM (Han et al., 2014; Lan et al., 2013)), ou bien encore bien encore certaines formes d'ARVD (Caspi Oren et al., 2013). Par ailleurs, d'autres types de maladies cardiaques ont aussi pu être modélisées telles que les maladies mitochondriales (ex. syndrome de Barth (G. Wang et al., 2014) ou les maladies lysosomiales (ex. maladie de Fabry (Itier et al., 2014)) (Figure 8). Enfin, une étude récente accessible sur *bioRxiv* est parvenue à récapituler les dommages causés par une infection par le *severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (SARS-CoV-2) sur les sarcomères et sur les noyaux que l'on retrouve dans les cœurs de patients, en utilisant des hiPSC-CMs (Pérez-Bermejo et al., 2020).

Néanmoins, certaines maladies cardiaques n'ont pu être modélisées qu'après l'amélioration de la maturation des hiPSC-CMs. Par exemple, les phénotypes pathologiques associés à une mutation du gène *MYBC3* dans certaines HCM (associée à une faible force de contraction (Birket et al., 2015)) ou à une mutation de la Plakophiline 2 dans un sous-type d'ARVD (associée à une augmentation de la lipogenèse caractérisée par l'accumulation de gouttelettes lipidiques et une apoptose accrue (Kim et al., 2013)) n'ont pu être observés dans les hiPSC-CMs qu'après l'induction de leur maturation. Ainsi, ces travaux montrent l'importance des modèles cellulaires dérivés d'hiPSC-CMs et soulignent le fait qu'une meilleure maturité de ces cellules devrait renforcer leur potentiel pour modéliser un éventail plus large de pathologies.

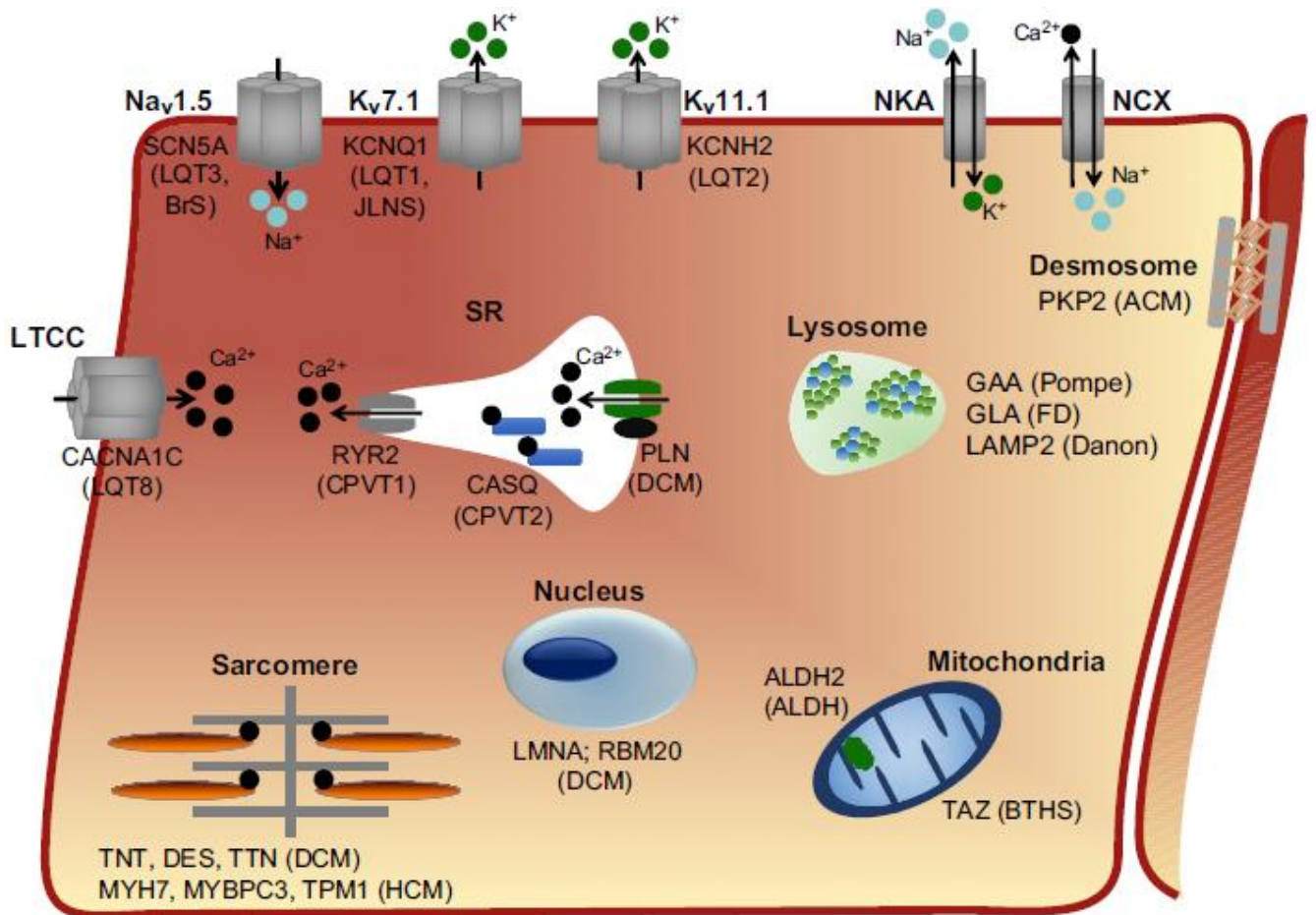


Figure 8. Aperçu des maladies congénitales cardiaques modélisées avec des hiPSC-CMs (Brandão et al., 2017)

La principale localisation cellulaire des protéines affectées dans chaque maladie est indiquée. Les maladies causées par des mutations dans les gènes associés sont indiquées entre parenthèses.

Abréviations : ACM (cardiomyopathie arythmogène), ALDH2 (Déficience en aldéhyde déshydrogénase mitochondriale), BrS (Syndrome de Brugada) , BTHS (Syndrome de Barth), CPVT (Tachycardie Ventriculaire Polymorphe Catécholaminergique), DCM (Cardiomyopathie Dilatée), FD (Maladie de Fabry), HCM (Cardiomyopathie Hypertrophique), JLNS (Syndrome de Jervell et Lange-Nielsen), LQT (Syndrome du QT long), Kv7.1 (canal K⁺ voltage-dépendant à rectification lente), Kv11.1 (canal K⁺ voltage-dépendant à rectification rapide), LTCC (canal Ca²⁺ de type L), Nav1.5 (canal Na⁺ cardiaque voltage-dépendant) NCX (échangeur Na⁺/Ca²⁺), NKA (échangeur Na⁺/K⁺).

1.6.2 Utilisation des hiPSC-CMs pour la découverte de molécules thérapeutiques

Outre le but de mieux comprendre les pathologies, l'un des principaux objectifs de la génération de modèles cellulaires ou animaux récapitulant les maladies humaines est de

développer des stratégies thérapeutiques et des traitements permettant de soigner ces maladies. Comme mentionné dans la partie précédente, même si les modèles animaux peuvent être utiles, de nombreuses maladies ne sont pas fidèlement reproduites avec ces modèles. De plus, il est difficile de réaliser des criblages de molécules thérapeutiques à haut débit ou d'utiliser de bibliothèques de molécules avec les modèles animaux. C'est pour ces raisons que l'utilisation des cellules dérivées d'hiPSCs présente un grand intérêt pour le criblage et l'identification de nouveaux médicaments dans le champ des maladies cardiaques (Avior et al., 2016; Engle and Vincent, 2014). De ce fait, lorsque la pathologie a été modélisée via un modèle cellulaire dérivé d'hiPSCs et que les mécanismes moléculaires ou cellulaires causant la pathologie ont été identifiés, des candidats médicaments peuvent être testés et leur potentiel thérapeutique directement évalué.

Une des premières études qui a été menée pour modéliser les maladies héréditaires du rythme cardiaque avec des hiPSC-CMs a été réalisée par le laboratoire de Lior Gepstein. En effet, Itzhaki et ses collègues ont modélisé une forme du syndrome de QT long de type 2 (LQTS2) en générant des hiPSC-CMs à partir de fibroblastes d'une patiente portant une mutation au niveau du gène *KCNH2*. Celui-ci code pour la sous unité α du canal *human ether-à-go-go-related gene* (hERG) et est impliqué dans la phase de repolarisation cardiaque. Les hiPSC-CMs issues de la patiente reproduisaient les phénotypes caractéristiques de ce syndrome tels que des durées de potentiels d'action prolongées et des arythmies de type *Early After Depolarization* (EAD). Ils ont alors montré que le Pinacidil, molécule qui ouvre le canal K^+_{ATP} et qui est prescrite dans les cas d'hypertension pour son effet vasodilatateur périphérique, diminuait de manière significative la durée de repolarisation et supprimaient les événements arythmiques dans les hiPSC-CMs issues de la patiente (Itzhaki et al., 2011).

Dans une autre étude, Maizels et ses collègues ont dérivé des cellules d'un patient portant la mutation D307H de la *CASQ2* pour modéliser une forme autosomale récessive de la tachycardie ventriculaire polymorphe catecholaminergique de type 2 (CPVT2). Ce modèle cellulaire a permis d'étudier les mécanismes de la pathogenèse de cette maladie et de trouver des traitements potentiels. Ces hiPSC-CMs récapitulaient les phénotypes pathologiques de la CPVT2 *in vitro* à savoir des dysfonctionnements de la gestion du calcium, marqués par des fuites de Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique (SR), ainsi que des arythmies accentuées par la stimulation adrénergique. En utilisant ce modèle cellulaire, ils ont pu cribler plusieurs molécules thérapeutiques (propranolol, labetalol, JTV519, carvedilol,

flecainide, et riluzole) et ils ont montré que le carvedilol (qui est un β -bloquant ainsi qu'un stabilisateur de RyR2) permettait de réduire significativement les fuites de Ca^{2+} ainsi que les événements arythmiques induits par des stimulations α et β -adrénergiques (Maizels Leonid et al., 2017).

Par ailleurs, les DCM étant l'un des sous-types de cardiomyopathies les plus fréquentes (Hershberger et al., 2013), de nombreuses investigations ont été menées pour identifier des molécules thérapeutiques à l'aide d'hiPSC-CMs (Hinson et al., 2015; Karakikes et al., 2015b). Par exemple, une étude a montré que des hiPSC-CMs avec la mutation R173W dans la protéine Troponine T2 (TNNT2) présentaient les principales caractéristiques des DCM incluant une gestion du calcium déficiente, un défaut dans les réponses inotropes et chronotropes positives à la suite d'une stimulation des récepteurs β adrénergiques par l'isoprotérénol (ce qui correspond respectivement à une augmentation de la force et de la fréquence de contraction) et un dysfonctionnement de la machinerie contractile. De plus, les auteurs ont découvert que cette mutation conduisait à la translocation nucléaire de la protéine TNNT2 et à une augmentation de l'expression des gènes codant pour les phosphodiésterases PDE2A and PDE3A. Ils ont alors démontré que l'inhibition pharmacologique de ces enzymes avec respectivement, le BAY 60-7550 et la milrinone, permettait de restaurer la régulation de la gestion du calcium ainsi que la force contractile dans les hiPSC-CMs TNNT2 R173W (Wu et al., 2015).

Enfin, malgré leur immaturité, les hiPSC-CMs dérivés de patients atteints de HCM ont également été utilisées pour rechercher des traitements contre ces pathologies (Bhagwan et al., 2020; Prondzynski et al., 2017). Par exemple, Han et ses collaborateurs ont généré un modèle cellulaire de HCM via des hiPSC-CMs générés à partir de fibroblastes de peau d'une patiente porteuse d'une mutation faux sens R442G dans la chaîne lourde β de la myosine (β -MHC codée par le gène *MYH7*). Ces cellules présentaient une augmentation de la taille ainsi qu'une désorganisation des sarcomères et des structures myofibrillaires. Au niveau fonctionnel, les auteurs ont observé la survenue d'événements arythmiques de manière plus fréquente que dans les hiPSC-CMs contrôles ainsi que des courants transitoires calciques irréguliers. En utilisant ces cellules pour évaluer les bénéfices thérapeutiques d'agents pharmacologiques, ils ont pu montrer que le verapamil réduisait l'apparition des arythmies et qu'un inhibiteur d'histones déacetylases, la Trichostatin A, réduisait la taille des cellules malades et améliorait la gestion du calcium (Han et al., 2014).

Les molécules décrites ci-dessus constituent des médicaments qui pourraient être bénéfiques pour les patients dans le cadre de repositionnement thérapeutique à condition d'apporter des améliorations pour une meilleure spécificité. Un exemple d'une telle approche a été publié pour un traitement contre la sclérose latérale amyotrophique (ALS). Wainger et ses collaborateurs ont découvert que des motoneurones dérivés d'hiPSCs de patients souffrant d'ALS présentaient une hyperexcitabilité ainsi qu'une survie diminuée. Ils ont montré que ces phénotypes pouvaient être corrigés par la rétigabine qui est un agoniste des canaux potassiques Kv7 déjà approuvé par la FDA pour les patients épileptiques (Wainger et al., 2014). Un an plus tard, ils ont directement lancé des essais cliniques de phase II sur 65 patients atteints d'ALS. Ainsi, en 2018, les résultats initiaux de cet essai ont montré que le traitement réduisait l'excitabilité des motoneurones chez ces patients (NCT02450552).

Par ailleurs, l'autre stratégie qui est utilisée pour identifier des molécules thérapeutiques est le criblage de molécules à haut débit. Contrairement à l'approche médicament-candidat, cette méthode ne nécessite pas de connaissances préalables du mécanisme pathogénique. Ainsi, des laboratoires pharmaceutiques, en collaboration avec des laboratoires académiques, ont criblé des bibliothèques de molécules afin d'identifier des solutions thérapeutiques pour traiter des maladies cardiovasculaires. Cette approche a notamment permis d'identifier la thapsigargine et le fluspirilène comme des médicaments potentiels pour traiter les cardiomyopathies diabétiques (Drawnel et al., 2014) ou bien des molécules pro-prolifératives qui pourraient être utilisées pour stimuler la régénération cardiaque (Mills et al., 2019).

1.6.3 Utilisation des hiPSC-CMs pour évaluer la toxicologie et l'innocuité des médicaments candidats

Les effets indésirables d'un médicament sur l'appareil cardiovasculaire constituent une des principales causes de son retrait de l'arsenal thérapeutique et sont à l'origine de la majorité des arrêts des essais cliniques d'une molécule en développement (Lavery et al., 2011). En particulier, les Torsades de Pointes constituent un des effets indésirables les plus redoutables. Il s'agit d'une forme particulière de tachycardie ventriculaire chez le patient présentant un allongement pathologique de l'intervalle QT. Cette forme de trouble du rythme peut s'arrêter spontanément ou dégénérer en fibrillation ventriculaire et causer la mort subite

du patient (Lawrence et al., 2006). L'allongement de l'intervalle QT induit par un médicament survient généralement du fait de l'inhibition du canal hERG qui détermine le courant I_{Kr} (Figure 9) (Moss and Kass, 2005). Actuellement, l'évaluation du risque de prolongation de l'intervalle QT constitue un des tests précliniques standards recommandés par le conseil international d'harmonisation des exigences techniques pour l'enregistrement des médicaments à usage humain (ICH) (Cavero and Crumb, 2005). De même, les études précliniques *in vitro* de sécurité du médicament peuvent également reposer sur l'évaluation de l'effet des molécules en développement sur le canal hERG en utilisant notamment des lignées cellulaires non cardiaques, telles que les cellules humaines de la lignée HEK293 (dérivée de rein embryonnaire) ou des cellules de rongeurs de la lignée CHO (issue d'ovaires de hamster), qui expriment le canal hERG de manière hétérologue (procédure préclinique ISC S7B). Cependant, cette méthode d'évaluation est réductionniste dans la mesure où la repolarisation est un phénomène qui implique plusieurs canaux ioniques et les molécules qui inhibent le canal hERG n'entraînent pas systématiquement un allongement de l'intervalle QT. Par exemple, le vérapamil, qui est un inhibiteur du canal hERG, ne provoque pas d'allongement cliniquement significatif de l'intervalle QT car il est aussi un inhibiteur du courant I_{CaL} du fait de son action bloquante sur le canal calcique Cav1.2 (Meyer et al., 2004). D'autre part, l'allongement de l'intervalle QT ne conduit pas toujours aux Torsades de Pointes (Extramiana et al., 2005). Du fait des limites de cette approche préclinique, la *Food and Drug Administration* (FDA) a mis en place le programme *Comprehensive in Vitro Proarrhythmia Assay* (CiPA) pour établir une évaluation préclinique de la sécurité des médicaments plus prédictive des risques d'arythmies (Sager et al., 2014). Elle repose notamment sur trois éléments 1) l'évaluation *in vitro* des effets d'un médicament sur les canaux ioniques humains exprimés individuellement de manière hétérologue dans une lignée cellulaire telle que les cellules HEK293 ou CHO, 2) l'intégration de ces informations dans un modèle *in silico* de myocyte ventriculaire humain pour évaluer le risque arythmogène, 3) l'évaluation des hiPSCs comme outils de dépistage des risques d'arythmies. De plus, ces cellules pourraient également offrir la possibilité de détecter les éventuels effets des molécules testées sur la gestion du calcium, le métabolisme cellulaire ou bien encore l'induction d'un stress oxydatif (Jung et al., 2012). Même si la validation des hiPSC-CMs en tant que modèles pour les études précliniques de la toxicité cardiaque du médicament est en cours d'investigation, deux études publiées en 2018 ont démontré l'utilité des hiPSC-CMs pour classer les médicaments selon leur risques torsadogènes potentiels (Blinova et al., 2018; Kanda et al., 2018).

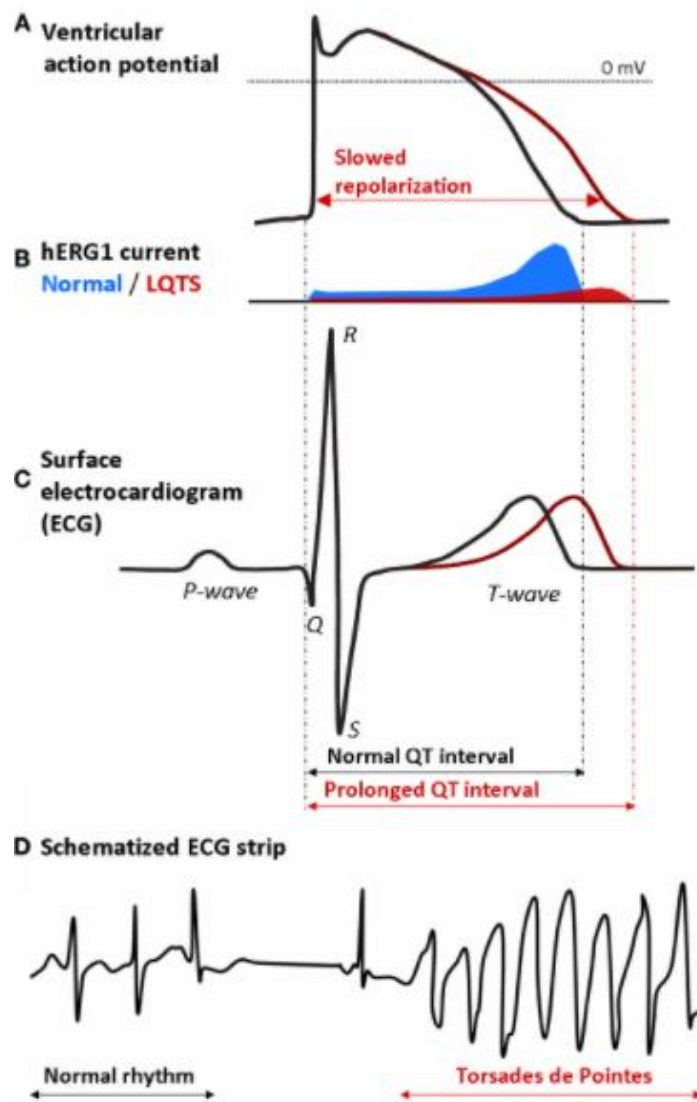


Figure 9. Diagrammes illustrant la relation entre l'allongement de la durée de repolarisation et les Torsades de Pointes (Sintra Grilo et al., 2010)

(A) L'allongement de la durée de repolarisation ventriculaire au niveau cellulaire résulte d'une diminution du courant net sortant (potassique) **(B)** Cette perturbation du courant peut être la conséquence d'une réduction du I_{Kr} en raison d'une inhibition du canal hERG par une molécule ou d'une canalopathie telle que le syndrome du QT long **(C)** L'allongement de la durée de repolarisation ventriculaire conduit à une prolongation de l'intervalle QT (courbe rouge). Ce phénomène peut être observé par le biais d'un électrocardiogramme (ECG) **(D)** Une prolongation importante de l'intervalle QT peut dans certaines conditions électrophysiologiques conduire à la dérégulation de la repolarisation, ce qui donne lieu à une contraction ventriculaire prématurée avant la fin de l'onde T, contribuant à l'initiation du phénomène de Torsades de Pointes.

I.6.4 Utilisation des hiPSC-CMs pour la médecine régénérative

Le renouvellement des CMs est très limité dans le coeur adulte humain (Bergmann et al., 2015). Les hiPSC-CMs représentent alors une approche thérapeutique prometteuse pour traiter les patients souffrant d'insuffisance cardiaque. Des études réalisées chez le porc et les primates non humains ont démontré que les CMs dérivés de hPSCs pouvaient remuscler les régions du myocarde infarctées. Les CMs greffés persistaient jusqu'à trois mois après la transplantation, se contractaient de manière synchronisée avec les cellules hôtes et amélioraient la fonction cardiaque (Ishida et al., 2019; Liu et al., 2018). Les mécanismes cellulaires et physiologiques expliquant les améliorations de la fonction cardiaque lors de ces essais précliniques ne sont pas totalement élucidés même si les auteurs ont constaté que les cellules greffées sécrétaient des facteurs paracrines bénéfiques pour le coeur (inhibition de l'apoptose, vascularisation, modulation de l'inflammation).

A ce jour, trois essais cliniques utilisant des CMs dérivés de hPSCs ont été réalisés (France) ou sont en cours (Chine et Japon). Le premier a eu lieu en France (NCT02057900) et a consisté en la greffe de cellules progénitrices cardiaques SSEA1⁺ISL1⁺ dérivées de hESC sur six patients atteints d'une dysfonction cardiaque sévère du ventricule gauche (Menasché et al., 2015). Cet essai avait pour but principal d'évaluer la sûreté des cellules greffées et trois ans après la transplantation, les patients n'ont pas développé de complications pouvant être typiquement attribuées aux cellules transplantées telles que des arythmies, l'apparition de tumeurs ou une réaction immunitaire significative contre le greffon (un patient est décédé à cause d'une insuffisance cardiaque 22 mois après la greffe (Menasché et al., 2018)). Dans le cadre de l'essai clinique mené au Japon, la première greffe de hiPSC-CMs sur un patient atteint d'une cardiomyopathie ischémique sévère a été réalisée en janvier 2020 tandis que les premiers résultats de l'essai clinique HEAL-CHF effectué en Chine (NCT03763136) seront communiqués en décembre 2020.

Ainsi, chaque application biomédicale nécessite un niveau optimal de maturité cellulaire qui lui est spécifique et la compréhension des différentes stratégies de maturation est essentielle pour atteindre le phénotype souhaité. De plus, l'implémentation du système CRISPR/Cas9 dans les expériences impliquant les hiPSC-CMs permet d'accroître l'utilisation de ces cellules pour les approches biomédicales mentionnées ci-dessus.

I.6.5 Utilisation des hiPSC-CMs modifiés par édition du génome

Le fait de pouvoir combiner les deux biotechnologies, hiPSC-CMs et édition du génome avec le système CRISPR/Cas9, constitue une amélioration majeure pour la compréhension et la modélisation de pathologies humaines.

En premier lieu, les corrélations entre le génotype et le phénotype des maladies d'origine génétique peuvent être étudiées en corrigeant les mutations retrouvées dans les hiPSCs dérivés des patients et différenciées vers le type cellulaire affecté dans la maladie (Garg et al., 2018b). De plus, cela permet de bénéficier du contrôle isogénique optimal et offre donc la possibilité d'échapper à la variabilité phénotypique que l'on peut constater entre les différentes lignées d'hiPSCs (Shinnawi et al., 2019; Sleiman et al., 2020). Par exemple, Liang et ses collègues ont généré des hiPSC-CMs à partir d'une biopsie de peau d'un patient atteint du syndrome de Brugada. L'anomalie génétique de ce patient correspondait à une délétion d'un nucléotide (position 1397) dans l'exon 23 du gène *SCN5A*. Ce décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop précoce aboutissent à un canal sodique Nav1.5 non fonctionnel. Cette étude a montré que ces hiPSC-CMs possédaient plusieurs déficiences au niveau électrophysiologique telles qu'une réduction du courant I_{Na} , une diminution de la vitesse de dépolarisation, une augmentation de la variabilité entre les battements ainsi qu'une diminution de l'amplitude des transitoires calciques. Les auteurs ont alors utilisé le système CRISPR/Cas9 pour corriger cette mutation et ainsi examiner son rôle précis dans ce phénotype pathologique. Ils ont montré que la rectification de cette anomalie génétique conduisait à l'amélioration de la vitesse de dépolarisation et de la variabilité entre les battements ainsi qu'une restauration des transitoires calciques, ce qui a contribué à diminuer la propension aux évènements pro-arythmiques. Le sauvetage phénotypique a donc confirmé la pathogénicité de ce variant et l'association de celui-ci au syndrome de Brugada (Liang et al., 2016).

En second lieu, en insérant des gènes rapporteurs fluorescents au niveau de gènes cardiaques spécifiques, il est possible de suivre en temps réel le développement des différents types de CMs ce qui permet également de les isoler par tri cellulaire (Yamauchi et al., 2018). Ainsi, Zhang et ses collaborateurs ont généré une lignée d'hiPSC-CMs qui expriment les gènes rapporteurs fluorescents *Clover2* et *red fluorescent protein* (RFP) en les introduisant respectivement dans les loci *TBX5* et *NKX2-5* à l'aide du système CRISPR/Cas9. Ils ont pu identifier quatre sous-types de cellules cardiaques avec cette lignée. D'une part, ils ont montré que les cellules $TBX5^+NKX2-5^+$ (rouges et vertes)

correspondaient à des cellules semblables à celles du FHF et qu'elles se spécialisaient majoritairement en CMs ventriculaires alors que les cellules TBX5⁺NKX2-5⁻ (vertes) exhibaient les caractéristiques du lignage épiqueurique et se différenciaient essentiellement en cellules nodales. D'autre part, les cellules TBX5⁻NKX2-5⁺ (rouges) se spécialisaient préférentiellement en CMs auriculaires alors que les cellules TBX5⁻NKX2-5⁻ constituaient une population cellulaire de type endothéliale (Zhang et al., 2019). Ces expériences permettent de mieux connaître la grande variété des chemins de différenciation empruntés par les cellules cardiaques et ainsi de mieux les contrôler pour la modélisation de pathologies.

Malgré les connaissances acquises sur le développement et les maladies cardiaques via l'utilisation des hiPSC-CMs, ces modèles sont loin d'être parfaits et des progrès sont nécessaires pour améliorer la maturité des hiPSC-CMs qui constitue la principale limite de ces cellules.

II. Les hiPSC-CMs sont immatures

Bien que les protocoles de différenciation établis en laboratoires conduisent à la spécialisation des hiPSC en cellules cardiaques, les CMs obtenus *in vitro* diffèrent par de nombreux aspects des CMs retrouvés dans un cœur adulte (Veerman et al., 2015; Yang et al., 2014). En effet, les hiPSC-CMs présentent de nombreuses caractéristiques de CMs fœtaux. Les différentes dimensions de cette immaturité vont être détaillées dans cette partie.

II.1 Morphologie

Les hiPSC-CMs ont une forme majoritairement ronde ou polygonale tandis que les CMs adultes sont allongés. De même, les hiPSC-CMs ont une disposition désordonnée en culture alors que les CMs adultes sont alignés de manière longitudinale dans le cœur ce qui permet une conduction rapide de l'influx électrique et un couplage excitation-contraction optimal (Chung et al., 2007). Enfin, les hiPSC-CMs sont très majoritairement mononucléés alors que 25-30% des CMs adultes dans le cœur sont binucléés (Mollova et al., 2013).

II.2 Mitochondries et Métabolisme

Dans les CMs adultes, les mitochondries sont volumineuses, occupant environ 30% du volume de la cellule. Elles disposent de nombreuses crêtes mitochondriales, permettant ainsi une respiration cellulaire efficace, et sont alignés tout le long des sarcomères. Dans les hiPSC-CMs, les mitochondries sont plus petites, ne disposent pas de crêtes mitochondriales et sont dispersées dans le cytoplasme (Feric and Radisic, 2016). Comme dans le cœur fœtal, les hiPSC-CMs puisent leur énergie à partir de la glycolyse alors que le métabolisme des CMs adultes est essentiellement basé sur la β -oxydation des acides gras (Veerman et al., 2015).

II.3 Tubules Transverses

Les tubules transverses (tubules-T) correspondent à des invaginations de la membrane plasmique (appelée sarcolemme) des CMs. Ils permettent la propagation du potentiel d'action (PA) et l'initiation du couplage excitation-contraction. Contrairement au

CMs adultes, les hiPSC-CMs ont très peu voire pas de tubules-T, ce qui a pour conséquence que les flux calciques transitoires ne sont pas uniformément synchronisés (Jiang et al., 2018).

II.4 Electrophysiologie

Certaines caractéristiques du PA sont distinctes pour chaque type de CMs. Dans cette partie, nous allons nous focaliser sur la description du PA des CMs ventriculaires dans la mesure où il s'agit des CMs majoritairement générés *in vitro* à partir des hiPSCs (Figure 10B). Dans les CMs humains, au cours de la phase 0 du PA, un stimulus de nature dépolarisante, provenant d'une cellule adjacente, augmente le potentiel de repos membranaire jusqu'à atteindre le seuil qui permet d'ouvrir les canaux sodiques voltage-dépendants Nav1.5 entraînant un influx rapide d'ions Na⁺. Cette phase 0 de dépolarisation rapide fait basculer le potentiel de membrane au niveau du potentiel d'équilibre de l'ion Na⁺. ($E_{Na} = +40\text{mV}$) et elle est responsable de la propagation rapide du signal électrique cardiaque. Quelques millisecondes plus tard, ces canaux sodiques s'inactivent. Le potentiel de membrane étant dépolarisé, cela déclenche une brève activation du courant potassique sortant transitoire (I_{T_o}) qui conduit une repolarisation brusque et incomplète (phase 1). Ensuite, la phase 2 dite de plateau, correspond à l'activation des canaux calciques voltage-dépendant de type L (LTCC) qui conduit à l'entrée d'ions Ca²⁺ qui va notamment activer les récepteurs à la ryanodine de type2 (RyR2) présents au niveau le membre du réticulum sarcoplasmique (SR) et induire ainsi le relargage du calcium dans le cytosol (Figure 10B et 11). Ainsi, au cours de cette phase, les courants entrants médiés par les LTCC (I_{CaL}) et l'échangeur Na⁺/Ca²⁺ NCX (I_{NCX}) sont équilibrés par les courants sortants I_{Kr} et I_{Ks} induits par l'ouverture des canaux potassiques, respectivement hERG et KCNQ1. Ensuite, du fait de l'inactivation des canaux LTCC à la fin de la phase de plateau, les courants I_{Ks} et I_{Kr} repolarisent la membrane vers la valeur du potentiel d'équilibre du K⁺ (phase 3). Enfin, le courant I_{K1} généré contribue à la fin de la repolarisation et maintient le potentiel de repos membranaire entre -80 et -85 mV (phase 4) (Amin et al., 2010; Grant Augustus O., 2009) (Figure 10B).

Un des aspects majeurs de l'immaturation électrophysiologique des hiPSC-CMs est l'automaticité qui correspond au fait de générer spontanément des PA sans stimulation. En effet, dans les hiPSC-CMs, le courant I_{K1} est très modeste voire inexistant du fait de la faible

ou de l'absence d'expression du gène *KCNJ2*. Ce dernier code pour la sous-unité α du canal Kir2.1 qui est le principal canal responsable de la création de ce courant. De ce fait, le potentiel de repos membranaire (RMP) de ces cellules est moins négatif (entre -55 et -65mv) que celui des CMs adultes (entre -80 et - 85 mV) (Hoekstra et al., 2012; Magyar et al., 2000). De plus, les hiPSC-CMs expriment les canaux HCN responsables du courant pacemaker I_f alors que celui-ci est très faible dans les CMs ventriculaires adultes (Garg et al., 2018a). Ainsi, l'absence de courant I_{K1} ainsi que la présence de courant I_f engendrent l'activité électrique spontanée des hiPSC-CMs (Ma et al., 2011; Synnergren et al., 2011). De plus, le potentiel des hiPSC-CMs étant dépolarisé, l'activité des canaux sodiques est réduite ce qui conduit à une plus faible pente ascendante du PA (Hoekstra et al., 2012). Pour les courants I_{to} , I_{CaL} , I_{Kr} et I_{Ks} , les densités de courants sont similaires entre les hiPSC-CMs et les CMs adultes (Figure 10B) (Garg et al., 2018a).

Enfin, dans les hiPSC-CMs, la vitesse de conduction du signal électrique est plus faible que dans les CMs adultes (respectivement 10 - 20 cm/s contre ~ 60 cm/s) (Lee Peter et al., 2012). Cette différence est due, d'une part, à l'activité moins élevée des canaux sodiques et d'autre part, à la distribution ainsi qu'à la densité de la Connexine 43 (Cx43), une protéine primordiale des jonctions communicantes (Jalife et al., 1999). En effet, dans les CMs adultes, les canaux sodiques Nav1.5 et les Cx43 sont retrouvés au niveau des disques intercalaires localisés aux extrémités de chaque CM. Ainsi, les disques intercalaires sont constitués des canaux Nav1.5, des Cx43 ainsi que des protéines de jonctions adhérentes (comme la N-cadhérine) et des desmosomes. Ces structures macromoléculaires permettent les couplages électriques et mécaniques des CMs qui sont responsables de la propagation rapide du PA et de la tension développée par la contraction des myofibrilles. Dans les hiPSC-CMs, ces disques de jonctions ne sont pas observables et les Cx43 sont distribuées de manière aléatoire le long du sarcolemme (Scuderi and Butcher, 2017).

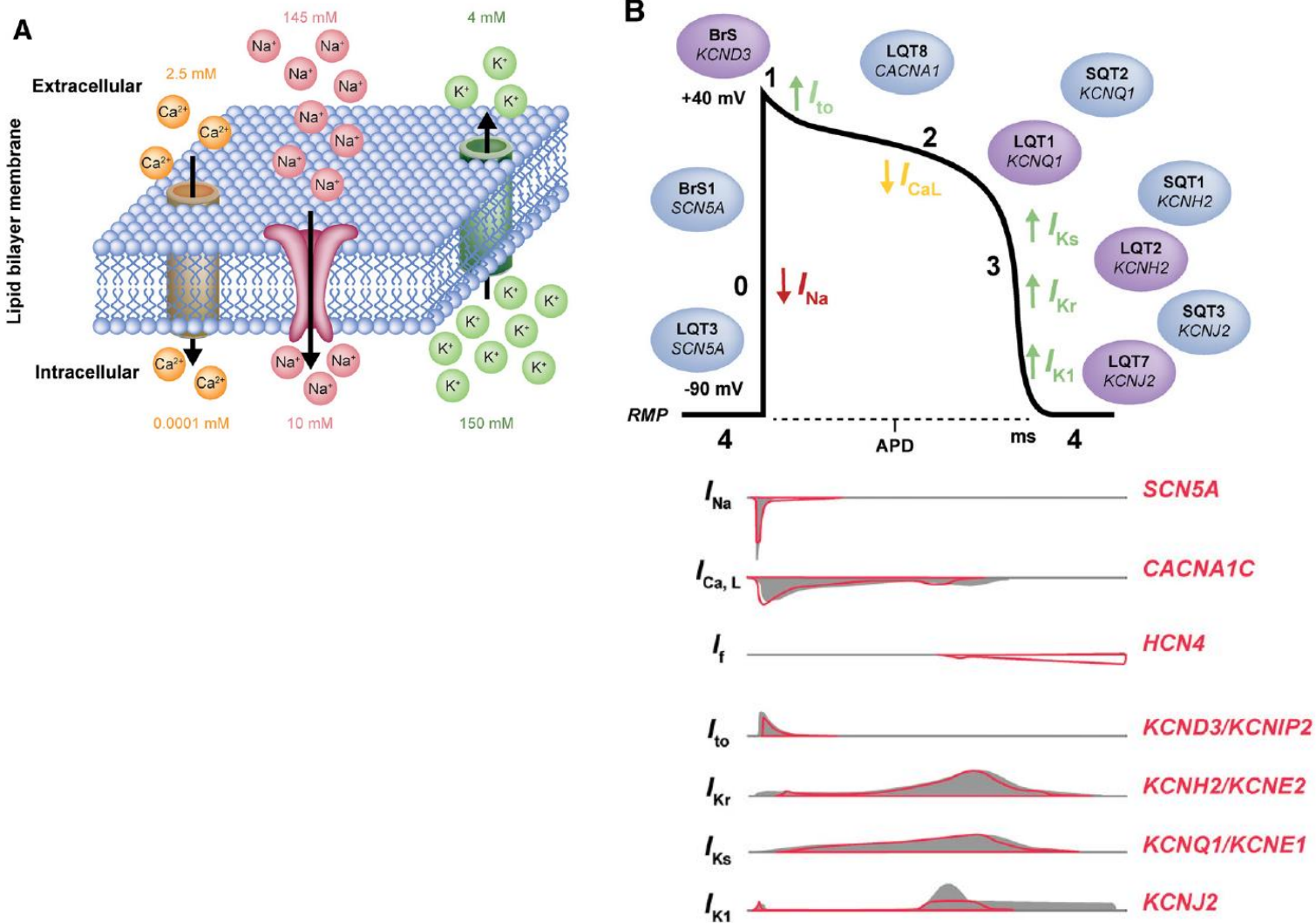


Figure 10. Principes électrophysiologiques de l'activité électrique des CMs (Garg et al., 2018a)

(A) Schéma représentant le potentiel électrochimique de membrane. La membrane lipidique des CMs est notamment composée de canaux ioniques qui facilitent la diffusion passive des ions à travers la membrane cellulaire hydrophobe. Les canaux ioniques sont généralement caractérisés par deux propriétés importantes : (1) la dépendance à un stimulus spécifique : l'ouverture et la fermeture d'un canal s'effectue en réponse à un stimulus spécifique tels que la liaison d'un ligand (ex. neurotransmetteur) ou des variations du potentiel membranaire (2) la sélectivité : les canaux ioniques permettent le passage sélectif à une vitesse élevée de d'ions particuliers, tels que le K^+ , le Na^+ , le Cl^- ou le Ca^{2+} . Ces propriétés des canaux ioniques couplées à la présence des molécules chargées négativement à l'intérieur de la cellule (principalement les protéines) et à l'activité des pompes ioniques membranaires (ex. la Na^+/K^+ ATPase) entraînent une distribution inégale des ions à travers la membrane ce qui génère un gradient électrochimique qui détermine le potentiel de membrane. **(B) Les différentes phases (0–4) d'un potentiel d'action de cardiomyocyte ventriculaire avec les courants ioniques dépolarisants (flèches vers le bas) et repolarisants (flèches vers le haut).** Les anomalies génétiques associées aux canaux ioniques sont également présentées. Les cercles violets représentent les mutations de type « perte de fonction » et les cercles bleus représentent les mutations de type « gain

de fonction ». (C) **Schéma représentant les niveaux relatifs des différents courants associés à un canal particulier retrouvés dans un cardiomyocyte ventriculaire adulte (gris) et un cardiomyocyte ventriculaire dérivé de cellule souche pluripotente induite humaine (rouge).**

Abréviations : BrS (Syndrome de Brugada), LQT (Syndrome du QT long).

II.5 Gestion du calcium

Dans les CMs adultes, l'influx électrique se propage jusqu'aux tubules-T où sont localisés les canaux calciques de type L, déclenchant alors leurs ouvertures et ainsi l'entrée d'ions Ca^{2+} extracellulaires dans le cytosol. Ceci va provoquer l'ouverture des récepteurs RyR2 présents au niveau de la membrane du SR qui contient des quantités très importantes de Ca^{2+} piégés dans cette organelle par la protéine spécialisée Calsequestrine 2 (CASQ2). Ainsi, cela va induire le relargage des ions Ca^{2+} dans le cytosol. Ce phénomène est appelé « libération du Ca^{2+} induite par le Ca^{2+} » (*Ca^{2+} - induced Ca^{2+} - release*, CICR) (Fabiato, 1983). Ces apports significatifs de Ca^{2+} vont ainsi mener à l'activation des myofilaments et à leur contraction. Ce processus correspond au couplage excitation-contraction (ECC). A la suite de la contraction, les ions Ca^{2+} présents dans le cytosol sont d'une part reconfinés dans le SR via la pompe *Sarco reticulum calcium ATPase type-2a* (SERCA-2a) et sont d'autre part extrudés de la cellule par l'échangeur NCX (Figure 11).

En plus de l'absence de tubules-T, les hiPSC-CMs expriment plus faiblement les différentes protéines impliqués dans la gestion du calcium (CASQ2, SERCA-2a, Triadine-1 (TRD-1), Junctine (JN), Phospholamban (PLN)) par rapport aux CMs adultes (Lee et al., 2011; Synnergren et al., 2011; van den Heuvel et al., 2014). Par conséquent, la gestion du calcium et la cinétique des flux calciques sont altérées, ce qui se manifeste par des capacités réduites de stockage et de relargage du Ca^{2+} , un ECC insuffisant et une force de contraction moins importante que dans les CMs adultes (Hwang et al., 2015; Lee et al., 2011).

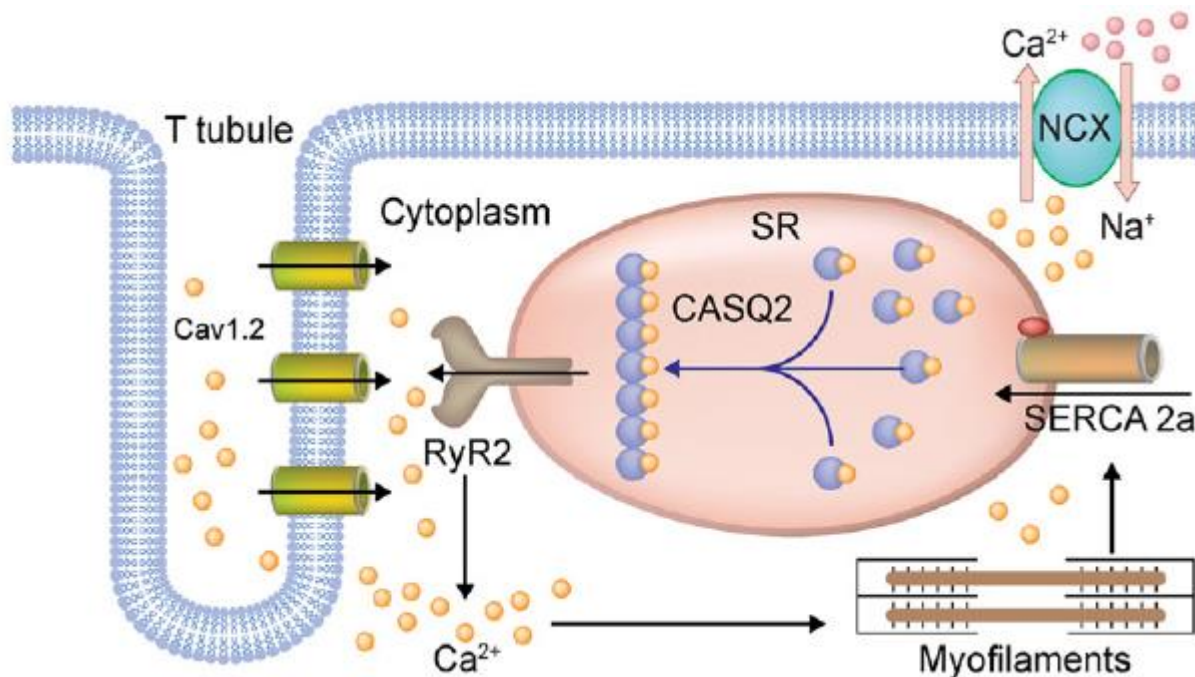


Figure 11. Couplage excitation-contraction dans les CMs (Garg et al., 2018a)

Lors de la phase 2 du potentiel d'action, le Ca^{2+} entre dans la cellule par le biais des canaux calciques de type L (Cav 1.2), ce qui active les récepteurs de la ryanodine de type 2 (RyR2) et initie le mécanisme du Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release (CICR). Cet apport de Ca^{2+} provenant du SR est relargué dans le cytoplasme. Ces ions se lient alors à la troponine C cardiaque, entraînant son activation et par conséquent la contraction des myofibrilles. Au cours de la relaxation, le Ca^{2+} cytosolique retourne dans le SR via la pompe *Sarco reticulum calcium ATPase type-2a* (SERCA 2a) et dans le milieu extracellulaire par l'intermédiaire de l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX).

II.6 Organisation et taille des sarcomères

Le sarcomère est la structure histologique qui permet la contraction des CMs et correspond aux protéines qui constituent les filaments fins et épais (Figure 12). Les sarcomères des hiPSC-CMs sont distribués de manière aléatoire dans la cellule et présentent un alignement quelconque. Ils sont généralement retrouvés à la périphérie du noyau. A l'inverse, les sarcomères des CMs adultes sont alignés et distribués de manière uniforme parallèlement aux bords de la cellule (Feric and Radisic, 2016) (Figure 12). Enfin, les sarcomères des hiPSC-CMs sont moins longs (1.6-1.7 μm) que ceux des CMs adultes (2.0-2.2 μm) (Yang et al., 2014).

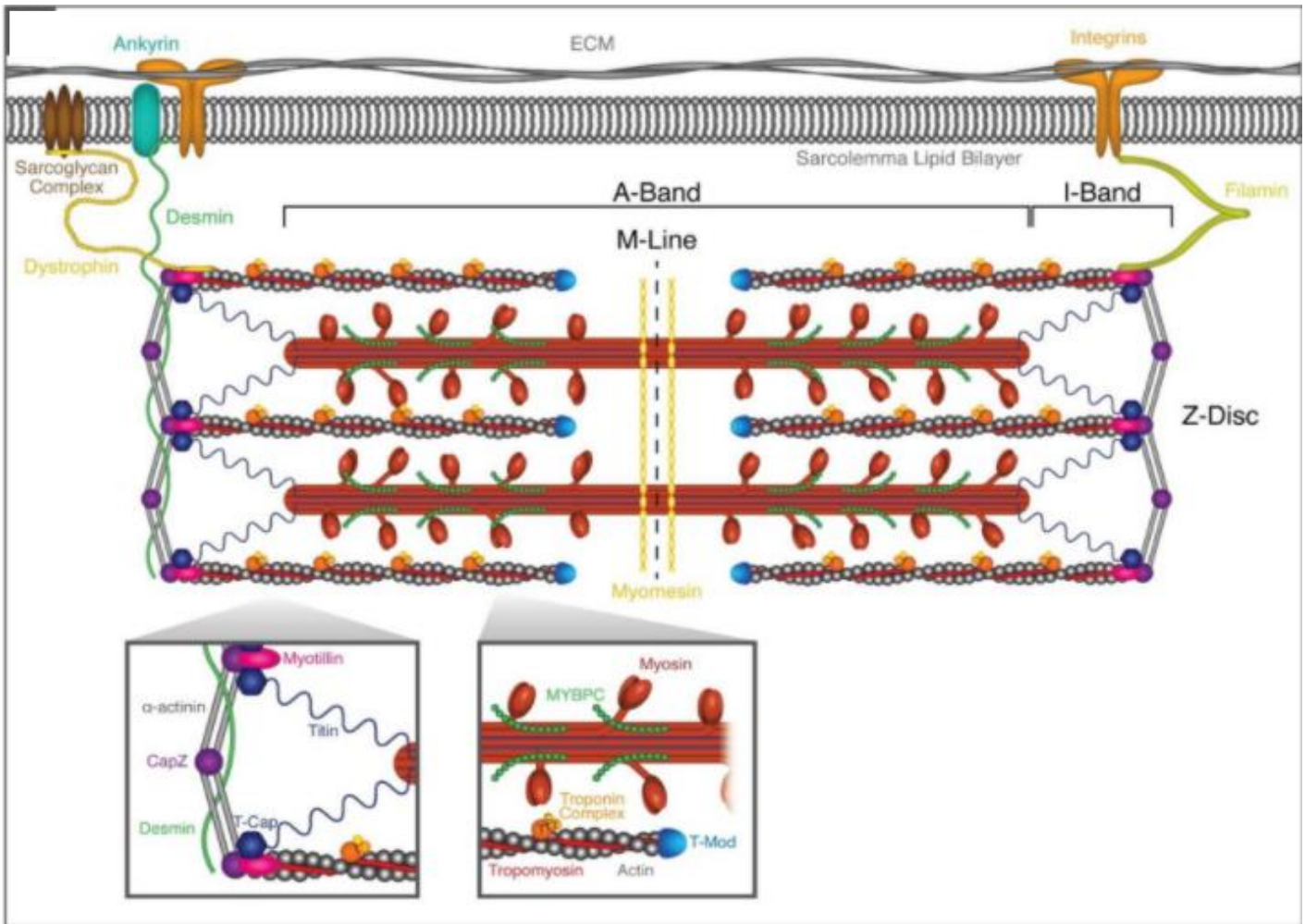


Figure 12. Structure du sarcomère et des protéines associées (Martin and Kirk, 2020)
 Le sarcomère est l'unité contractile de base d'un cardiomyocyte. Les sarcomères sont délimités à chaque extrémité par des disques (ou lignes) Z riches en α -actinine et sont alignés pour former des myofibrilles.

II.7 Appareil contractile et force de contraction

Les hiPSC-CMs expriment la majorité des protéines de l'appareil contractile des CMs adultes. Néanmoins, elles sont présentes sous des isoformes de type foétale (Veerman et al., 2015). Par exemple, dans les CMs ventriculaires adultes humains, l'isoforme la plus répandue pour la chaîne lourde de la myosine (MHC) est la β -MHC (codé par le gène *MYH7*) alors que l'isoforme α -MHC (codé par le gène *MYH6*) est beaucoup moins produite (ratio β -MHC: α -MHC = 9:1 ; Reiser et al., 2001) (Figure 13). Les hiPSC-CMs produisent les deux

isoformes avec des niveaux variables selon les protocoles de différenciation cardiaque qui aboutissent à des cultures de CMs hétérogènes (Lundy et al., 2013). Des observations similaires ont été décrites pour la chaîne légère de myosine (MLC) pour laquelle seule la forme MLC-2v (codé par le gène *MYL2*) est présente dans les CMs ventriculaires adultes (Scuderi and Butcher, 2017) alors que l'on observe la persistance de l'expression de MLC-2a (codé par le gène *MYL7*) en plus de celle de MLC-2v dans les hiPSC-CMs engagés dans la différenciation ventriculaire (Zhang et al., 2013) (Figure 12 et 13).

La titine est une protéine impliquée dans la souplesse et la maintenance de l'intégrité des sarcomères. Elle est principalement retrouvée sous la forme *N2B* dans les CMs adultes tandis que les hiPSC-CMs expriment majoritairement la forme *N2BA* (Krüger and Linke, 2009; Yang et al., 2014) (Figure 12 et 13).

Enfin, les troponines sont des complexes protéiques hétérotrimériques composés des troponines cardiaques I, C et T qui régulent les interactions entre l'actine et la myosine, en modifiant la position de la tropomyosine sur les filaments fins d'actine en fonction des variations de la concentration du Ca^{2+} dans le cytosol (Parmacek and Solaro, 2004). La troponin I est la sous-unité inhibitrice de ce complexe. Les CMs adultes expriment le gène *TNNI3* (cTnI) alors que les hiPSC-CMs expriment l'isoforme *TNNI1* (ssTnI) (Hunkeler N M et al., 1991) (Figure 12 et 13).

Ces différences d'expression d'isoformes et l'absence d'organisation des sarcomères se traduisent par le fait que la force de contraction des hiPSC-CMs est plus faible (de l'ordre du nM) que celle des CMs adultes (de l'ordre du μ N) (Holubarsch et al., 1998; Ribeiro et al., 2015; Schaaf et al., 2011).

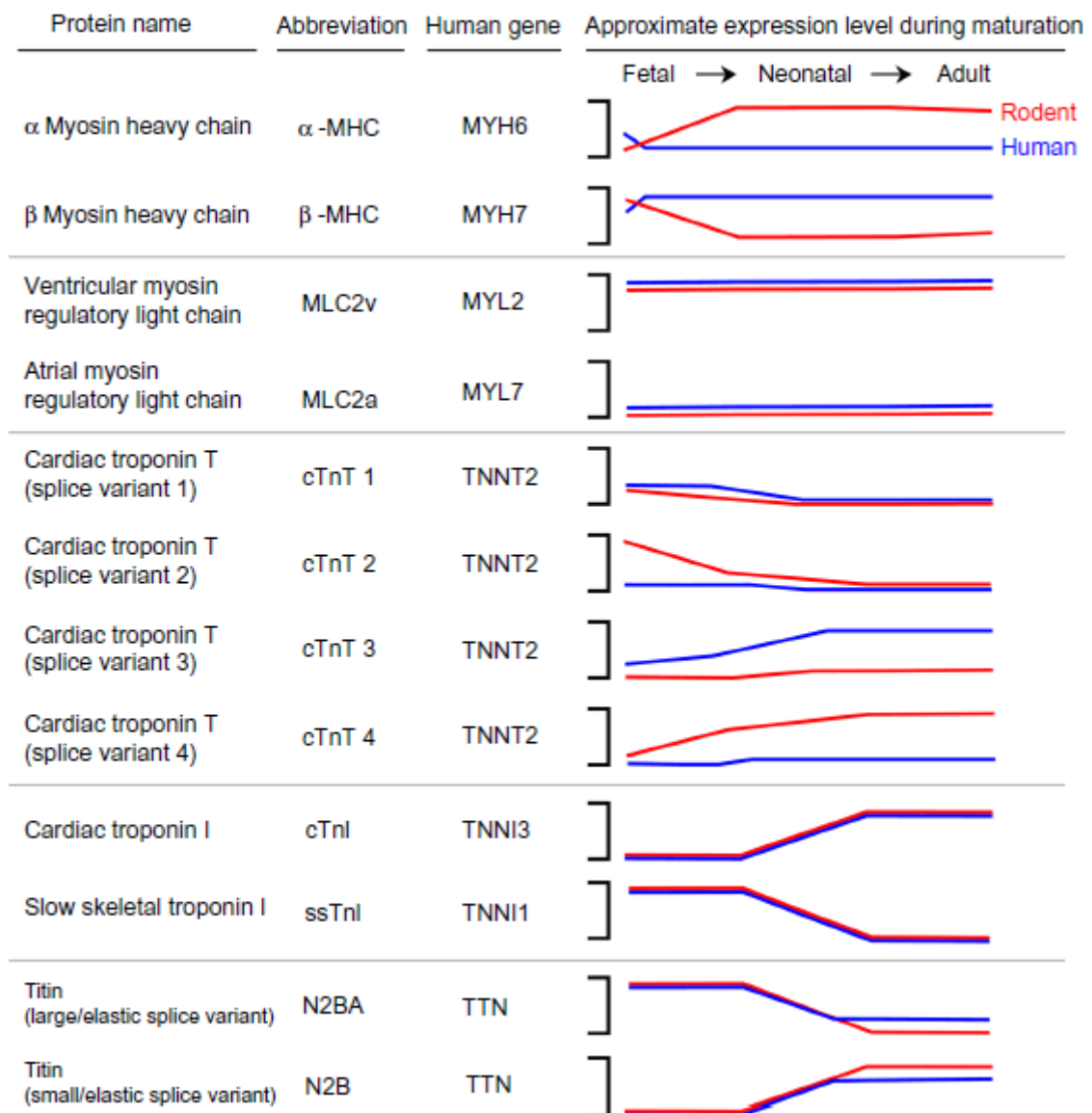


Figure 13. Diagrammes illustrant les changements dans la composition des isoformes des filaments fins et épais entre le stade foetal et le stade adulte dans les CMs ventriculaires gauches murins (rouge) et humains (bleu) (Schwan & Campbell, 2015)

II.8 Transcriptome

Les transcriptomes des CMs humains adultes sont différents de ceux des hiPSC-CMs. Il y a de nombreux gènes différentiellement exprimés dont notamment les isoformes codant les protéines sarcomériques, les gènes régulant l'électrophysiologie, le métabolisme et le cycle cellulaire. Par exemple, dans les hiPSC-CMs, l'expression du gène *KCNJ2* est

extrêmement faible voire inexistante tandis que celle du gène *HCN4* est plus élevée que chez les CMs adultes. De même, pour les gènes impliqués dans la gestion du calcium, les niveaux d'expression des régulateurs *CASQ2*, *PLN* et *TRDN* sont très faibles dans les hPSC-CMs (van den Heuvel et al., 2014). Ainsi, les récentes analyses transcriptomiques ont suggéré que les hPSC-CMs étaient similaires aux CMs du premier semestre de développement du fœtus (Berg et al., 2015). Par ailleurs, Uosaki et ses collègues ont analysés plus d'une centaine de jeux de données obtenus à partir de puces à ADN provenant de cœurs de souris saines à différents stades de développement (allant de l'embryon au stade adulte). Au niveau transcriptionnel, ces analyses ont révélé que les CMs dérivés d'iPSCs murines (mPSC-CMs), au 10^e jour de différenciation *in vitro*, correspondaient à des CMs embryonnaires précoces équivalents à des CMs à E8-E11, tandis que les mPSC-CMs au 30^e jour de différenciation *in vitro* étaient semblables à des CMs embryonnaires à E16-E18 (Uosaki et al., 2015).

III. Approches pour améliorer la maturation des hiPSC-CMs

La maturation des hiPSC-CMs comporte plusieurs facettes qui affectent différents aspects de la biologie ainsi que la fonctionnalité de ces cellules. Au cours de la dernière décennie, de nombreuses avancées ont été réalisées pour améliorer la maturation des hiPSC-CMs et je vais énumérer les principales stratégies.

III.1 Co-Culture

Au cours du développement du cœur, la présence de cellules non cardiaques telles que les fibroblastes, les cellules endothéliales ou les cellules musculaires lisses contribue à la maturation des CMs à travers leurs interactions cellulaires et la communication paracrine (Fountoulaki et al., 2015; Tirziu et al., 2010). Dans une étude menée par Giacomelli et ses collègues, il a été démontré que la coculture en 3D des hiPSC-CMs avec des cellules endothéliales et des fibroblastes cardiaques améliorerait plusieurs aspects de la maturation des hiPSC-CMs. Au niveau structural, la longueur et l'organisation des sarcomères ont été augmentées et les hiPSC-CMs présentaient des caractéristiques ultrastructurales de CMs matures (présence de tubules-T et mitochondries allongées adjacentes aux sarcomères).

De plus, au niveau électrophysiologique, certaines caractéristiques du PA étaient plus matures avec notamment un RMP hyperpolarisé, la présence de courant I_{to} et une vitesse de dépolarisation plus élevée. Ces cellules avaient également une gestion du calcium améliorée (caractérisé par un stockage du Ca^{2+} plus élevé lié à une expression plus importante des protéines clés de la gestion du Ca^{2+} comme CASQ2, PLN et TRD-1) ainsi qu'une capacité respiratoire mitochondriale augmentée (Giacomelli et al., 2020).

III.2 Milieux de Maturation

La source principale d'énergie des CMs adultes provient de la β -oxydation des acides gras contrairement aux hiPSC-CMs qui utilisent majoritairement le glucose. Il a été rapporté que le fait de supplémenter les milieux de cultures avec des acides gras tels que l'acide palmitique, l'acide oléique ainsi que la carnitine (pour assurer le transport des acides gras vers la mitochondrie) améliorait la maturation des hiPSC-CMs (Correia et al., 2017; Yang et al., 2019). En effet, dans leur étude, Correia *et al.* ont cultivé les hiPSC-CMs pendant 20 jours dans un milieu de culture standard RPMI + B27 supplémenté avec de l'acide palmitique, de l'acide oléique et du galactose, ce qui conduisait à obtenir des hiPSC-CMs plus matures par rapport à ceux cultivés dans un milieu de culture standard riche en glucose. Cette amélioration de la maturité cardiaque était caractérisée par un métabolisme énergétique uniquement dépendant de l'oxydation du galactose et des acides gras, une signature transcriptionnelle plus proche des CMs adultes (avec en particulier une augmentation de l'expression des gènes *TNNI3*, *ATP2A2*, *RYR2* et *KCNJ2*), une morphologie cellulaire plus allongée, des structures sarcomériques mieux ordonnées, une augmentation du nombre de cellules binucléés ainsi que des courants transitoires calciques plus rapides et une augmentation de la force de contraction.

III.3 Hormones et signaux biochimiques

Une autre approche employée pour améliorer la maturation des hiPSC-CMs est de cultiver ces cellules avec des hormones et des facteurs de croissance qui sont sécrétés lors du développement fœtal et la période périnatale. Parmi ces facteurs biochimiques, l'hormone thyroïdienne T3 et les glucocorticoïdes ont été décrits comme importants pour la physiologie et la fonction des CMs (Klein and Ojamaa, 2009). Ainsi, l'addition d'hormone

thyroïdienne T3 et de dexaméthasone (hormone glucocorticoïde de synthèse) dans le milieu de culture combinée à la culture des hiPSC-CMs sur une matrice extracellulaire (MEC) composée de matrigel a conduit à la formation de tubules-T et un meilleur ECC (qui résultait notamment d'une organisation en clusters des récepteurs RyR2 et de la synchronisation du relargage du Ca^{2+}) (Parikh et al., 2017). Dans une autre étude, Birket et ses collègues ont montré que le cocktail biochimique composé de l'hormone thyroïdienne T3, de l'*insulin-like growth factor* (IGF1) et de la dexaméthasone améliorait le métabolisme des hESC-CMs (avec une augmentation de la production d'ATP), les propriétés électrophysiologiques (avec une hyperpolarisation du RMP et une augmentation de la vitesse de dépolarisation du PA) et la machinerie contractile (avec des sarcomères mieux organisés et une augmentation de la force de contraction) (Birket et al., 2015).

III.4 Rigidité de la surface de culture et « *Patterning* »

La MEC régule la rigidité tissulaire et la rigidité du cœur augmente graduellement *in vivo* du fait de l'accumulation de collagène (Jacot et al., 2010; Thompson et al., 1979). Les flasques utilisées en culture cellulaire sont beaucoup plus rigides (~1 MPa) que le cœur (~10 kPa) ce qui suggère que des MECs plus souples pourraient être bénéfiques pour la maturation des hiPSC-CMs. L'usage de polydiméthylsiloxane (PDMS), d'hydrogel ou de polyacrylamide a souvent été favorisé pour obtenir des supports de culture moins rigides. En effet, Ribeiro et ses collègues ont montré que le fait d'ensemencer des hESC-CMs sur des surfaces souples de polyacrylamide, revêtues de matrigel et comportant des motifs rectangulaires qui miment la morphologie d'un CM adulte (avec un ratio longueur:largeur de 7:1), conduisait à une amélioration de l'alignement des myofibrilles et des propriétés contractiles des hESC-CMs (avec notamment une force de contraction de 0,1 μN sur une surface souple de 10kPa contre 0,02 μN sur une surface rigide de 35kPa). De plus, cette conformation imposée aux cellules a contribué à une meilleure organisation des mitochondries (localisées au niveau périnucléaire et aux extrémités de la cellule) et à la formation de structures de type tubules-T (Ribeiro et al., 2015).

III.5 Culture en 3D

Dans le cœur, les cellules sont organisées en 3D plutôt qu'en monocouche. En effet, les cultures cellulaires en 2D *in vitro* ne reproduisent pas fidèlement l'architecture du tissu cardiaque et les interactions avec l'environnement extracellulaire. Différentes approches ont été décrites pour produire des cultures en 3D avec des hiPSC-CMs. Certaines stratégies utilisées ont consisté à ensemercer les cellules dans des moules en silicone ou bien de les ancrer dans des hydrogels (Dattola et al., 2019; Silbernagel et al., 2020). Une autre méthode pour générer des cultures en 3D a consisté en la superposition de plusieurs feuillets cellulaires d'hiPSC-CMs (Kawatou et al., 2017). Par ailleurs, des études ont combiné la culture en 3D avec d'autres approches complémentaires telles que la coculture avec des fibroblastes (Valls-Margarit et al., 2019) ou l'utilisation du cocktail hormonal T3/IGF1/Dexaméthasone (Huang et al., 2020). Enfin, des approches sophistiquées ont réussi à stimuler électriquement des hiPSC-CMs cultivés en 3D (Hirt et al., 2014; Nunes et al., 2013; Zhao et al., 2019). Par exemple, Ronaldson-Bouchard et ses collaborateurs ont incorporé des hiPSC-CMs avec des fibroblastes dans des hydrogels de fibrine étirés sur deux piliers flexibles en PDMS (utilisés pour fournir une force mécanique similaire à celle du myocarde). Les cellules ont alors été stimulées électriquement de manière graduelle pendant deux semaines (par une stimulation allant de 2 à 6Hz avec une augmentation quotidienne de 0,33Hz) puis stimulées pendant une semaine avec une fréquence fixe de 2Hz. Ainsi, les hiPSC-CMs qui résultaient de ce protocole avaient une signature transcriptomique plus proche de celle des CMs adultes (avec en particulier, une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans l'ultrastructure des CMs tels que *MYH7* et *TNNI3*, le métabolisme comme *PPARGC1A* et la gestion du calcium tels que *RYR2* et *ATP2A2*). De plus, ces hiPSC-CMs développaient des tubules-T et présentaient une amélioration de la gestion du calcium ainsi qu'une amélioration de la contraction (avec une accélération de la relaxation proportionnelle à la fréquence de contractions et des réponses inotropes, chronotropes et lusitropes positives après traitement avec l'isoprotérenol) (Ronaldson-Bouchard et al., 2018).

III.6 Edition du génome

Il y a peu d'études qui ont eu recours aux stratégies d'édition du génome ou de surexpression de gènes pour améliorer la maturation des hiPSC-CMs. Parmi elles, l'étude menée par Kuppusamy et ses collègues a montré que la surexpression de micro-ARNs appartenant à la famille *let-7* (*let-7g* et *let-7i*) dans des hESC-CMs conduisait à l'augmentation de la taille (augmentation du périmètre et de l'aire cellulaire tout en diminuant l'index de circularité) et de la force de contraction des hESC-CMs. De plus, les cellules surexprimant *let-7g* présentaient une capacité respiratoire mitochondriale plus élevée et une aptitude accrue pour utiliser les acides gras, tels que le palmitate, comme source majeure d'énergie (Kuppusamy et al., 2015). Récemment, Wheelwright et ses collaborateurs ont utilisé les TALENs pour générer des hiPSC-CMs qui exprimaient de manière inductible l'isoforme adulte de la protéine cTnI. Ils ont montré que l'expression de cette isoforme améliorait la contraction des hiPSC-CMs au niveau de la relaxation mais ils n'ont observé aucun bénéfice sur les autres aspects de la physiologie des cellules tels que la gestion du calcium ou les propriétés électrophysiologiques (Wheelwright et al., 2020).

Parmi les approches citées ci-dessus pour améliorer la maturation des hiPSC-CMs, aucune n'a permis d'améliorer significativement les niveaux d'expression des gènes *KCNJ2* et *CASQ2* au point d'avoir un impact sur le RMP et l'arrêt de l'activité électrique spontanée. Des études récentes ont permis d'exprimer de manière individuelle *KCNJ2* et *CASQ2* dans des hPSC-CMs et les auteurs ont évalué leur effet sur l'électrophysiologie et la gestion du calcium. Avant de revenir sur les points marquants de ces études, je vais d'abord présenter les gènes *KCNJ2* et *CASQ2*.

IV. Le gène *KCNJ2*

IV.1 Expression et régulation du gène *KCNJ2*

Le gène *KCNJ2* est localisé au niveau du chromosome 17 et code pour la sous-unité α Kir2.1. Elle est majoritairement retrouvée dans les CMs ventriculaires et est moins abondante dans les CMs atriaux ce qui se traduit par une densité du courant I_{K1} moins importante dans les oreillettes (Gaborit et al., 2007) Les niveaux d'expression sont encore plus faibles dans les CMs du SAN et de l'AVN, ce qui se traduit par des RMPs dépolarisés dans ces cellules (-50mV) (Schram Gernot et al., 2002) Ces différences d'expression entre les différents compartiments cardiaques sont principalement dues à des différences au niveau de la régulation de la transcription du gène *KCNJ2*. Jusqu'à présent, trois facteurs de transcription ont été identifiés comme interagissant avec le promoteur de *KCNJ2* : Sp1, Sp3 et NF-Y. L'association de ces trois facteurs de transcription est nécessaire pour la transcription de *KCNJ2* (Redell and Tempel, 1998). D'autre part, des études ont décrit que l'expression de *KCNJ2* pouvait être diminuée au niveau post-transcriptionnel par les micro-ARNs miR-1 (Yang et al., 2007) et miR-26 (Luo et al., 2013) dans un contexte pathologique.

IV.2 Structure de la sous-unité α Kir2.1

La sous-unité Kir2.1 (427 acides aminés) est constituée de deux domaines transmembranaires M1 et M2, de régions cytoplasmiques amino-terminale (N-ter) et carboxy terminale (C-ter) ainsi qu'une boucle P (ou H5) qui forme le pore situé entre les domaines M1 et M2. L'extrémité C-ter proximale et le domaine M2 assurent la capacité du canal à s'associer avec les autres sous-unités Kir (Lopatin and Nichols, 2001) (Figure 14). En effet, les sous-unités Kir2.1 s'assemblent en homotétramère ou en hétérotétramère avec Kir2.2 ou Kir2.3, qui sont deux autres sous-unités à rectification entrante retrouvées dans le cœur (Lopatin and Nichols, 2001), pour former le canal fonctionnel qui va générer le courant I_{K1} . Dans le cœur humain, la sous-unité Kir2.1 prédomine avec notamment des transcrits qui sont dix fois plus exprimés que ceux de Kir2.2 et Kir 2.3 (Wang Zhiguo et al., 1998). Par ailleurs, il a été décrit que le courant I_{K1} dans les CMs ventriculaires humains pouvait être généré par la combinaison des sous-unités Kir2.1 et Kir2.2 (Schram et al., 2003).

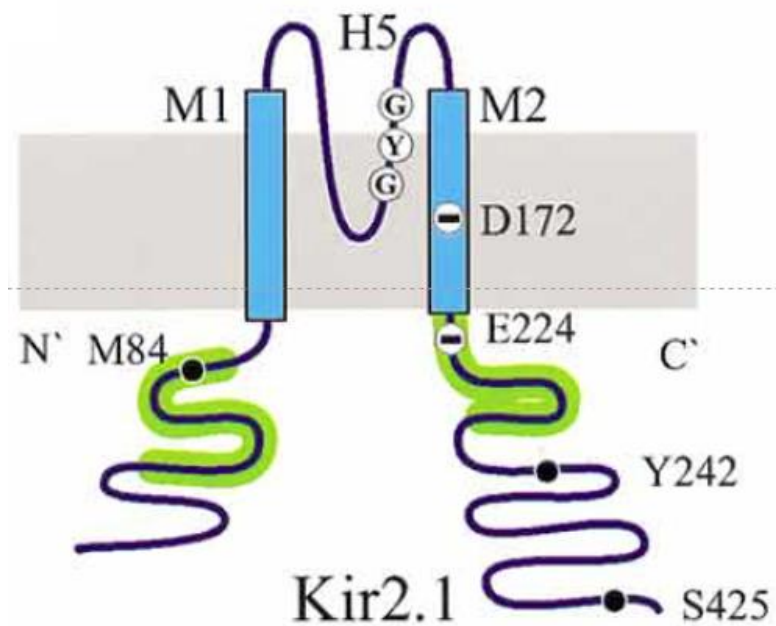


Figure 14. Structure de la sous-unité α Kir2.1 (Lopatin and Nichols, 2001)

Kir2.1 contient la séquence de signature G-Y-G dans la boucle P (ou H5) qui confère une sélectivité potassique au canal. Cette boucle P est flanquée de deux domaines transmembranaires M1 et M2 avec des extrémités N- et C-terminales face au cytoplasme. Les régions N' et C' terminales susceptibles d'être impliquées dans la formation du pore sont surlignées en vert.

IV.3 Fonction du canal Kir2.1

Dans les CMs adultes, le canal Kir2.1 permet l'entrée des ions K^+ dans la cellule lorsque le potentiel membranaire a une valeur plus négative que le potentiel d'équilibre du Potassium (E_K) qui est d'environ -85 mV (Dhamoon and Jalife, 2005). Lorsque la valeur du potentiel membranaire est supérieure à l' E_K , les canaux I_{K1} conduisent un courant sortant mais la conductance du canal diminue brusquement avec la dépolarisation (Figure 15). Cette caractéristique correspond au phénomène de rectification qui est causé par le blocage du pore interne du canal par le magnésium, ou les polyamines (comme la spermine et la spermidine) à des potentiels membranaires dépolarisants (Huang and Kuo, 2016). Cette inhibition est levée de manière dépendante au voltage lors de la fin de la phase 3 et ainsi la sortie de K^+ via le canal Kir2.1 contribue à la fin de la repolarisation.

Par ailleurs, l'immaturation des hiPSC-CMs montrent que le courant I_{K1} est essentiel non seulement pour maintenir le RMP à une valeur de -85mV mais aussi pour déterminer l'excitabilité et la disponibilité des canaux ioniques Nav1.5 pour le PA suivant. De plus, des

études ont décrit une interaction entre les canaux Kir2.1 et Nav1.5. Effectivement, Nav1.5 et Kir2.1 forment un complexe macromoléculaire dont l'expression et la fonction se régulent réciproquement (Milstein et al., 2012; Varghese, 2016). Le transport de ce complexe macromoléculaire repose sur les interactions entre le cytosquelette, les protéines motrices et les organelles (Ponce-Balbuena Daniela et al., 2018).

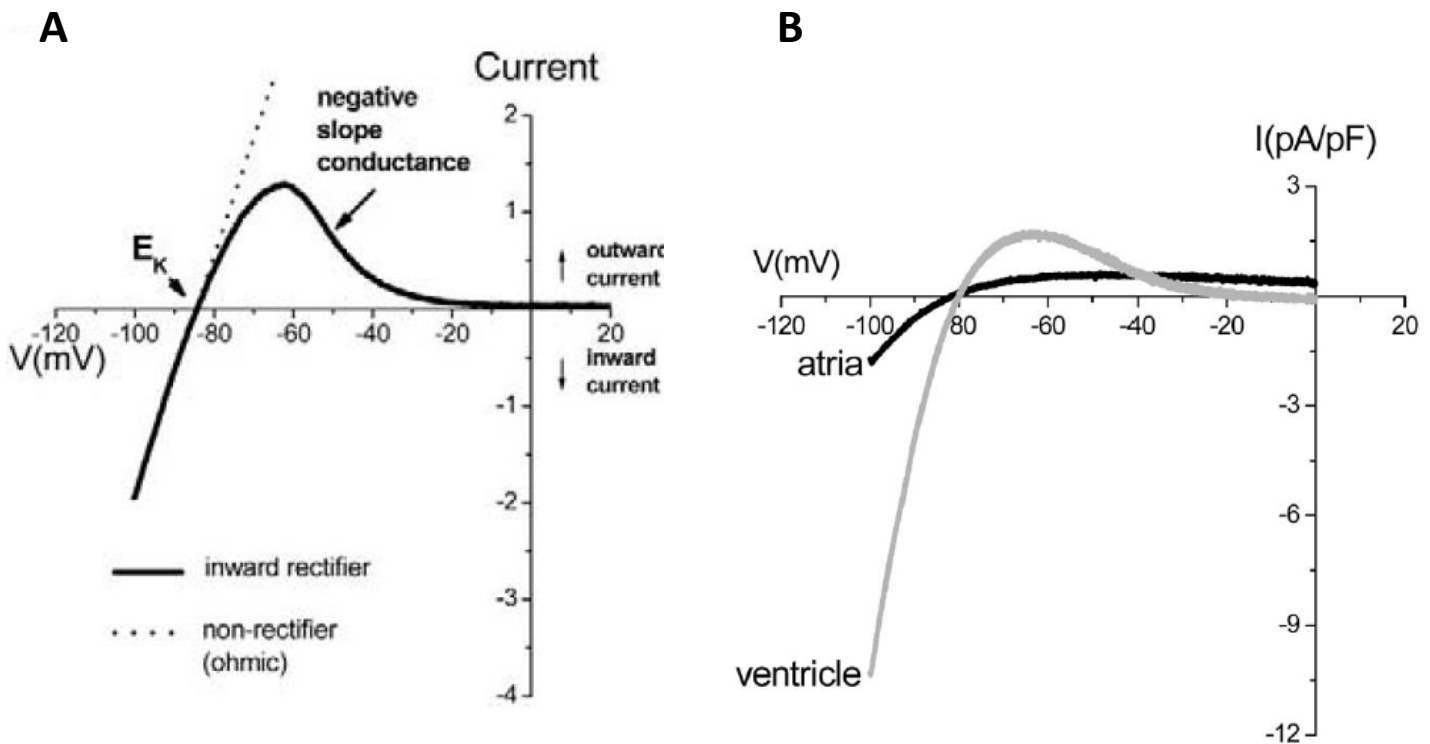


Figure 15. Relation intensité-voltage du courant I_{K1} (Dhamoon and Jalife, 2005)

(A) La conductance du K^+ est élevée aux potentiels plus hyperpolarisés que le potentiel d'équilibre E_K et est plus petite aux potentiels dépolarisés. Les canaux Kir2.1 passent beaucoup moins de courant sortant que de courant entrant. La courbe Intensité-Voltage (I/V) du courant I_{K1} ventriculaire est caractérisée par une forme « en n » aux potentiels membranaires dépolarisés. Les courants sortants sont relativement faibles mais jouent un rôle significatif lors de la dépolarisation initiale du potentiel d'action et pendant la phase finale de repolarisation. **(B)** Le courant I_{K1} ventriculaire est plus important que le courant I_{K1} retrouvé dans les oreillettes.

IV.4 Mutations de *KCNJ2* associées à des pathologies humaines

Plus de trente trois mutations de type perte de fonction du gène *KCNJ2* sont associées au syndrome d'Andersen-Tawil (ATS) (Anumonwo and Lopatin, 2010). Il s'agit d'une maladie rare, avec un mode de transmission autosomique dominant, qui se caractérise par des phénotypes cliniques affectant la morphogénèse ainsi que le

fonctionnement des muscles squelettiques et cardiaques. Les patients ATS sont souvent de petite taille, souffrent notamment de scoliose et présentent une faiblesse des muscles squelettiques (Plaster et al., 2001). Au niveau cardiaque, les patients présentent une prolongation de l'intervalle QT avec une variété d'arythmies ventriculaires qui prédisposent à une mort subite par arrêt cardiaque.

De manière inverse, des mutations faux-sens de type gain de fonction dans le gène *KCNJ2* sont associées au syndrome du QT court de type 3 (SQTS3) (Deo et al., 2013; Hattori et al., 2012; Priori et al., 2005). Le SQTS est une anomalie héréditaire qui prédispose les personnes atteintes à un risque élevé de fibrillation (auriculaire ou ventriculaire) et de mort subite. Le SQTS est caractérisé par un intervalle QT anormalement court (<320 ms) sur l'ECG avec une accélération marquée de la repolarisation (Bjerregaard and Gussak, 2005). La première étude qui a montré qu'une mutation du gène *KCNJ2* pouvait causer un SQTS a été réalisée en 2005. Priori et ses collègues ont découvert une substitution d'un résidu d'acide aspartique en asparagine (D172N) à une position critique pour la rectification entrante du canal Kir2.1 chez une jeune enfant dont l'ECG révélait un intervalle QT de 314 ms et des ondes T asymétriques. Les auteurs de cette étude ont démontré que la coexpression hétérologue des sous-unités Kir2.1 de type sauvage et mutant conduisait à une augmentation des courants sortants. Par ailleurs, leur étude *in silico* a montré que cette mutation se traduisait par un raccourcissement du potentiel d'action et par l'apparition d'arythmies (Priori et al., 2005).

V. Le gène CASQ2

V.1 Expression et régulation du gène CASQ2

Le gène *CASQ2* est localisé au niveau du chromosome 1 et code pour l'isoforme cardiaque Calsequestrine 2 (*CASQ2*). L'expression du gène *CASQ2* est contrôlée par les facteurs de transcription suivants : *myocyte enhancer factor-2* (MEF2C), *serum response transcription factors* (SRF) et *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT). Il a été décrit que le complexe NFAT/MEF2C s'associe au niveau du promoteur proximal de *CASQ2* pour induire son expression (Estrada-Avilés et al., 2017; Reyes-Juárez et al., 2007).

V.2 Structure de la protéine CASQ2

La *CASQ2* est une glycoprotéine de 44 kDa et d'une longueur de 399 acides aminés. Des analyses structurales de la protéine ont révélé que chaque monomère est formé de trois domaines quasi identiques (I, II et III) similaires au domaine thioredoxine de la bactérie *Escherichia coli*. Chaque domaine est constitué de quatre hélices α et de cinq feuillets β . Le centre de chaque domaine est hydrophobe en raison du nombre important d'acides aromatiques alors que les surfaces extérieures de chaque domaine ont un potentiel électro-négatif du fait du grand nombre de résidus acides (Wang et al., 1998). La queue C-terminale, riche en acide aspartique, est le principal site de liaison du Ca^{2+} (Park et al., 2004).

V.3 Fonctions

La *CASQ2* est la protéine de liaison du Ca^{2+} la plus abondante dans le SR jonctionnel (jSR) du muscle cardiaque. Elle est responsable du stockage du Ca^{2+} et de la régulation de la libération de Ca^{2+} par l'unité de relargage du calcium (CRU). La *CASQ2* possède une capacité élevée à capturer le Ca^{2+} (~40 moles de Ca^{2+} /mole de protéines de *CASQ2* (Park et al., 2004)) mais a une faible affinité pour cet ion ($K_d \sim 1 \text{ mM}$, (Wang and Michalak, 2020)). On estime que la *CASQ2* capture entre 50 à 75% du Ca^{2+} présent dans le SR des CMs (Györke et al., 2009).

Sa fonction de stockage du calcium se manifeste par une polymérisation réversible en fonction de la concentration de Ca^{2+} dans le SR ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$) afin d'augmenter sa capacité de stockage. En effet, lorsque la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$ est supérieure ou égale 1mM, la CASQ2 se dimérise puis il y a formation de tétramères quand la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$ est supérieure à 3mM et enfin des polymères sont constitués lorsque la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$ est supérieure à 5mM (Györke and Terentyev, 2008). Ainsi, du fait de sa localisation au niveau du SR jonctionnel, la CASQ2 accumule le Ca^{2+} à proximité de son lieu de relargage, ce qui permet notamment de fournir la quantité de Ca^{2+} nécessaire pour l'activation de la machinerie contractile (Figure 16).

Le second rôle de la CASQ2 correspond à un rôle de régulateur de la libération du Ca^{2+} provenant du SR. Au cours de l'ECC, la libération de Ca^{2+} par les récepteurs RyR2 est médiée par des interactions entre les protéines du complexe CRU, qui comprend la CASQ2, TRD-1 et la JN. (Györke et al., 2004). La TRD-1 et la JN sont des protéines que l'on retrouve au niveau du jSR et permettent notamment de maintenir CASQ2 à proximité des récepteurs RyR2 (Zhang et al., 1997). La CASQ2 module la régulation de l'activité des canaux RyR2 en fonction de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$. En effet, la CASQ2 (en collaboration avec la TRD-1 et la JN) inhibe l'ouverture des récepteurs RyR2 lorsque la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$ est inférieure à 20 μM tandis que l'activation et l'ouverture de ces canaux a lieu lorsque la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{SR}}$ est supérieure à 250 μM (Györke et al., 2004; Terentyev et al., 2007) (Figure 16). Ce complexe protéique régule ainsi l'activité des canaux RyR2 et permet la libération de Ca^{2+} par le SR qui est essentielle pour l'ECC.

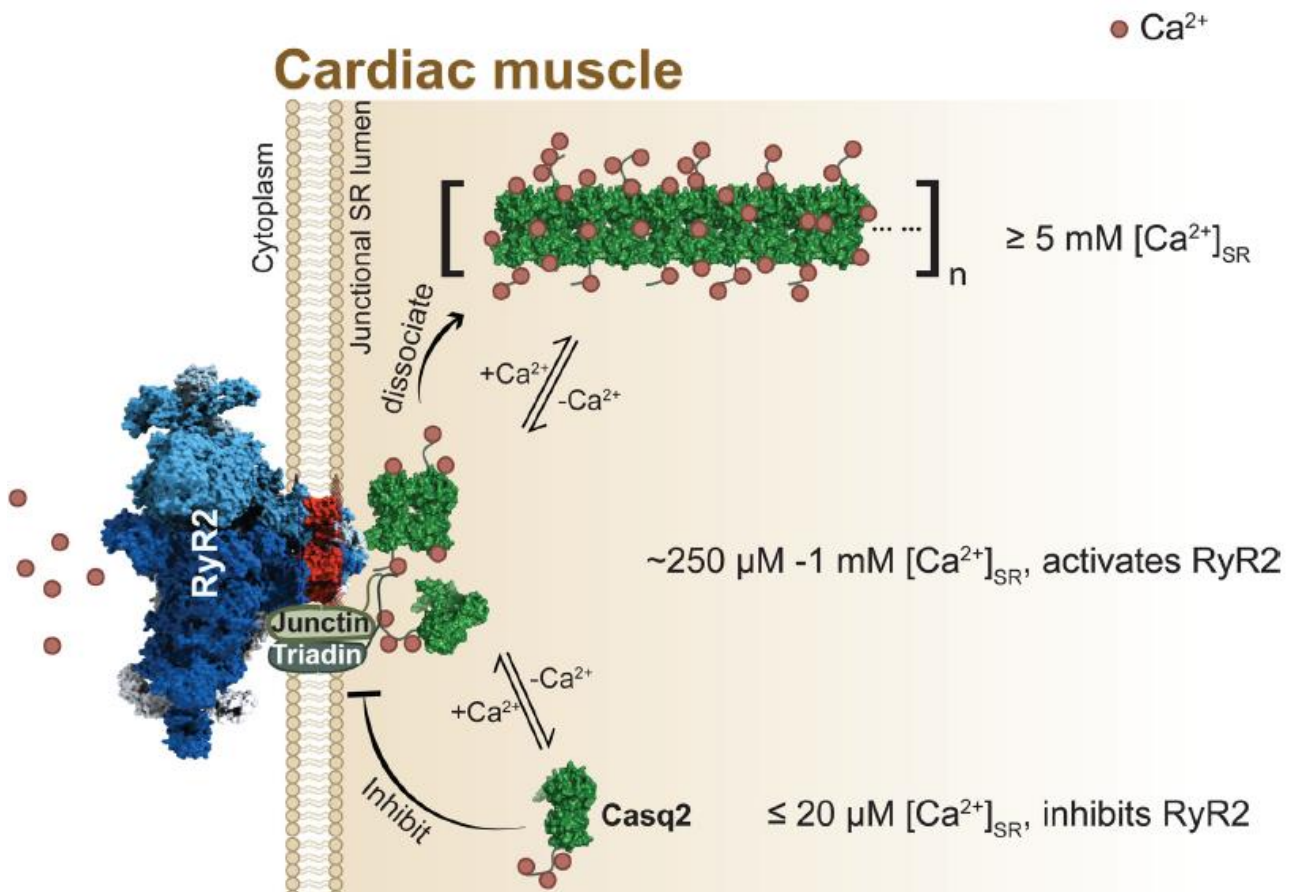


Figure 16. Stockage et régulation du relargage du Ca²⁺ par la CASQ2 dans le réticulum sarcoplasmique (Wang and Michalak, 2020)

V.4 Mutations de CASQ2 associées à des pathologies humaines

Les mutations dans le gène *CASQ2* sont associées aux CPVT2. Les CPVTs sont des arythmies héréditaires caractérisées par une tachycardie ventriculaire polymorphe induite par un stress émotionnel ou physique (Faggioni et al., 2012). Malgré l'éventail de mutations dans le gène *CASQ2* décrites dans la littérature, la présentation clinique des CPVT2 est plutôt homogène. Les patients sont généralement diagnostiqués au cours des vingt premières années de leur vie et manifestent communément des palpitations récurrentes et des épisodes de syncope induites par le stress (Leenhardt Antoine et al., 1995; Postma et al., 2002).

Par exemple, un patient âgé de six ans a été identifié comme porteur homozygote d'une délétion de 16 nucléotides dans l'exon 3 provoquant un codon STOP prématuré après

cinq acides aminés (mutation G112 + 5X) qui se traduisait par une absence totale de protéine CASQ2 fonctionnelle. Ce patient avait un ECG ordinaire au repos et un cœur structurellement normal mais les tests d'exercices physiques induisaient des tachycardies ventriculaires polymorphes (di Barletta Marina Raffaele et al., 2006). Cette étude ainsi que des travaux décrivant d'autres mutations homozygotes causant l'arrêt prématurée de la séquence codante (Postma et al., 2002) indiquent que l'absence de la CASQ2 fonctionnelle chez l'homme et n'a pas effet sur le développement cardiaque, mais ces patients peuvent développer des arythmies potentiellement mortelles durant l'enfance en cas de stress intense.

Il y a seize autres mutations identifiées dans le gène *CASQ2* associées au CPVT2 chez l'homme. Ces mutations conduisent à des mécanismes moléculaires distincts contribuant au CPVT (Figure 17). Cependant, une caractéristique commune de ces mutants *CASQ2* est un dysfonctionnement de la polymérisation et de la dépolymérisation de la protéine en fonction du Ca^{2+} qui affecterait notamment l'ECC (Wang and Michalak, 2020).

Trois études ont décrit la modélisation des CPVT2 avec des hiPSC-CMs (Lodola et al., 2016; Maizels Leonid et al., 2017; Novak et al., 2015). Lodola et ses collègues ont généré des hiPSC-CMs à partir de cellules d'un patient homozygote pour la mutation perte de fonction G112 + 5X. Les hiPSC-CMs mutants généraient des arythmies de type *delayed after depolarization* (DAD) à la suite d'une stimulation β -adrénergique via l'isoprotérenol. Cette étude a aussi montré qu'une approche de thérapie génique *via* la transduction de *CASQ2* avec un virus *Adeno-Associated Viral vector serotype 9* (AAV9) est capable de restaurer l'expression physiologique de la *CASQ2*, de rétablir les amplitudes des fluctuations calciques et de diminuer les événements de DAD suite à la stimulation adrénergique.

Human cardiac muscle CASQ2

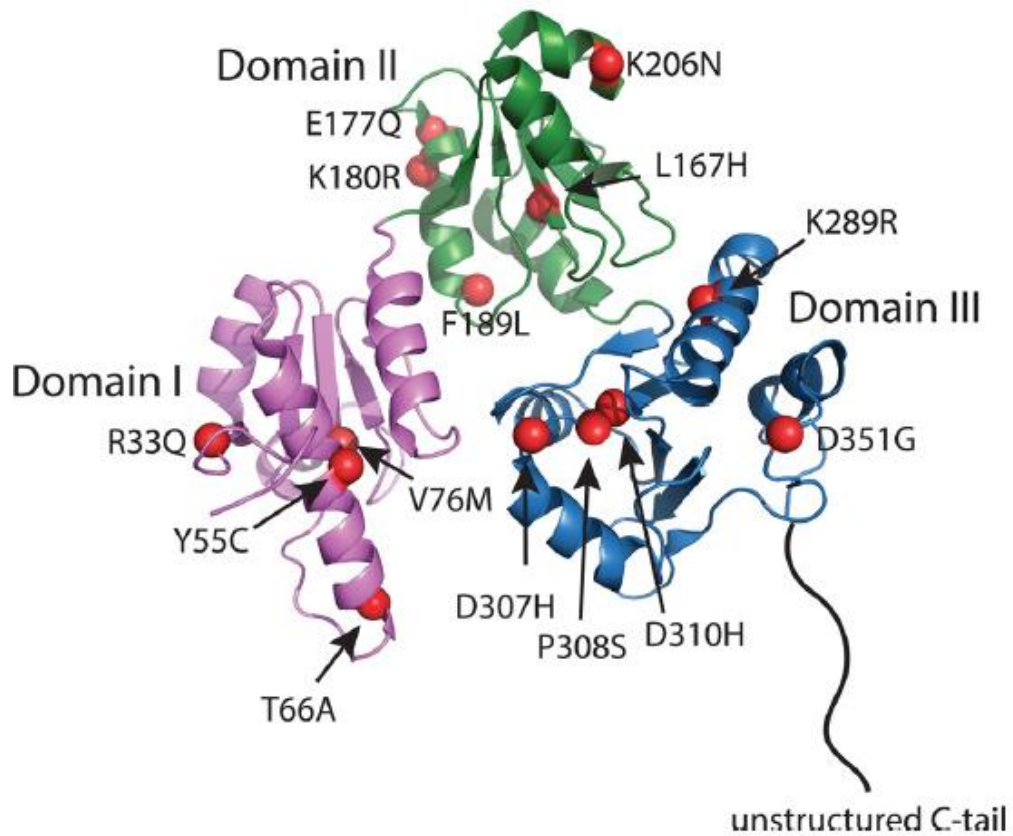


Figure 17. Représentation graphique illustrant les mutations faux-sens dans la CASQ2 associées à des maladies chez l'homme (Wang and Michalak, 2020)

VI. L'édition du génome avec le système CRISPR/Cas9

Les cellules souches pluripotentes étaient parmi les seules cellules de mammifères où il était possible de modifier la séquence de gènes par les techniques traditionnelles de recombinaison homologue. Toutefois, les efficacités de modification demeuraient très faibles. Par ailleurs, pour celles qui sont d'origine humaine, l'obtention de cellules génétiquement modifiées était rendue encore plus difficile du fait de leur faible taux de survie au moment de l'isolement des clones d'intérêt car cela impliquait une étape de culture, à partir de cellules uniques, qui leur est délétère. Ces difficultés ont été surmontées, d'une part, grâce au développement de l'inhibiteur des Rho kinases Y-27632 qui améliore la survie des hESCs et des hiPSCs en les protégeant de l'apoptose induite lors de leur dissociation en cellule unique (Watanabe et al., 2007) et d'autre part, grâce au développement des nucléases artificielles à des fins d'ingénierie du génome, la coupure induite augmentant la fréquence des événements de recombinaison homologue (Carroll, 2014). Ces outils permettent de modifier le génome avec une efficacité élevée et s'avère d'un grand intérêt pour corriger des mutations délétères, introduire des mutations pathologiques afin de générer des modèles de maladies *in vitro*, notamment à partir d'hiPSCs, ou dans des modèles animaux, activer ou éteindre l'expression d'un gène ou de panels de gènes pour en étudier les conséquences phénotypiques. L'intégration de transgènes de grande taille (gène rapporteur, cassette de sélection) permet également de générer des lignées utiles pour suivre des cellules ou des événements cellulaires, par exemple dans le cadre de criblages de molécules ou pour d'autres applications comme l'amélioration de la maturation par expression de gènes clés comme décrit dans ce travail.

VI.1 Le développement des nucléases pour l'ingénierie du génome

Les nucléases à doigts de Zinc (ZNF), les *trans activator-like effector nucleases* (TALEN) et le système *Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeat/CRISPR associated protein9* (CRISPR/Cas9) constituent les trois principales familles de nucléases artificielles pour l'édition du génome. Les ZNF ont été obtenues en fusionnant les motifs protéiques de liaison à l'ADN de type « doigts de zinc » avec le domaine nucléase de l'enzyme de restriction FokI (Kim et al., 1996) (Figure 18A). Les TALEN ont été générées sur le même principe en assemblant le domaine nucléase de FokI aux domaines de liaison

à l'ADN dérivés de bactéries pathogènes du genre *Xanthomonas* (Christian et al., 2010; Miller et al., 2011) (Figure 18A). Le système CRISPR/Cas9 est dérivé du système de défense de bactéries contre les virus. Il est constitué d'un ARN guide qui reconnaît la séquence d'ADN d'intérêt quand il est associé à l'endonucléase Cas9 (Jinek et al., 2012) (Figure 18B). Ces trois types de nucléases permettent de générer des cassures double-brin de l'ADN de manière précise sur une séquence d'intérêt et ainsi de déclencher l'activation des systèmes cellulaires de réparation de l'ADN aboutissant à la modification du génome de manière ciblée.

Les ZFNs et les TALENs ont été utilisées au début de la dernière décennie pour éditer le génome d'hiPSCs ou d'hESCes notamment pour générer des modèles cellulaires de maladies (Ding et al., 2013; Y. Wang et al., 2014) ou encore pour corriger et évaluer l'effet de mutations associées à des pathologies (Soldner et al., 2011; Yusa et al., 2011). Néanmoins, l'édition du génome dans les hiPSCs est maintenant réalisée avec le système CRISPR/Cas9 en raison de sa facilité d'utilisation et de ses faibles temps et coûts de production.

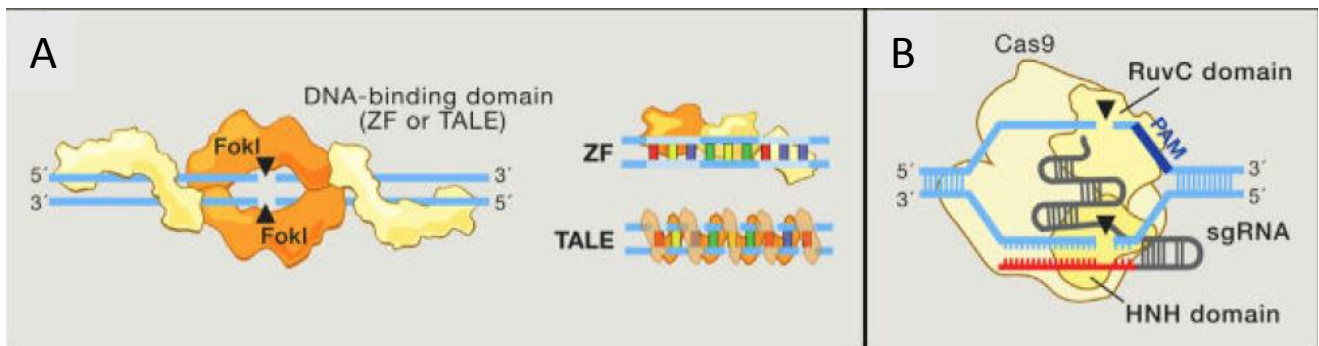


Figure 18. Les nucléases artificielles pour l'édition du génome (Hsu et al., 2014)

(A) Les protéines à doigts de zinc (ZF) et les *Transcription Activator-Like Effectors* (TALE) possèdent des domaines de liaison à l'ADN qui peuvent être assemblés de façon modulaire pour cibler des séquences spécifiques. Les domaines des ZF et des TALE reconnaissent respectivement 3 et 1 paires de bases (pb). L'endonucléase FokI peut être fusionnée à ces protéines afin de créer des nucléases site-spécifiques. **(B)** La nucléase Cas9 cible une séquence d'ADN spécifique par le biais de son ARN guide (rouge et gris) qui s'apparie directement avec l'ADN cible. Cas9 interagit avec la séquence *protospacer-adjacent motif* (PAM, en bleu) en aval de la séquence cible pour permettre l'ouverture de l'ADN double brin et la fixation de l'ARN guide.

VI.2 Les systèmes CRISPR/Cas

Les systèmes CRISPR/Cas sont des systèmes de protection mis en place par les bactéries et les archées pour lutter contre les éléments génétiques mobiles de pathogènes tels que les phages. Brièvement, les loci CRISPR comportent des gènes associés à CRISPR (*Cas genes*) et une série de séquences répétées (*CRISPR*) séparées par des séquences variables d'ADN (*spacers*) (Mojica et al., 2005). Ces dernières correspondent à des séquences génétiques étrangères qui s'intègrent dans le génome hôte lors d'une première l'infection. Ainsi, lorsqu'un virus ou un plasmide, incluant une de ces séquences, infecte ultérieurement la bactérie, la séquence *spacer* correspondante transcrite en ARN CRISPR (crRNA) va guider l'endonucléase Cas en reconnaissant la séquence complémentaire dans la séquence de l'ADN pathogène exogène et conduire à une cassure double brin de celle-ci qui va entraîner sa dégradation (Gasiunas et al., 2012).

Les systèmes CRISPR/Cas ont été identifiés dans différentes souches de bactéries qui peuvent être répartis en deux classes qui sont chacune divisée en trois sous-types. La classe 1 comprend les sous-types I, III et IV et ont entre 4 à 7 sous unités protéiques Cas. La classe 2 regroupe les sous-types II, V et VI dont les nucléases effectrices sont composées d'une seule enzyme Cas, comme par exemple la Cas9 pour le sous-type II (Makarova et al., 2015; Mohanraju et al., 2016), et qui par leur simplicité sont particulièrement adaptées pour le développement d'outils d'ingénierie du génome.

VI.3 Le système CRISPR/Cas9 de *Streptococcus pyogenes*

Le système CRISPR/Cas le plus utilisé, à des fins de recherches fondamentales et appliquées, est le système CRISPR/Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9 : de classe 2, sous type II). Il est constitué de la nucléase Cas9 qui possède deux domaines catalytiques de type RuvC et HNH, du crRNA qui inclut la séquence de reconnaissance de l'ADN cible et de l'ARN transactivateur (tracrRNA) nécessaire pour rendre le crRNA fonctionnel. Chaque crRNA inclut 20 nucléotides correspondant à la séquence d'ADN ciblée et cette dernière, dans le génome, doit être flanquée en aval par une séquence NGG appelée *protospacer adjacent motif* (PAM) ; dans les approches d'édition du génome, les parties crRNA et tracrRNA sont souvent reliées ensemble pour former une seule molécule d'ARN appelée sgRNA pour *single guide RNA* (Figure 18B). La SpCas9 va alors induire une

cassure double brin au niveau de l'ADN qui va générer des extrémités à bouts francs 3 nucléotides en 5' du PAM (Jinek et al., 2012). L'édition du génome s'effectue alors grâce à la stimulation des voies de réparation de l'ADN de la cellule qui vont être actives lors de la cassure double brin produite par le système CRISPR/Cas9. Les deux usages les plus fréquents de ce système sont la création de mutations qui vont inactiver un gène cible (*knock-out*, KO) et l'insertion d'une séquence d'intérêt (*knock-in*, KI) à un locus précis. L'inactivation de gènes est principalement réalisée après réparation par la voie classique de jonction d'extrémités non homologues (*canonical non-homologous end-joining pathway*, cNHEJ) tandis que l'insertion précise de séquences d'ADN exogènes s'effectue généralement par la voie de réparation dirigée par des séquences homologues (*Homology directed repair*, HDR). La réparation par HDR a lieu dans les cellules humaines uniquement au cours des phases S et G2 alors que la voie de réparation par cNHEJ peut se produire lors de toutes les phases du cycle cellulaire (Ceccaldi et al., 2016; Karanam et al., 2012).

VI.4 Réparation des cassures d'ADN double brin par la voie cNHEJ

Le cNHEJ est la principale voie de réparation des cassures double brin d'ADN dans les cellules humaines et elle est impliquée dans de nombreux processus biologiques qui nécessitent des réarrangements de l'ADN (par exemple, les réarrangements des gènes d'immunoglobulines (Dudley et al., 2005) ou la survie et différenciation des progéniteurs hématopoïétiques (Tilgner et al., 2013)). Dans un contexte physiologique normal, cette voie est capable de réparer l'ADN de manière fidèle en reliant entre elles les extrémités d'ADN de part et d'autre de la cassure. Cependant, ce mécanisme de réparation a tendance à faire des erreurs dans un contexte d'édition du génome dans la mesure où après une réparation précise, la séquence ciblée peut être de nouveau clivée par la nucléase (Brinkman et al., 2018a). De plus, des expériences *in vitro* ont montré que la protéine Cas9 restait liée aux extrémités d'ADN après la cassure double brin (Sternberg et al., 2014). Dans la cellule, ce type de fixation est susceptible de perturber le processus de réparation (Brinkman et al., 2018b) et favoriser ainsi l'insertion ou la délétion (*indels*) de plusieurs nucléotides au cours de la ligation. Ces *indels* sont susceptibles de modifier le cadre de lecture des séquences codantes et faire apparaître des codons STOP prématurés, ce qui explique l'importance de cette voie de réparation pour l'inactivation de gènes d'intérêt.

Les acteurs moléculaires et le mécanisme du cNHEJ ont été bien décrits. La première étape implique la fixation de l'hétérodimère Ku70/Ku80 aux extrémités d'ADN quelques secondes après la cassure double brin (Walker et al., 2001). Cet hétérodimère va ensuite recruter les principaux facteurs du cNHEJ à savoir les *DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit* (DNA-PKcs) (Gottlieb and Jackson, 1993), les protéines *X-ray cross complementing protein 4* (XRCC4), *XRCC4-like factor* (XLF) qui vont favoriser le maintien des extrémités au sein du complexe de réparation (Yano et al., 2009) ainsi que *Aprataxin-and-PNK-like factor* (APLF) et la DNA ligase IV, enzyme clé de l'étape de ligation finale (Grawunder et al., 1998) (Figure 19).

La connaissance de ces acteurs moléculaires a permis de développer des approches pour inhiber la voie cNHEJ (via l'inactivation génique ou l'inhibition pharmacologique des enzymes de la voie), ce qui permet de favoriser l'édition précise du génome par la voie HDR (Ray and Raghavan, 2020) dans la mesure où les deux voies sont en compétition. Un exemple récent est l'utilisation d'un inhibiteur de DNA-PKcs permettant d'augmenter de manière très importante l'efficacité d'introduction de mutations ponctuelles dans les hiPSCs (Riesenberg et al., 2019) .

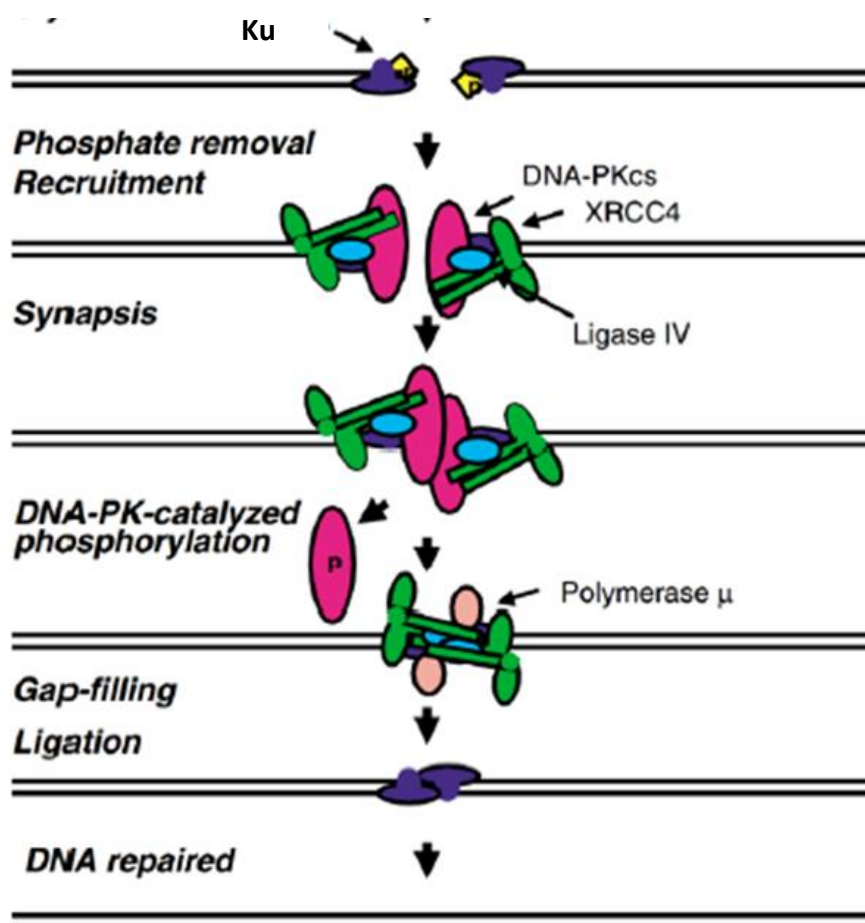


Figure 19. Réparation d'une cassure double brin par la voie cNHEJ (schéma adapté de Valerie and Povirk, 2003)

Après la liaison des protéines Ku sur les extrémités d'ADN, elles recrutent ensuite les DNA-PKcs qui promeuvent la juxtaposition des deux extrémités d'ADN. Dès que les deux complexes de DNA-PKcs se rejoignent, ils s'autophosphorylent ce qui entraîne leur départ des extrémités d'ADN, laissant place à l'arrivée de XRCC4 et de l'ADN ligase IV. Le complexe composé des protéines Ku, XRCC4, DNA ligase IV et la DNA polymérase POL μ se forme alors au niveau de la jonction des deux extrémités d'ADN et catalyse la ligation de celles-ci terminant ainsi le mécanisme de réparation et la restauration de la séquence originale.

Abréviations : DNA-PKcs (*DNA-dependant protein kinase catalytic subunit*), XRCC4 (*X-ray repair cross-complementing protein 4*).

VI.5 Réparation des cassures d'ADN double brin par la voie HDR

Dans la voie HDR, la réparation commence par une étape de résection, initiée par les protéines CtIP et MRE11 (appartenant au complexe MRN, pour MRE11-RAD50-NBS) qui génèrent des extrémités d'ADN simple brin pour la recherche de séquences homologues qui seront utilisées comme matrice de réparation (Symington, 2014). La résection initiale est poursuivie soit par l'exonucléase Exo1 ou par le tandem constitué de l'exonucléases Dna2 et de l'hélicase RecQ. Les *replication protein A* (RPA) protègent alors les fragments d'ADN simple brin contre l'action des nucléases. La protéine recombinase RAD51 remplace alors les RPA grâce à l'activité de BRCA2. RAD51 va promouvoir l'invasion du brin d'ADN provenant de la chromatide sœur (ou de l'ADN donneur exogène) qui va être utilisée en tant que matrice pour la réparation. Il y a ensuite deux possibilités de finalisation de la réparation soit par simple synthèse de l'ADN manquant par l'action d'une polymérase ou par un enjambement des chromatides sœurs (nommée résolution d'une jonction de Holliday) (Sung and Klein, 2006) (Figure 20).

Des approches pharmacologiques permettant de stimuler la voie HDR ont été décrites (ex. stabilisateurs de la fixation de RAD51 (Song et al., 2016)) mais leur activité n'a pas été validée dans les hiPSCs. Une approche génétique a été développée dans mon laboratoire d'accueil avec l'utilisation de la protéine Cas9 fusionnée à une protéine impliquée dans la voie HDR. Dans la partie Résultats, je montrerai ma participation à ces travaux avec

la validation de l'approche dans les hiPSCs.

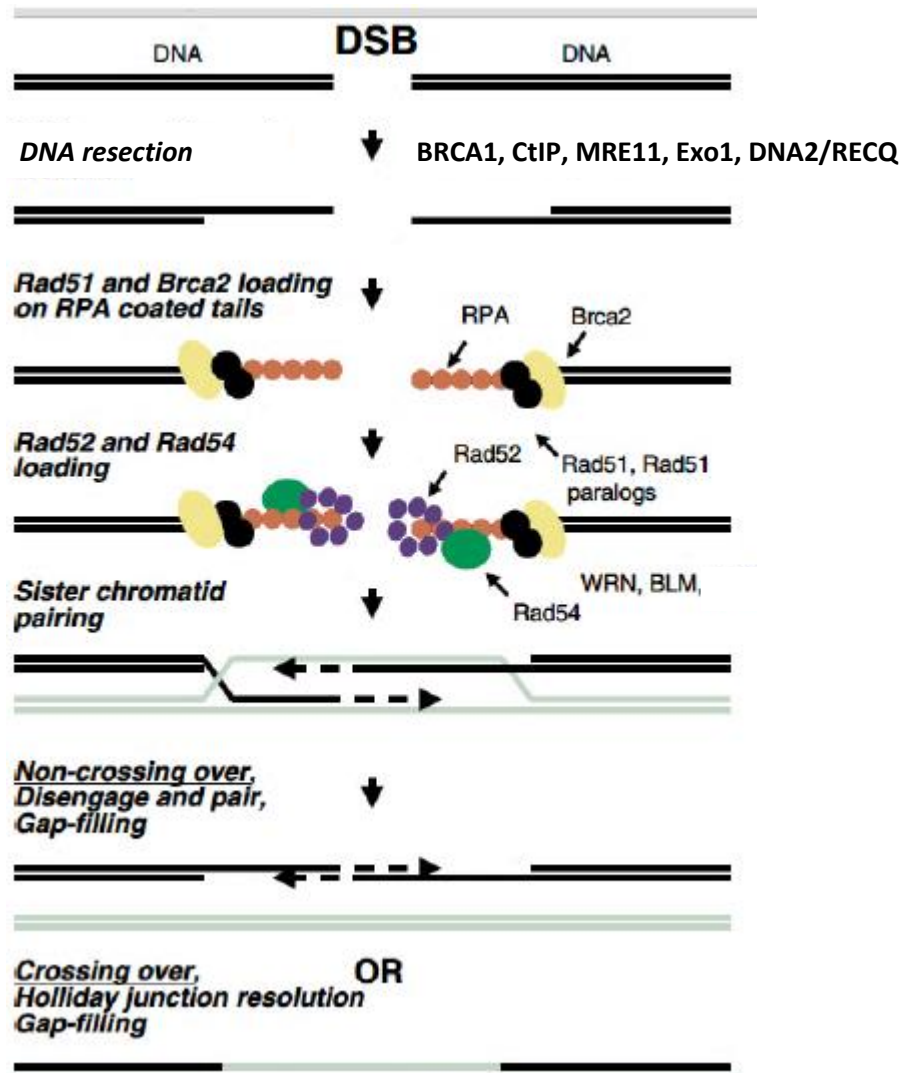


Figure 20. Représentation schématique de la réparation d'une cassure double brin par la voie HDR (Schéma adapté de Valerie & Povirk, 2003)

Dans les premières étapes de la réparation de la cassure double brin par la voie HDR, ATM détecte la cassure et phosphoryle l'histone H2AX ce qui entraîne le recrutement de BRCA1. BRCA1 constitue le coordinateur des événements de réparation qui vont suivre. La résection de l'ADN est initiée par CtIP et MRE11, ce qui génère de l'ADN simple brin. Les protéines RPA se fixent alors à ces extrémités d'ADN simple brin pour les protéger d'une éventuelle dégradation. Ensuite, BRCA1 recrute BRCA2 au niveau de la cassure ce qui facilite également le remplacement de RPA par RAD51 avec l'aide des paralogues de RAD51. RAD51 recrute RAD52 et RAD54 (probablement avec l'aide des protéines BLM et de l'hélicase WRN). A partir de cette étape, il y a deux issues pour parachever la voie de réparation par HDR. La première est sans "croisement" et s'effectue par synthèse de l'ADN manquant. La seconde est par un enjambement des chromatides soeurs, aussi nommée résolution de jonction de Holliday.

Abréviations : ATM (Ataxia telangiectasia-mutated), H2AX (famille des histones H2A,

membre X), BRCA1 (Breast cancer 1), NBS1 (Nibrine), MRN (complexe composé de MRE11, RAD50 et NBS1), RPA (Replication Protein A), BRCA2 (Breast Cancer 2), BLM (bloom syndrome protein), p53 (tumor protein p53), WRN (Werner syndrome ATP-dependent helicase).

VI.6 Les limites du système CRISPR/Cas9

La spécificité de la coupure de l'ADN induite par le système CRISPR/Cas9 a été étudiée de manière approfondie et il a été montré que dans certaines conditions, des coupures sur des sites non-ciblés induisant des modifications indésirables, appelées mutations *off-target*, pouvaient être observées. La majorité des expériences qui ont étudié et rapporté des mutations *off-target* ont été réalisées dans des cellules cancéreuses où les régulations des voies de réparation de l'ADN sont souvent très altérées (Fu et al., 2013; Hsu et al., 2013). En revanche, des expériences de ce type réalisées sur des organismes entiers tels que le poisson-zèbre (Auer et al., 2014), la souris (Wang et al., 2013) et le singe (Niu et al., 2014) ont décrit des fréquences de mutations *off-target* faibles voire non détectables. De même, des études ont révélé que ces mutations étaient rares dans les hiPSCs (Park et al., 2015; Smith et al., 2014). En effet, il est possible que dans les cellules non transformées, les altérations *off-targets* soient efficacement contre-sélectionnées par les voies de réparation de dommages à l'ADN. Ainsi, afin de développer le système CRISPR/Cas9 pour traiter les maladies génétiques, il sera important de déterminer dans quelle mesure les mutations *off-target* résultent d'une altération de la régulation des points de contrôle du cycle cellulaire des cellules et s'il existe des types et des conditions cellulaires qui prédisposent à l'accumulation de ces effets *off-target*.

VI.7 Les variants du système CRISPR/Cas9

Une deuxième génération d'outils d'édition du génome, qui ne nécessite pas d'induire de cassure double brin de l'ADN cible, a été développée à partir du système CRISPR/Cas9. Elle a donc l'avantage de ne pas dépendre de l'efficacité du mécanisme HDR qui est dans beaucoup de systèmes biologiques un facteur limitant et offre donc de nouvelles possibilités pour les approches d'édition du génome.

Dans un premier temps, des éditeurs de bases permettant la substitution de C en T ont été conçus. Ils consistent en une fusion entre une version mutante de Cas9, qui induit

une cassure simple brin au niveau du brin d'ADN associé à l'ARN guide (mutation D10A du domaine nucléase RuvC), et une cytidine déaminase dont l'activité peut s'exercer sur l'ADN simple brin non apparié à l'ARN guide au moment de l'interaction du complexe Cas9-gRNA avec l'ADN (Komor et al., 2016). Cette approche peut-être très efficace et une étude a permis d'élargir son spectre d'application en fusionnant une adénine déaminase artificielle à la Cas9 mutante pour induire le changement des nucléotides A en G (Gaudelli et al., 2017), ces deux types d'éditeurs de bases permettant ainsi d'induire quatre substitutions sur les douze possibles.

La fusion d'une autre variante de Cas9 qui coupe seulement l'ADN simple brin non-apparié à l'ARN guide (mutation H840A du domaine nucléase HNH), avec la rétrotranscriptase *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase* (M-MLV RT) permet aussi de réaliser des modifications précises, comme des substitutions mais aussi des insertions et délétions (de moins de 50 pb), en utilisant un ARN guide modifié appelé *prime editing guide RNA* (ARNpeg). L'ARNpeg comporte une extension 3' capable de s'apparier à l'ADN simple brin en 5' de la coupure faite par la Cas9 H840A et de servir d'amorce pour la copie par *reverse transcription* d'une séquence ARN avec la modification souhaitée. Cette stratégie est très récente et offre une plus grande flexibilité que les éditeurs de bases même si elle semble montrer une efficacité de modification plus faible (Anzalone et al., 2019). Une seule application dans les hiPSC a été rapportée à ce jour mais son succès devrait aller en croissant (Sürün et al., 2020).

Résultats

I. Amélioration de la maturation des hiPSC-CMs par la surexpression des gènes *KCNJ2* et *CASQ2* par édition génomique et application en toxicologie prédictive

Surexpression des gènes *KCNJ2* et *CASQ2* et impact sur la maturation des hiPSC-CMs :

Des analyses transcriptomiques réalisées au sein de notre laboratoire à Sanofi ont révélé que *KCNJ2* et *CASQ2*, impliqués respectivement dans l'électrophysiologie et la gestion du calcium des CMs, étaient sous-exprimés dans les hiPSC-CMs en comparaison aux CMs adultes. Par ailleurs, des études ont montré que la transduction d'un adénovirus permettant l'expression constitutive de *KCNJ2* dans des hiPSC-CMs conduisait à l'amélioration des propriétés électrophysiologiques de ces cellules incluant l'abolition de l'automaticité, l'hyperpolarisation du potentiel de repos membranaire et l'augmentation de la pente de dépolarisation du potentiel d'action (M. Li et al., 2017; Vaidyanathan et al., 2016). Par une approche similaire, il a été décrit que la surexpression de *CASQ2* dans des hPSC-CMs améliorait la maturation de la gestion du calcium qui se traduisait par une augmentation de l'amplitude des transitoires calciques après traitement à la caféine ainsi qu'une amélioration de la cinétique des transitoires calciques à la suite d'une stimulation électrique (Liu et al., 2009).

Notre étude :

De ce fait, notre étude avait pour objectif d'exprimer les gènes *KCNJ2* et *CASQ2* dans une même cellule afin de combiner leurs effets et améliorer potentiellement la maturation des hiPSC-CMs. Nous avons généré des lignées stables d'hiPSC-CMs qui expriment de manière inductible *KCNJ2*, *CASQ2* ou les deux gènes simultanément et nous avons examiné leurs phénotypes fonctionnels et électrophysiologiques à l'aide de méthodes d'analyses complémentaires. Nous avons ensuite évalué le bénéfice de l'expression de ces transgènes sur la toxicologie prédictive en testant des molécules agonistes ou antagonistes de canaux ioniques utilisées classiquement dans le cadre des essais précliniques de toxicité cardiaque.

Article 1

Inducing expression of KCNJ2 and CASQ2 in hiPSC-derived cardiomyocytes improves cardiac maturation and predictive toxicology

Ahmed H.Y. Khedher^{a,b}, Galadriel Perrinaud^a, Camille Bonnin^a, Valérie Létang^a, Nicolas Redon^a, Céline Chantoiseau^c, Sandra Viale^a, Annick Coste^a, Alice Brion^b, Vincent Mikol^a, Cécile Orsini^a, Bruno Biton^a, Jean-Paul Concordet^{b*} and Jean-Michel Itier^{a*}

^a Translational sciences, Sanofi, 13 quai Jules Guesde, F-94400 Vitry-sur-Seine, France

^b Museum National d'Histoire naturelle, INSERM U1154, CNRS UMR 7196, Sorbonne Universités, 43 rue Cuvier, Paris F-75231, France

^c Investigative Toxicology Preclinical Safety, Sanofi, 3 Digue d'Alfortville, F-94140 Alfortville, France

* Corresponding authors

Email addresses: Jean-Paul.Concordet@mnhn.fr (JP. Concordet) Jean-Michel.Itier@sanofi.com (JM. Itier)

Abstract

Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (hiPSC-CMs) are promising *in vitro* models for testing cardiac toxicological safety and modeling heart disease. Despite numerous efforts, current protocols do not yet lead to a maturation phenotype equivalent to adult human myocardium; key features of hiPSC-CMs remaining closer to fetal stages of development, such as gene expression, electrophysiology and function. Here we generated stable hiPSC-CMs with inducible expression of known maturation genes KCNJ2 and Calsequestrin2 (KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs) and studied their functional and electrophysiological phenotype by several complementary methods (Patch Clamp, Functional Drug Screening System (FDSS/ μ Cell) and microelectrode arrays (MEAs)). Upon doxycycline induction of KCNJ2 and CASQ2, KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs displayed phenotypic benefits expected from previous studies of each maturation gene, including a drastic reduction of spontaneous beating, hyperpolarized resting membrane potential, shortened action potential duration and enhanced Ca^{2+} transients. In addition, co-expression of the two genes enhanced Na^+ spike slope of extracellular field potential and Ca^{2+} handling. We tested four reference drugs and observed signatures of known cardiac effects in KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs, including arrhythmias induced by QT prolonging drug (E-4031), which were more easily detected than in control hiPSC-CMs. Therefore, KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs exhibited a more mature phenotype than

hiPSC-CMs and such genetically engineered hiPSC-CMs could be useful for testing cardiac toxicity of novel candidate drugs.

Keywords

Human induced pluripotent stem cell–derived cardiomyocytes, KCNJ2, CASQ2, electrophysiology, Ca²⁺ transients, maturation

Abbreviations

AAVS1, Adeno-associated virus integration site 1; AP, Action potential; APD, Action potential duration; CASQ2, Calsequestrin2; ChR2, Channelrhodopsin-2; CICR, Ca²⁺-induced Ca²⁺-release; CiPA, Comprehensive in vitro proarrhythmia assay; CRISPR/Cas9, Clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR-associated protein 9; EFP, Extracellular field potential; EFS, Electrical field stimulation; eGFP, enhanced Green fluorescent protein; hERG, Human ether-à-go-go-related gene; hiPSC-CMs, human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes; FDSS, Functional drug screening system; FPDc, Corrected field potential duration; HEK, Human embryonic kidney; I_{K1}, Inward rectifier K⁺ current; I_{Kr}, rapidly activating delayed rectifier K⁺ current; I_{Na}, Na⁺ current; MEA, Microelectrode array; Na_v1.5, Voltage-dependent Na⁺ channel; NCX, Na⁺/Ca²⁺ exchanger; RMP, Resting membrane potential; RyR2, type 2 Ryanodine receptors; SERCA, Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase; SR, Sarcoplasmic reticulum; TdPs, Torsades de pointes; VGCC, Voltage-gated Ca²⁺ channel

1. Introduction

Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (hiPSC-CMs) are a very promising model for several scientific and therapeutic applications ranging from disease modeling [1] to drug discovery [2,3], and from predictive toxicology [4] to regenerative medicine [5,6]. Despite advances in the last few years, qualitative improvements are necessary since hiPSC-CMs are immature and phenotypically closer to fetal stages of development [7,8]. One key difference with adult cardiomyocytes is automaticity of hiPSC-CMs exhibiting spontaneous activity. Indeed, hiPSC-CMs display very low levels of the inward rectifier K⁺ current (I_{K1}) which is involved in the late phase of repolarization, the stabilization of the resting membrane potential (RMP) and the maintenance of

excitability [9]. The I_{K1} current is mainly generated by the Kir2.1 protein which is encoded by the KCNJ2 gene and is very poorly expressed in hPSC-CMs compared to adult cardiomyocytes [10,11]. Another key difference is in Ca^{2+} handling which is a crucial physiological process for excitation-contraction coupling (ECC) in mature cardiomyocytes but only partially developed in hiPSC-CMs [12,13]. During the action potential in adult cardiomyocytes, the entry of Ca^{2+} via the L-type Ca^{2+} channels triggers a large release of intracellular Ca^{2+} stored in the sarcoplasmic reticulum (SR) through type 2 ryanodine receptors (RyR2), inducing the activation of the contractile machinery. This mechanism is called “ Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -release” (CICR) [14]. For relaxation, the intracellular cytosolic Ca^{2+} concentration is restored to its resting levels via the sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA) which pumps back Ca^{2+} into the SR and through the Na^+/Ca^{2+} exchanger (NCX) that extrudes it out of the cell. In hiPSC-CMs, the CICR is partly impaired because of a reduced Ca^{2+} content in the SR, leading to a smaller cytosolic Ca^{2+} transient amplitudes and slower kinetics of contraction. Among the proteins involved in Ca^{2+} handling, Calsequestrin2 (CASQ2), which regulates RyR2 activity and is the major Ca^{2+} storage protein of the cardiac muscle [15], was found to be weakly expressed in hiPSC-CMs [12,16]. Recent studies showed that transient overexpression of KCNJ2 in hiPSC-CMs using adenovirus resulted in abolished spontaneous activity and hyperpolarized RMP values [17,18]. CASQ2 expression was also forced in human embryonic stem cells-derived cardiomyocytes (hESC-CMs) by means of an adenoviral vector and improvements of Ca^{2+} transient amplitude and kinetics were observed [19].

In the current study, we engineered hiPSC cell lines with doxycycline-inducible expression of both KCNJ2 and CASQ2 genes in order to test whether the combined effects could potentially improve maturation of hiPSC-CMs further and if they could be useful for preclinical drug testing. We found that doxycycline-induced KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs exhibited increased K^+ conductance through the Kir2.1 channel, generating as expected, more negative resting potential values, shorter action potential and field potential durations. Doxycycline-induced KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs consequently displayed a drastic reduction of spontaneous beating. We also found that upon electrical stimulation, higher beating frequencies could be achieved. All together, these findings indicate that KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs better mimic adult cardiomyocytes than commonly used hiPSC-CMs. Drugs modifying the rhythm and the electrophysiology of cardiomyocytes were tested and showed that the KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs and more generally, genetically engineered hiPSC-CMs could be useful models for preclinical testing of drug cardiac toxicity.

2. Material and methods

2.1. hiPSC Culture and Cardiac Differentiation

Non-modified hiPSCs were purchased from UniverCell Biosolutions (Toulouse, France). The hiPSCs were plated on matrigel-coated (ref. 354277, Corning) culture dishes and maintained in mTeSR® Plus medium (ref. 0525, Stemcell Technologies). Accutase® (ref. A11105-01, Life Technologies) was used to enzymatically dissociate hiPSCs into single cells. The cells were passaged with 2 µM Stemgent hES Cell Cloning & Recovery Supplement (ref. STE01-0014-500, Ozyme) in order to enhance cell survival and attachment. Differentiation of hiPSCs into cardiomyocytes was performed according to a protocol adapted from Lian and colleagues [20]. The undifferentiated hiPSCs were plated on matrigel-coated (ref. 354277, Corning) 60 mm culture dishes (ref. 430166, Corning) and the basal medium made with RPMI 1640 medium (ref. 11875-093, Life Technologies), 500 µg/mL human albumin (ref. A9731, Sigma) and 213 µg/mL L-ascorbic acid (ref. A8960, Sigma), was complemented with 4 µM CHIR99021 (ref. 77052, Stemcell Technologies) and 10 ng/mL BMP4 (ref.130-111-164, Miltenyi) from day 0 to day 2, with 2 µM Wnt inhibitor Wnt-C59 (ref. S7037, Selleckchem) from day 2 to day 3 and with 2.5 µM IWR1 (ref. I0161, Sigma Aldrich) from day 3 to day 4. From day 5, the cells were maintained in EB5% medium (DMEM/F12 medium (ref. 21331, Life Technologies) containing 5% fetal bovine serum (ref.10500-064, Life Technologies), 1% GlutaMAX® (ref.35050-038, Life Technologies), 1% non-essential amino acids (ref.11140-050, Life Technologies), 1% µg/mL penicillin and streptomycin (ref.15140-122, Life Technologies) and 0.2% beta-mercaptoethanol (ref. 10500-064, Life Technologies)). Beating areas were observed from day 9.

2.2. Molecular biology

We modified the plasmid pMK243 (plasmid #72835, Addgene) that contains AAVS1 homology arms and the TET responsive promoter (TRE3GS) to construct the CASQ2 and the KCNJ2 donor vectors. On the one hand, the human CASQ2 cDNA was inserted in the plasmid via the MluI and BglII restriction sites to obtain the CASQ2 donor vector. To build the KCNJ2-eGFP donor vector, a human optimized KCNJ2 cDNA fused to an eGFP coding sequence was generated by gene synthesis and was inserted via the MluI and BglII restriction sites in the pMK243 backbone. In addition, the puromycin selection cassette was replaced by a hygromycin selection cassette via Gibson cloning. U2 and T2 Guide RNA sequences were cloned in the MLM3636-derived vector (plasmid #43860, Addgene, a kind gift of the Joung lab) and a Cas9-expression vector (plasmid #41815, Addgene) was used. The rLV.EF1.Tet3G-9 was produced by Vectalys.

2.3. Generation and isolation of the genetically engineered hiPSC clones

To generate hiPSCs expressing CASQ2, a total of 0.9×10^6 hiPSCs were electroporated with 2 μg of Cas9 expression plasmid, 2 μg of U2 gRNA expression plasmid and 6 μg of KCNJ2-eGFP or CASQ2 donor. Electroporation of hiPSCs was performed according to the manufacturer's instructions with the Lonza 4D-Nucleofector[®] System (program CM-113) and P3 Primary Cell 4D-Nucleofector[®] X Kit S (ref. V4XP-3032, Lonza) and the cells were plated on matrigel-coated (Ref. 354277, Corning) 100 mm culture dishes (ref. 430167, Corning). 4 days after nucleofection, 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ puromycin (ref. A11138-03, Life Technologies) was applied for 5 days. Puromycin-resistant colonies with the best morphology were manually picked, treated with Accutase[®] and seeded in 35 mm culture dish (ref. 430165, Corning). We amplified puromycin-resistant colonies in order to proceed to biobanking with mFreSR[®] (ref. 05855, Stemcell Technologies) and functional characterization. To obtain hiPSC clones that express simultaneously KCNJ2-eGFP and CASQ2, we nucleofected a positive clone for CASQ2 transgene integration with 2 μg of Cas9 expression plasmid, 2 μg of T2 gRNA expression plasmid and 6 μg KCNJ2-eGFP donor. 4 days after nucleofection, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hygromycin B (ref. 10687010, Life Technologies) was applied for 5 days. Then, we proceeded to the same isolation and amplification procedure as described above. To induce expression of transgenes, a lentiviral infection with rLV.EF1.Tet3G-9 that contained an EF1a promoter that drives the expression of the Tet-On[®] 3G transactivator (batch number rV2.1A1.2124 C2) was realized at MOI 80 for 24h. We then treated the hiPSC with 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Geneticin[®] (ref.10131-027, Life Technologies) for 4 days to select the clones that had stably integrated the lentivirus.

Preliminary experiments allowed us to determine the effective doxycycline concentration to induce functional expression of the transgenes. Indeed, we noted the cessation of the spontaneous beating without affecting cell viability of KCNJ2 hiPSC-CMs when they were treated with 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ doxycycline. Besides, this dose enabled the observation of CASQ2 expression in doxycycline-induced CASQ2 and KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs with no side effect on cell survival.

We assessed the functional and electrophysiological phenotypes of one clone for each transgenic cell line.

2.4. Pluripotency assessment

hiPSCs were singularized with Accutase[®]. For the intracellular pluripotent markers, the cells were fixed using Cytifix[®] (ref. 512090KZ, BD Biosciences) for 20 min at 4 °C and washed with stain buffer. Then, the cells were incubated with monoclonal anti- OCT3/4 antibodies conjugated to APC (dilution: 1/10; clone REA338, ref. 130-105-607, MACS Miltenyi Biotec) and monoclonal anti-SOX2

antibodies conjugated to FITC (dilution: 1/10; clone REA320, ref. 130-104-993, MACS Miltenyi Biotec), and diluted in Perm/Wash® buffer (ref. 512091KZ, BD Biosciences), at 4 °C for 30 min. Finally, the cells were washed with stain buffer, centrifuged, and resuspended in a suitable amount of stain buffer for flow cytometry analysis. For each sample, the events were captured on the MACSQuant® VYB flow cytometer and analyzed with MACSQuantify® Software.

2.5. Immunohistochemistry

Cells were fixed with PBS containing 8% paraformaldehyde for 20 min at 4 °C. After washing with PBS, cells were permeabilized and blocked with PBS containing 0.1% Triton-X-100 for 15 min at 4 °C. After washing with PBS, the cells were blocked with PBS containing 1% BSA and 10% horse serum for 1 h at room temperature. Then, the cells were incubated in PBS 1% BSA 10% horse serum, with mouse anti- α -actinin antibody (dilution: 1/800; ref. A7811; Sigma) and with rabbit anti-CASQ2 antibody (dilution: 1/250; ref. 18422-1-AP; Proteintech), overnight at 4 °C. The cells were incubated the next day with goat anti-mouse IgG antibody conjugated to Alexa Fluor® 488 (dilution: 1/1000; ref. A-11001; Invitrogen) and a goat anti-rabbit IgG antibody conjugated to Alexa Fluor® 555 (dilution: 1/1000; ref. A-21428; Invitrogen) for 1 h at room temperature in the dark. Counterstaining was performed using Hoechst (dilution: 1/4000; ref. H3570, Invitrogen) for 10 min at room temperature. The live cells and the stained cells were analyzed with a Nikon Eclipse Ti microscope.

2.6. Generation of Human Embryonic Kidney (HEK-293T) cells expressing constitutive Channelrhodopsin-2 (ChR2)

HEK-293T cells were transduced with a lentivirus carrying a PGK-ChR2-2A-GFP transgene (ref: v740004001, GEG Tech) in accordance with the provider recommendations. The eGFP fluorescence was observed 48h after infection. The cells were singularized and clones expressing ChR2 were isolated via cell sorting using a SONY SH800S Cell Sorter.

2.7. Patch clamp

The hiPSC-CMs were magnetically enriched and purified via the PSC-Derived Cardiomyocyte Isolation protocol based on MACS® technology (ref. 130-110-188, Miltenyi Biotec) between day 29 and day 40 of differentiation and were seeded at single cell density (20000-40000 hiPSC-CMs/well) on glass coverslips (ref. CB00120RAC20MNT0, Thermo Scientific) coated with 10 μ g/mL fibronectin (ref. 354008, Corning). The hiPSC-CMs were treated during 1 to 3 days with 2 μ g/mL doxycycline (ref. D3072, Sigma-Aldrich) before ionic currents and action potential recordings. Patch-clamp experiments were performed at 35 °C and cells were continuously perfused with an external

solution containing (in mM): 140 NaCl, 5 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 glucose, 10 HEPES. pH was set to 7.4 with NaOH 1M. To block the inward rectifier current I_{K1} , 200 μ M BaCl₂ was added to the extracellular solution. The patch pipettes were pulled from thick-walled borosilicate glass capillaries (ref. W3 30-0060 GC150F-7.5, Harvard Apparatus) on a DMZ-universal electrode puller (Zeitz-Instruments GmbH). Electrode impedance was 4–5 M Ω when filled with an internal solution containing (in mM): 110 K⁺ aspartate, 20 KCl, 1 MgCl₂, 0.1 NaGTP, 5 Mg-ATP, 5 phosphocreatine, 1 EGTA, 10 HEPES. pH was adjusted to 7.2 with KOH 1 M. Electrophysiological recordings were made on spontaneous beating hiPSC-CMs in the whole-cell configuration of the patch-clamp technique using digidata 1550/ Multiclamp 700B (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) for data amplification and acquisition. Data were low-pass filtered at 10 KHz and digitized at 5 KHz using Clampex software (pClamp 10.5, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). The amplitude of the intrinsic I_{K1} current of hiPSC-CMs was assessed using the voltage-clamp mode of the whole-cell patch-clamp configuration. The applied protocol consisted of a series of 400 ms steps from a holding potential of –80 mV to a test potential ranging from -120 mV to +30 mV in 10 mV increments. I_{K1} was recorded as a barium sensitive current. First, K⁺ currents were recorded in extracellular solution and next, 200 μ M BaCl₂ was perfused to block inward rectifier channels. The I_{K1} current was determined by subtracting the current traces recorded in the presence of Ba²⁺ from those recorded in control conditions. I_{K1} was defined as the difference current at the end of the 400 ms step and was normalized for cell size through the membrane capacitance. Resting membrane potential assessment was made in current-clamp mode allowing spontaneous action potentials recordings without injecting any current. Data were all corrected for the estimated liquid junction potential of -15.4 mV. For currents and AP analysis, Clampfit software was used (pClamp 10.5, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

2.8. Voltage and Ca²⁺ imaging

Purified hiPSC-CMs differentiated between 33 and 40 days were seeded at a density of 85000 cells/well in black walled clear bottom 96-well plates (ref. 655946, Costar) coated with 10 μ g/mL fibronectin. The hiPSC-CMs were treated during 4-6 days with 2 μ g/mL doxycycline before fluorescence measurement. The Cal-520[®] (ref. 171868, Abcam) Ca²⁺ assay was performed as outlined in the product information sheet provided with the Hamamatsu FDSS/ μ Cell (ref. C13299, Hamamatsu). Briefly, a stock solution of Cal-520 dye was prepared at 5 mM in DMSO. Assay buffer was made from Hank's Balanced Saline Solution (ref. 14025, Gibco) buffered with 20 mM HEPES (ref. 15630, Gibco) and supplemented with 5% fetal bovine serum. Powerload[®] concentrate (ref.

P10020, molecular probes) was used to enhance the dye solubility. Probenecid, water soluble (ref. P36400, molecular probes) was added to suppress efflux of fluorescent dyes. Cells were incubated in 5 μM of Cal-520 dye for 90 minutes at 37°C, or with the Fluovolt® dye (ref. F10488, Molecular Probes) according to the manufacturer's recommendation (no indication of the resulting concentration) for 30 minutes, washed twice with warm dye-free assay buffer and then imaged in 120 μL per well of warm assay buffer. hiPSC-CMs were treated with caffeine (5 mM) and thapsigargin (5 μM) dissolved in warm dye-free assay buffer. Fluorescence measurements and treatments were performed into Functional drug screening system (FDSS/ μCell) at 37°C. Drugs were pipetted from a 96-well compound plate, and 30 μL was injected in the wells containing the hiPSC-CMs. The drug dilution factor was one-fifth, which was considered in the preparation of compounds. The intracellular Ca^{2+} concentration changes (Ca^{2+} transients) were measured for 1 to 2 minutes. Compounds were then injected, and activity was recorded for 10 to 15 minutes. The membrane potential changes (action potentials) were measured for 3 to 5 minutes. Cells were then electrically stimulated and the paced activity was recorded (electrical stimulation protocol: 1 Hz, 2 Hz, 3 Hz and 4 Hz; 10ms/pulse; voltage 5V). The data was recorded using FDSSv3 Software (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu). FDSSv3 Software and FDSS Waveform Analysis Software for Cardiomyocytes (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu) were used for analyzing Ca^{2+} transient peak amplitude, Ca^{2+} baseline and action potential duration at 20 %, 50 % and at 80 % of maximal amplitude (APD20, APD50 and APD80, respectively). Corrected APD20, 50 and 80 were then calculated with Fridericia's formulae: $\text{APDc} = \text{APD} / (\text{Beat Period})^{1/3}$.

2.9. Analysis of cardiac functionality on microelectrode array system

One day before their use, the HEK-ChR2 cells were treated with 10 ng/mL mitomycin C (ref. 10107409001, Roche Diagnostics) during 3 hours at 37°C. Purified hiPSC-CMs differentiated between 19 and 34 days were seeded with mitomycin-treated HEK-ChR2 cells (ratio CM/HEK: 5:1) at a density of 40000 cells/well in Lumos® MEA 48-well plates (ref. M768-tMEA-48OPT, Axion Biosystems) coated with fibronectin (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The cells were treated during 3-7 days with 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ doxycycline before the electrophysiological assays. The monolayers were assayed with and without drug and paced at 3 different frequencies (1, 1.2 and 1.5 Hz) using the Lumos® optical stimulator (Axion Biosystems, USA) with simultaneous recording of field potentials with the Maestro PRO® (Axion Biosystems, USA) at 37 °C and 5% CO_2 . Optical pacing pulses were executed at 474 nm, 40% of the maximal power, 10 ms pulse. Baseline electrical hiPSC-CMs activity was recorded for the spontaneously beating cells as well as for paced cells for 4 min each. hiPSC-CMs were treated with

isoproterenol (0.02, 0.08, 0.2 and 0.6 μ M, ref. I6504, Sigma-Aldrich), lidocaine (4, 20 and 100 μ M, ref. L7757, Sigma-Aldrich), verapamil (0.02, 0.1 and 0.5 μ M, ref. PHR1131, Sigma-Aldrich), and E-4031 (0.01, 0.1 and 1 μ M, ref. M5060, Sigma-Aldrich). Lidocaine, verapamil and E-4031 were diluted in DMSO. The monolayers were incubated without or with the drugs for 20 minutes at 37 °C and 5% CO₂ before measurement. The data was recorded using AxIS Navigator® version 2.0.4 and data analysis was performed on Cardiac Analysis Tool® version 2.2.7 (Axion Biosystems, USA) where the golden channel identifications were manually achieved in data before and after drug addition, for all unpaced and paced conditions. The following settings were applied to the baseline parameters: (1) hiPSC-CM baseline spontaneous beating rate should be within 1–240 beats per minute (0.02–4 Hz); (2) depolarization spike amplitude should be between 0.1 and 0.3 mV; (3) the cells should be captured by the pacing stimuli, with the chosen stimulation pulse parameters (described above).

2.10. Statistical tests

Nonparametric Mann–Whitney t-tests and Kruskal-Wallis with Dunn’s multiple comparison test were performed to determine statistically significant differences between means (* P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001 and **** P < 0.0001) using Graphpad PRISM 5.04. Error bars indicate standard error of mean (SEM).

3. Results

3.1. Generation of hiPSC-CMs simultaneously expressing KCNJ2-eGFP and CASQ2

Using the CRISPR/Cas9 system, we introduced doxycycline-inducible KCNJ2-eGFP and CASQ2 transgenes into the AAVS1 locus of hiPSCs in two sequential targeting events. Next, we transduced a lentivirus encoding for the third generation Tet-On® transactivator (Tet-On 3G) in order to activate transgene expression upon doxycycline addition to the culture medium. In parallel, single KCNJ2 or CASQ2 transgenic hiPSC cell lines were obtained. Genome edited hiPSCs were treated with doxycycline and cell clones expressing the proteins of interest were isolated (figure 1A). These interventions on the hiPSC genome as well as the cloning steps involved did not alter the pluripotency of the cells, as suggested by the maintenance of Oct3/4 and Sox2 expression and confirmed by their ability to differentiate into cardiomyocytes (Figure 1 B, C and D). The doxycycline-inducible expression of the proteins was verified after differentiation into cardiomyocytes. Immunostaining of CASQ2 and fluorescence imaging of KCNJ2-eGFP showed that the proteins were localized respectively in the cytoplasm and at the cell membrane, as expected (Figures 1C and D).

3.2. KCNJ2 expression drastically reduces the spontaneous beating rate

hiPSC-CMs exhibit spontaneous beating mainly due to the very low levels of the inward rectifier K⁺ current I_{K1} which stabilizes the RMP and plays a major role during the late phase of the repolarization in adult cardiomyocytes [9]. As Kir2.1 channel encoded by KCNJ2 gene is mostly responsible of the I_{K1} current, we investigated the spontaneous beating rate, RMP and the I_{K1} current density in the genetically modified cells. Cells were treated with doxycycline to induce expression of the transgenes and the beating rate was studied through FDSS/ μ Cell four days later. While the beating rate of the hiPSC-CMs with doxycycline-dependent expression of CASQ2 (CASQ2 hiPSC-CMs) was not modified, hiPSC-CMs with doxycycline-dependent expression of KCNJ2-eGFP (KCNJ2 hiPSC-CMs) had a progressively reduced automaticity over time which led to the cessation of spontaneous beating after only 48h of doxycycline treatment (Figure 2A). The I_{K1} current inhibitor BaCl₂ restored beating activity as soon as it was added to the culture medium and cell quiescence was reinstated a few seconds after its removal, thus confirming that cell quiescence was due to induction of the I_{K1} current (data not shown). In the double transgenic KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs, spontaneous beating was considerably reduced but not fully abolished (0.05 ± 0.02 Hz vs. 0.89 ± 0.08 Hz without doxycycline; $P < 0.0001$; Figure 2A).

3.3. RMP and I_{K1} current values in KCNJ2-expressing hiPSC-CMs are similar to mature cardiomyocytes

Patch-Clamp experiments were performed to measure the RMP values and I_{K1} densities of the genetically modified hiPSC-CMs treated with doxycycline during 24-72h. As previously reported [21], the RMP of the control hiPSC-CMs was less polarized than in adult cardiomyocytes (-60.48 ± 1.49 mV and -85 mV, respectively) which largely contributes to the automaticity of hiPSC-CMs (Figure 2B). In CASQ2 hiPSC-CMs, the RMP was also weakly polarized and similar to control values (-55.65 ± 2.07 mV); this finding was expected since CASQ2 is involved in Ca²⁺ handling and not directly related to the control of RMP. In contrast, KCNJ2 hiPSC-CMs were quiescent when treated with doxycycline and had a RMP value (-75.94 ± 1.21 mV, $P < 0.001$) close to that reported in adult cardiomyocytes. It was also true for KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs (-77.53 ± 1.69 mV, $P < 0.001$; Figure 2B). Even though the RMP in KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs was similar to the one measured in KCNJ2 hiPSC-CMs, the former cells did not become fully quiescent. The difference between the RMP recorded in the presence and in the absence of BaCl₂ allowed us to determine the hyperpolarization due to Kir2.1 function. BaCl₂ removal induced a hyperpolarization of -14.28 ± 0.99 mV and -18.09 ± 4.68 mV in

KCNJ2 and KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs ($P < 0.0001$), respectively, while the polarization for the control hiPSC-CMs was only -1.47 ± 0.49 mV (Figure 2C). The current-to-voltage relationship of the I_{K1} current was assessed by voltage-clamp experiments. The control hiPSC-CMs exhibited almost no I_{K1} current. In contrast, doxycycline-induced KCNJ2 and KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs were found to display a similar typical inwardly rectifying current with the current-to-voltage relationship exhibiting a negative slope conductance between -40 mV and $+20$ mV, confirming the functional expression of Kir2.1 channels. The inward current density at -120 mV was -37.29 ± 4.75 pA/pF and -44.51 ± 4.20 pA/pF and the outward current density at -40 mV was 15.64 ± 2.71 pA/pF and 14.61 ± 3.19 pA/pF for KCNJ2 and KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs, respectively (Figures 2D and E). Together, these values are in accordance with those reported in human adult ventricular cardiomyocytes [22]. These results demonstrate functional expression of KCNJ2 in doxycycline-induced KCNJ2 and KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs and confirmed that the Kir2.1 channels are almost functionally absent in control hiPSC-CMs, explaining the weakly polarized RMP values in these cells.

3.4. Inducing KCNJ2 expression shortens APDs in hiPSC-CMs

To gain insight into the functional consequences of CASQ2 and KCNJ2 expression on hiPSC-CM repolarization, we paced control and doxycycline-induced hiPSC-CMs with the different transgenes at 1 Hz by electrical field stimulation (EFS) and measured the action potential durations (APDs) using the FDSS/ μ Cell. Inducing CASQ2 expression alone did not modify the APDs (Figure 3A). In contrast, doxycycline-induced KCNJ2 hiPSC-CMs exhibited significantly shortened APD₂₀, APD₅₀ and APD₈₀ values compared to their non-induced counterparts (APD₂₀: 47.7 ± 2.4 ms vs. 118.4 ± 4.8 ms without doxycycline, $P < 0.0001$; APD₅₀: 123.5 ± 4.5 ms vs. 251.1 ± 9.3 ms without doxycycline, $P < 0.0001$; APD₈₀: 221.0 ± 5.7 ms vs. 387.8 ± 12.2 ms without doxycycline, $P < 0.0001$). KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs also displayed significantly shortened APDs (APD₂₀: 52.3 ± 5.6 ms vs. 123.5 ± 3.2 ms without doxycycline, $P < 0.001$; APD₅₀: 133.0 ± 10.8 ms vs. 210.9 ± 24.8 ms without doxycycline, $P < 0.01$; APD₈₀: 235.6 ± 13.8 ms vs. 398.8 ± 8.3 ms without doxycycline, $P < 0.001$; Figure 3A). The decrease of the APD₅₀ in doxycycline-treated cells was more severe in KCNJ2 than in KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs since it was reduced to 51% vs. 37%, respectively ($P < 0.05$, t-test). These results confirm previous findings [18] and further establish the benefit of inducing KCNJ2 expression in hiPSC-CMs on APD, leading to durations close to those reported in native ventricular tissues [23].

3.5. KCNJ2 and KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs are able to follow high frequency pacing

We next investigated the impact of the expression of KCNJ2 and CASQ2 on the ability of hiPSC-CMs

to follow EFS at higher frequencies. For each of the three types of hiPSC-CMs, we observed that in the absence of doxycycline treatment, cell layers in only 45 to 48 % of the wells were able to follow stimulation at 2 Hz and none followed at 3 Hz and higher. Similar results were observed for CASQ2 hiPSC-CMs treated with doxycycline (61% of the wells of CASQ2-hiPSC-CMs followed at 2 Hz and 0% at 3 Hz). On the other hand, both KCNJ2 and KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs were able to follow pacing at 3 Hz and 4 Hz, with a higher percentage of responding wells for KCNJ2 hiPSC-CMs (at 3 Hz: 92% vs. 73% and at 4 Hz: 56% vs. 38%, for KCNJ2 and KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs respectively; Figure 3B). This result suggests that KCNJ2 expression enables high frequency pacing. APDs 20, 50 and 80 were next determined at 2 and 3 Hz stimulation for KCNJ2 and KCNK2-CASQ2 hiPSC-CMs. We observed that for both clones, the APDs shortened according to the increase in pacing (Figure 3C). This ability of both KCNJ2 and KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs to reduce their APDs in order to adapt to high pacing frequency is characteristic of adult cardiomyocytes [24].

3.6. Simultaneous expression of KCNJ2 and CASQ2 enhances Ca²⁺ storage

To investigate the effect of CASQ2 expression, we treated CASQ2 and KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs with caffeine, an opener of ryanodine receptors and compared the ratio of Ca²⁺ peak transient amplitude measured after caffeine treatment in doxycycline-induced condition to that measured in the absence of doxycycline. Application of 5mM caffeine to KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs resulted in a significantly higher Ca²⁺ peak transient amplitude compared to the non-induced hiPSC-CMs (Figure 4A). The fold increase of Ca²⁺ peak transient amplitude with caffeine was 2.74 ± 0.23 for doxycycline-induced KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs vs. 1.94 ± 0.13 for non-induced controls ($P < 0.05$; Figure 4B). Doxycycline-induced CASQ2 hiPSC-CMs also displayed a slight increase of Ca²⁺ peak transient amplitude (2.64 ± 0.11 vs. 2.44 ± 0.17 for non-induced controls, $P = 0.95$; Figure 4B). The increase of the ratio between doxycycline-induced and non-induced cells was higher in KCNJ2-CASQ2 than in CASQ2 hiPSC-CMs. Since Ca²⁺ handling measurements were performed on spontaneously active hiPSC-CMs, we were not able to investigate the Ca transients of KCNJ2 hiPSC-CMs which were quiescent upon doxycycline induction (as shown in Figure 2A). We next evaluated the impact of thapsigargin, a specific SERCA inhibitor, on Ca²⁺ contents. CASQ2 hiPSC-CMs treated with 5 μ M of thapsigargin exhibited a less severe decrease of Ca²⁺ transient amplitude, with a 0.73-fold change (± 0.03) of Ca²⁺ transient amplitude after thapsigargin treatment compared to a 0.64-fold change (± 0.03) in the non-induced CASQ2 hiPSC-CMs ($P < 0.01$) (Figure 4C). This finding was reinforced in KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs (0.92 ± 0.04 vs. 0.62 ± 0.03 -fold change in doxycycline-induced vs. non-induced hiPSC-CMs, respectively, $P < 0.001$; Figure 4C). For both cell lines, we observed an increase

of Ca²⁺ baseline. Nevertheless, this elevation was not different between doxycycline-induced and non-induced cells (data not shown). Altogether, caffeine and thapsigargin effects suggest enhanced SR Ca²⁺ buffering upon induction of CASQ2 expression in hiPSC-CMs. In KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs this phenomenon was significantly increased, suggesting that KCNJ2 expression reinforces the effect of CASQ2 expression on Ca²⁺ handling properties.

3.7. Enhanced spike slope and reduced field potential duration in KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs under optogenetic pacing

Since inducing KCNJ2 expression led to a drastic beating rate decline, we developed an optogenetic pacing system in order to further characterize the electrophysiology of the cells. HEK-293T cells constitutively expressing a Channelrhodopsin-2 (ChR2-T2A-eGFP) transgene were generated (called HEK-ChR2). The expression of the ChR2-T2A-eGFP transgene was visualized by the detection of eGFP fluorescence (Figure 5A). Preliminary experiments demonstrated ChR2 function since HEK-ChR2 cells were able to drive contractions of cocultured adult canine cardiomyocytes in response to illumination at different frequencies [25]. hiPSC-CMs pacing was successfully induced by HEK-ChR2 cells in response to illumination and abolished by treating cocultured cells with carbenoxolone, a gap junction inhibitor, which showed that pacing takes place through gap junctions between HEK-ChR2 cells and hiPSC-CMs (Figure 5B). We next paced the hiPSC-CMs at 1.5 Hz and recorded extracellular field potentials (EFPs). CASQ2 hiPSC-CMs displayed a significantly reduced spike amplitude compared to their non-induced counterparts (Spike amplitude ratio: doxycycline-induced/non-induced = 0.81 ± 0.06 , $P < 0.5$). We did not observe significant differences in the spike amplitude of EFPs between doxycycline-induced and non-induced cells of KCNJ2 and KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs lines (Figure 5C). Besides, CASQ2 hiPSC-CMs also exhibited a significant reduction of the spike slope compare to the non-induced hiPSC-CMs (Spike slope ratio: doxycycline-induced/non-induced = 0.80 ± 0.08 , $P < 0.5$). Doxycycline-induced KCNJ2 hiPSC-CMs did not have a significantly different spike slope (Spike slope ratio: 1.04 ± 0.17 , $P = 0.37$) while doxycycline-induced KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs displayed a significant increase of this metric (Spike slope ratio: 1.33 ± 0.13 , $P < 0.5$) (Figure 5D). As the spike slope is related to the function of Na⁺ channels, this result suggests that the simultaneous expression of KCNJ2 and CASQ2 may lead to an enhanced I_{Na}. In addition, given the results obtained with the APDs, we investigated whether the transgenes expression modified the field potential duration (FPD). The corrected FPD (FPD_c, Fridericia formula) of doxycycline-induced CASQ2 hiPSC-CMs was not different from that of non-induced hiPSC-CMs (180.70 ± 8.38 vs. 186.50 ± 8.13 ms; Figure 5C). On the other hand, doxycycline-induced KCNJ2 and

KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs exhibited significantly shortened FPDcs (128.80 ± 5.70 vs. 195.70 ± 6.81 ms, $P < 0.001$ and 131.50 ± 9.93 vs. 176.70 ± 13.48 ms, $P < 0.05$, respectively), which represent -35% and -27% reductions, respectively, in comparison to their non-induced counterparts (Figure 5E). These electrophysiological features, obtained by optogenetic pacing with HEK-ChR2 cells, are consistent with the APD values assessed by pacing monoculture of hiPSC-CMs with EFS. During these experiments, we noted that unexpectedly, 60% of the cell layers of doxycycline-induced KCNJ2 hiPSC-CMs cocultured with HEK-ChR2 were able to beat spontaneously at a very low rate (0.11 ± 0.03 , data not shown).

3.8. Pharmacological properties of spontaneously beating hiPSC-CMs induced to express KCNJ2 and/or CASQ2

An important application of hiPSC-CMs is to help identify cardiac toxicity of candidate drugs. The effects of drugs known to impact the beating activity of cardiomyocytes were therefore investigated in the different types of hiPSC-CMs.

3.8.1. Isoproterenol

We first tested isoproterenol, a β -adrenergic agonist that has positive chronotropic and inotropic properties on the heart. The effects of isoproterenol were evaluated on the spontaneous beating rate and FPDc of the genetically engineered hiPSC-CMs in co-culture with HEK-ChR2 cells. We used cocultures to take advantage of our unanticipated finding that cells expressing KCNJ2 alone exhibited spontaneous beating in this experimental setting. For the CASQ2 hiPSC-CMs, we did not observe any difference for these two readouts of beating activity between doxycycline induced and non-induced cells. We observed that for doxycycline-induced and non-induced KCNJ2 and KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs, the beating rate increased slightly when isoproterenol concentrations were increased from 0.02 to 0.6 μ M (Figure 6A). In addition, we noted that the increase of the beating rate ratio upon isoproterenol treatment differed between the two types of cells. We monitored a 4.48-fold increase (± 0.89) when the doxycycline-induced KCNJ2 hiPSC-CMs were treated with 0.2 μ M isoproterenol, while the non-induced counterparts only exhibited a 1.55-fold increase (± 0.17). In doxycycline-induced KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs, the beating rate increased by 2.25 folds (± 0.33) while the non-induced counterparts exhibited a 1.56-fold increase (± 0.10) (Figure 6C). The effect of isoproterenol on the beating rate was also monitored by a second experimental setup, using FDSS and KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs. After application of 0.3 μ M isoproterenol, we noted that doxycycline-induced KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs exhibited a 11.84-fold increase (± 2.58) in comparison with the

non-induced controls which exhibited an elevation of the beating rate by a factor of $2.38 (\pm 0.13)$ (Figure 6D). The fact that the beating rate augmentation under isoproterenol treatment was higher in doxycycline-induced KCNJ2 and KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs could reasonably be attributed to the overexpression of Kir2.1 channel and the resulting enhanced I_{K1} current which is responsible for reducing the spontaneous beating rate. These observations suggest that lower beating activity of engineered hiPSC-CMs may help to better detect a potential positive chronotropic effect of drugs. Interestingly, we noted that β -adrenergic stimulation of KCNJ2 and KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs considerably increased their beating rate without reducing their FPDc which was already significantly shortened by KCNJ2 expression (Figure 6B). The FPDc of the doxycycline-induced KCNJ2 hiPSC-CMs did not change upon increasing concentrations of isoproterenol and for KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs, it reached a plateau as soon as the first dose was applied (Figure 6B). One possibility is that KCNJ2 expression levels induced by doxycycline result here in a strong shortening of FPDcs that occludes further increase in repolarizing currents such as I_{Ks} , the main K^+ channel activated by isoproterenol [26].

3.8.2. Lidocaine

Na^+ channel blockers such as local anesthetics are generally poorly detected using hiPSC-CMs in cardiotoxicity assays [27]. Using lidocaine, we have evaluated the potential effects of CASQ2 and KCNJ2 expression on hiPSC-CM sensitivity to this kind of pharmacological agent. The non-induced controls and the doxycycline-induced CASQ2 hiPSC-CMs did not exhibit any change in beating rate for all the lidocaine concentrations tested (Figure 7A). For KCNJ2 hiPSC-CMs, 42% and 80% of the layers stopped beating when treated with 20 μ M and 100 μ M of lidocaine, respectively. Interestingly, 100% of the KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs remained contractile at 20 μ M and then became quiescent at 100 μ M lidocaine (Figure 7B). These results suggest that KCNJ2- and KCNJ2-CASQ2-expressing hiPSC-CMs are more sensitive to the Na^+ channel blocker lidocaine than immature hiPSC-CMs.

3.8.3. Verapamil

Voltage-gated Ca^{2+} channels (VGCCs) were investigated by treating the genetically engineered hiPSC-CMs with verapamil. All the non-induced control hiPSC-CMs became quiescent as soon as 0.1 μ M verapamil was dispensed. At this concentration, only 16.7% of the CASQ2 hiPSC-CMs were still beating, while 100% of the KCNJ2 and KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs continued to beat. At 0.5 μ M, only the KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs exhibited a beating activity, as we observed 50% of beating layers.

(Figure 7C). These results suggest that KCNJ2 expression renders cardiomyocyte pacemaker activity less dependent on Ca^{2+} entry via the VGCCs. This is in good keeping with the strongly reduced APD20 and APD50 values reported above after induction of KCNJ2 expression.

3.8.4. E-4031

E-4031, a blocker of the hERG (human Ether-à-go-go-Related Gene) K^+ channel, was tested on CASQ2 and KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs to investigate whether the transgenic cell lines were able to recapitulate arrhythmias. Even if we measured the expected lengthening of the FPDc according to the increasing doses of E-4031, we did not observe any significant difference between the doxycycline-induced and non-induced CASQ2 hiPSC-CMs (Figure 7D). For doxycycline-induced KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs, we observed a 2.76-fold increase of arrhythmic events in comparison to the non-induced control cells (75% vs. 27.2% of arrhythmia, respectively; Figure 7E). Interestingly, the expression of CASQ2 alone prevented the occurrence of arrhythmia induced by FPD prolongation, suggesting that the higher propensity to arrhythmias observed in the KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs treated with E-4031, could be linked to KCNJ2 expression.

4. Discussion

In this study, we generated stable genetically engineered hiPSCs with inducible expression of KCNJ2, CASQ2 or both proteins, in order to examine if KCNJ2 and CASQ2 co-expression could further improve the maturation and functionality of the hiPSC-CMs. We found that KCNJ2 and KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs displayed a similar hyperpolarized RMP with values close to those reported in cardiomyocytes of the adult heart [28], conferring these genetically engineered hiPSC-CMs a phenotype closer to that of fully mature ventricular cardiomyocytes. Besides, we showed that inducing strong CASQ2 expression led to an increase of Ca^{2+} transient amplitude after caffeine treatment while co-expression of CASQ2 and KCNJ2 further enhanced this increase. Additionally, after SERCA blockade by thapsigargin, doxycycline-induced CASQ2 hiPSC-CMs exhibited a high decrease of the Ca^{2+} transient amplitude while doxycycline-induced KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs displayed a less severe reduction. These results suggest that the expression of the two proteins synergizes to increase SR Ca^{2+} content to higher levels than that achieved by stimulating CASQ2 expression alone. This result reinforces the potential role of KCNJ2 in Ca^{2+} handling as already suggested by the increase of Ca^{2+} transient amplitude measured in hiPSC-CMs with adenovirus-mediated KCNJ2 expression that were electrically stimulated at 0.5 and 1 Hz [17]. While inducing

KCNJ2 expression alone in hiPSC-CMs abolished spontaneous beating, hiPSC-CMs that co-expressed KCNJ2 and CASQ2 exhibited a slow spontaneous beating activity. One possible explanation lies on the rhythmic occurrence of Ca^{2+} release from a fully loaded SR, leading to the regular triggering of APs, a phenomenon named Ca^{2+} Clock [29]. Indeed, we have shown that KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs exhibited enhanced Ca^{2+} transients upon caffeine treatment, suggesting a better SR Ca^{2+} sequestration. In such conditions, it is plausible that spontaneous and rhythmic Ca^{2+} releases may still occur, activating the forward and depolarizing mode of the NCX pump, leading to the activation of Ca^{2+} and Na^+ channels and the recovery of a spontaneous beating activity [30].

In addition, the I_{K1} current densities reached by treating KCNJ2 and KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs with doxycycline were similar to those measured in adult ventricular cardiomyocytes and the current-to-voltage relationship recapitulated that of adult ventricular I_{K1} [9,22]. Furthermore, KCNJ2 and KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs exhibited shortened APD values. In fact, inducing KCNJ2 expression led to APD values close to those reported in native ventricular tissue [23]. We described that KCNJ2 expression in hiPSC-CMs, alone or in association with CASQ2, enabled high frequency pacing, up to 4 Hz. Induction of such robust pacing in hiPSC-CMs could be useful for cardiac toxicity assays in order to pinpoint drugs with a use-dependent effect, such as local anesthetics. Finally, it has been reported that the Kir2.1 ionic channel interacts with $\text{Na}_v1.5$, the channel that conducts the cardiac Na^+ current I_{Na} . $\text{Na}_v1.5$ has been reported to form a macromolecular complex with Kir2.1 in which they reciprocally regulate each other's expression and function [31,32]. Li and colleagues [18] demonstrated that expression of KCNJ2 in hiPSC-CMs could increase I_{Na} since the upstroke velocity of APs was enhanced in those cells. In accordance with those data, we found here, through MEA assays, that KCNJ2 hiPSC-CMs displayed a tendency towards increased EFP rising slope, a parameter related to Na^+ channel activity [33]. Furthermore, in KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs, EFP rising slope was significantly enhanced, further suggesting a benefit on the level of I_{Na} current activity when both proteins are expressed simultaneously. Overall, these results indicate that KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs exhibited a more mature phenotype than control hiPSC-CMs.

hiPSC-CMs have great potential for performing predictive cardiotoxicology assays *in vitro*. They are being evaluated for cardiac electrophysiological toxicity in the Comprehensive *in vitro* Proarrhythmia Assay (CiPA) initiative, a collaborative program among the Food and Drug Administration, pharmaceutical industry and academia, to develop a pilot program that utilizes systems pharmacology models and cellular-based approaches for the prediction of drug-induced alteration of cardiac electrophysiology that translates to clinical cardiotoxicity [34]. One component of the CiPA initiative focused on the possibility of using hiPSC-CMs as a surrogate to adult ventricular

cardiomyocytes, whose access is very limited. Reliable predictions of cardiotoxicity require hiPSC-CMs to closely mimic adult cardiomyocyte electrophysiology, in particular to detect arrhythmias such as Torsades de Pointes (TdPs). E-4031 is a well-known I_{Kr} current blocker that induces QT prolongation and have been associated with proarrhythmic effect such as TdPs [35]. We showed here that E-4031 significantly impacted KCNJ2-CASQ2 hiPSC and such engineered hiPSCs could therefore be useful for predictive toxicology. Indeed, if hERG channel blockade is a well-known target of pro-arrhythmic drugs, abnormal Ca^{2+} release by SR can also trigger arrhythmias and the simultaneous expression of KCNJ2 and CASQ2 may therefore also enhance the sensitivity to such effects [36]. It will be interesting to test other pro-arrhythmogenic compounds and further demonstrate if genetically engineered hiPSC-CMs can help to discriminate drugs with low and high risk for TdPs. Another potential application of these engineered cells is the better detection of Na^+ channel blockers and drugs with positive chronotropic effects. Indeed, it is currently difficult to identify Na^+ channel blockers using commercially available hiPSC-CMs [27], and in contrast, we found that KCNJ2-CASQ2-hiPSC-CMs exhibited significantly enhanced sensitivity to lidocaine, a typical Na^+ channel blocker. Finally, the overexpression of Kir2.1 channel which is responsible of the low beating rate seems to be also at the origin of higher sensitivity of KCNJ2 and KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs to isoproterenol-induced chronotropic effects. A slow beating activity of hiPSC-CMs may help to better detect the potential positive chronotropic effect of a drug and we showed that this requirement can be achieved either by simultaneously expressing KCNJ2 and CASQ2 or by coculturing hiPSC-CMs with HEK-ChR2 cells, these two conditions rendering KCNJ2 expressing hiPSC-CMs able to beat.

In this study, we have introduced inducible expression of KCNJ2 and CASQ2 and observed that KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs exhibited a more mature phenotype than control hiPSC-CMs with benefits on cardiac physiology and sensitivity for testing cardiac effects of drugs. Future studies may test the benefit of inducing the expression of additional maturation genes and apply to such genetically engineered cells other original methods reported to enhance cardiac maturation. For example, preliminary results generated by our team indicate that shifting cells towards oxidative metabolism, culture on 2D patterned substrates or biocompatible synthetic materials that have similar stiffness to the native matrix and co-culture with the different cell types found in the myocardium could all help. In this regard, pacing by optogenetic stimulation of HEK-ChR2 appears to be a promising way forward. Training by electrical stimulation can be used to enhance maturation but may also have negative effects because of the electrode oxidation, the generation of toxic chemical compounds such as hydroxyl radicals, hypochlorous acid and chlorate and pH alterations owing to water

hydrolysis [37,38]. Previous studies have already used optogenetic stimulation by ChR2 directly expressed in cardiomyocytes, but several limitations were observed such as lowered cell viability and adverse morphological changes (e.g. membrane blebbing and strong ChR2 protein aggregation in the cytoplasm) in neonatal rat ventricular myocytes [39] or slowed-down development in hiPSC-CM [40]. To try to circumvent those problems and prevent the potential interference of ChR2 with other ion channels at the cell membrane of the hiPSC-CMs, we generated an HEK-293T cell line overexpressing ChR2 and co-cultured those cells with hiPSC-CMs. We confirmed the existing functional electric junctions between the HEK-ChR2 cells and the hiPSC-CMs by inhibiting the coupling between the two cell types, when carbenoxolone is added on the coculture layers [25]. Interestingly, we observed the restoration of the spontaneous beating at a very low frequency (0.11 Hz) in the KCNJ2 hiPSC-CMs when co-cultured with the HEK-ChR2 cells. HEK-293T cells are known to exhibit a weak membrane potential [41,42], that could induce a depolarization of the neighboring hiPSC-CMs, partially neutralizing I_{K1} -induced hyperpolarization and thereby possibly responsible for the beating activity restitution. We were able to optically pace the hiPSC-CMs at different rates (from 1.2 Hz to 3 Hz, data not shown), without reproducing the undesirable effects associated to the direct expression of ChR2 in cardiomyocytes described above. In summary, this HEK-ChR2 cells will offer the interest to pace over a long period of time different hiPSC-CM clones rendered quiescent by protein overexpression or by other complementary approaches and may improve the maturation of other cardiac properties (e.g. ultrastructure, contractile force) as shown by electro-mechanical training [43].

5. Conclusions

We have demonstrated that (i) KCNJ2 and KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs exhibit respectively, no or drastically reduced spontaneous activity, (ii) KCNJ2 and KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs display hyperpolarized RMP similar to adult human cardiomyocytes, (iii) which is due to an increased K⁺ conductance through the expression of the Kir2.1 channel. (iv) As a consequence, KCNJ2 and KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs have shortened action potential and field potential durations allowing them to be electrically paced up to 4 Hz. (v) KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs show enhanced Ca²⁺ release and storage from SR Ca²⁺ stores. Expression of KCNJ2 and CASQ2 in hiPSC-CMs recapitulates the benefits of the proteins expressed independently. For important aspects of the cardiomyocyte physiology, Ca²⁺ handling and arrhythmia detection, KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs are promising models for predictive toxicology studies.

Disclosures

G. P., C. B., V. L., N. R., C. C., A. C., S.V., C. O., V. M., B. B., JM. I. are employees of Sanofi. A.B. is an employee of MNHN. JP. C. is an employee of INSERM. AHY. K. is an employee of Sanofi and INSERM.

Funding

This work was supported by Sanofi, INSERM, MNHN and ANRT.

Author contributions

Conceptualization and supervision: B.B., JP. C. and JM. I.; Methodology: A.H.Y. K., G. P., C. B., V. L., N. R., C. C., A. C., S.V and A.B; Investigation: A.H.Y. K., G. P., C. B., V. L., N. R.; Writing-original draft: A.H.Y. K and JM. I.; Writing-review and editing: V.L., N. R., B.B. and JP. C.

Acknowledgments

We would like to acknowledge Karine Berthelot, Sophie Boisrobert-Blais, Dorine Chassin, Cécile Faure, Céline Lefranc, Nicole Meritet and Gwénaëlle Ret-Lecuelle for expert technical assistance. We thank Ali Tebbi and Giovanna De Filippi from Axion Biosystems for their technical help and the loan of the Maestro Pro.

References

- [1] I. El-Battrawy, H. Lan, L. Cyganek, Z. Zhao, X. Li, F. Buljubasic, S. Lang, G. Yücel, K. Sattler, W.-H. Zimmermann, J. Utikal, T. Wieland, U. Ravens, M. Borggreffe, X.-B. Zhou, I. Akin, Modeling Short QT Syndrome Using Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes, *J Am Heart Assoc.* 7 (2018). <https://doi.org/10.1161/JAHA.117.007394>.
- [2] F.M. Drawnel, S. Boccardo, M. Prummer, F. Delobel, A. Graff, M. Weber, R. Gérard, L. Badi, T. Kam-Thong, L. Bu, X. Jiang, J.-C. Hoflack, A. Kiialainen, E. Jeworutzki, N. Aoyama, C. Carlson, M. Burcin, G. Gromo, M. Boehringer, H. Stahlberg, B.J. Hall, M.C. Magnone, K. Kolaja, K.R. Chien, J. Bailly, R. Iacone, Disease Modeling and Phenotypic Drug Screening for Diabetic Cardiomyopathy

using Human Induced Pluripotent Stem Cells, *Cell Reports*. 9 (2014) 810–820.

<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.09.055>.

[3] J.-M. Itier, G. Ret, S. Viale, L. Sweet, D. Bangari, A. Caron, F. Le-Gall, B. Bénichou, J. Leonard, J.-F. Deleuze, C. Orsini, Effective clearance of GL-3 in a human iPSC-derived cardiomyocyte model of Fabry disease, *J. Inherit. Metab. Dis.* 37 (2014) 1013–1022. <https://doi.org/10.1007/s10545-014-9724-5>.

[4] K. Blinova, J. Stohlman, J. Vicente, D. Chan, L. Johannesen, M.P. Hortigon-Vinagre, V. Zamora, G. Smith, W.J. Crumb, L. Pang, B. Lyn-Cook, J. Ross, M. Brock, S. Chvatal, D. Millard, L. Galeotti, N. Stockbridge, D.G. Strauss, Comprehensive Translational Assessment of Human-Induced Pluripotent Stem Cell Derived Cardiomyocytes for Evaluating Drug-Induced Arrhythmias, *Toxicol. Sci.* 155 (2017) 234–247. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfw200>.

[5] M. Kawamura, S. Miyagawa, S. Fukushima, A. Saito, K. Miki, E. Ito, N. Sougawa, T. Kawamura, T. Daimon, T. Shimizu, T. Okano, K. Toda, Y. Sawa, Enhanced survival of transplanted human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes by the combination of cell sheets with the pedicled omental flap technique in a porcine heart, *Circulation*. 128 (2013) S87-94. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000366>.

[6] M. Ishida, S. Miyagawa, A. Saito, S. Fukushima, A. Harada, E. Ito, F. Ohashi, T. Watabe, J. Hatazawa, K. Matsuura, Y. Sawa, Transplantation of Human-induced Pluripotent Stem Cell-derived Cardiomyocytes Is Superior to Somatic Stem Cell Therapy for Restoring Cardiac Function and Oxygen Consumption in a Porcine Model of Myocardial Infarction, *Transplantation*. 103 (2019) 291–298. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000002384>.

[7] X. Yang, L. Pabon, C.E. Murry, Engineering adolescence: maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, *Circ. Res.* 114 (2014) 511–523. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.300558>.

[8] I. Karakikes, M. Ameen, V. Termglinchan, J.C. Wu, Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: insights into molecular, cellular, and functional phenotypes, *Circ. Res.* 117 (2015) 80–88. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.305365>.

[9] A.S. Dhamoon, J. Jalife, The inward rectifier current (IK1) controls cardiac excitability and is involved in arrhythmogenesis, *Heart Rhythm*. 2 (2005) 316–324. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2004.11.012>.

- [10] J. Ma, L. Guo, S.J. Fiene, B.D. Anson, J.A. Thomson, T.J. Kamp, K.L. Kolaja, B.J. Swanson, C.T. January, High purity human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: electrophysiological properties of action potentials and ionic currents, *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 301 (2011) H2006–H2017. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00694.2011>.
- [11] M.K.B. Jonsson, M.A. Vos, G.R. Mirams, G. Duker, P. Sartipy, T.P. de Boer, T.A.B. van Veen, Application of human stem cell-derived cardiomyocytes in safety pharmacology requires caution beyond hERG, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 52 (2012) 998–1008. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2012.02.002>.
- [12] Y.-K. Lee, K.-M. Ng, W.-H. Lai, Y.-C. Chan, Y.-M. Lau, Q. Lian, H.-F. Tse, C.-W. Siu, Calcium homeostasis in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, *Stem Cell Rev Rep.* 7 (2011) 976–986. <https://doi.org/10.1007/s12015-011-9273-3>.
- [13] H.S. Hwang, D.O. Kryshnal, T.K. Feaster, V. Sánchez-Freire, J. Zhang, T.J. Kamp, C.C. Hong, J.C. Wu, B.C. Knollmann, Comparable calcium handling of human iPSC-derived cardiomyocytes generated by multiple laboratories, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 85 (2015) 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.05.003>.
- [14] A. Fabiato, Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum, *Am. J. Physiol.* 245 (1983) C1-14. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1983.245.1.C1>.
- [15] S. Györke, S.C.W. Stevens, D. Terentyev, Cardiac calsequestrin: quest inside the SR, *J Physiol.* 587 (2009) 3091–3094. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.172049>.
- [16] I. Itzhaki, S. Rapoport, I. Huber, I. Mizrahi, L. Zwi-Dantsis, G. Arbel, J. Schiller, L. Gepstein, Calcium handling in human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes, *PLoS ONE.* 6 (2011) e18037. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018037>.
- [17] R. Vaidyanathan, Y.S. Markandeya, T.J. Kamp, J.C. Makielski, C.T. January, L.L. Eckhardt, IK1-enhanced human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: an improved cardiomyocyte model to investigate inherited arrhythmia syndromes, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 310 (2016) H1611-1621. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00481.2015>.
- [18] M. Li, Y. Kanda, T. Ashihara, T. Sasano, Y. Nakai, M. Kodama, E. Hayashi, Y. Sekino, T. Furukawa, J. Kurokawa, Overexpression of KCNJ2 in induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes for the assessment of QT-prolonging drugs, *J. Pharmacol. Sci.* 134 (2017) 75–85. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2017.05.004>.

- [19] J. Liu, D.K. Lieu, C.W. Siu, J.-D. Fu, H.-F. Tse, R.A. Li, Facilitated maturation of Ca²⁺ handling properties of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes by calsequestrin expression, *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 297 (2009) C152-159. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00060.2009>.
- [20] X. Lian, J. Zhang, S.M. Azarin, K. Zhu, L.B. Hazeltine, X. Bao, C. Hsiao, T.J. Kamp, S.P. Palecek, Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions, *Nat Protoc.* 8 (2013) 162–175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.150>.
- [21] M. Hoekstra, C.L. Mummery, A.A.M. Wilde, C.R. Bezzina, A.O. Verkerk, Induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes as models for cardiac arrhythmias, *Front Physiol.* 3 (2012) 346. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00346>.
- [22] S. Koumi, C.L. Backer, C.E. Arentzen, Characterization of Inwardly Rectifying K⁺ Channel in Human Cardiac Myocytes: Alterations in Channel Behavior in Myocytes Isolated From Patients With Idiopathic Dilated Cardiomyopathy, *Circulation.* 92 (1995) 164–174. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.92.2.164>.
- [23] Y. Qu, G. Page, N. Abi-Gerges, P.E. Miller, A. Ghetti, H.M. Vargas, Action Potential Recording and Pro-arrhythmia Risk Analysis in Human Ventricular Trabeculae, *Front. Physiol.* 8 (2018). <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.01109>.
- [24] J.M. Morgan, D. Cunningham, E. Rowland, Electrical restitution in the endocardium of the intact human right ventricle, *Br Heart J.* 67 (1992) 42–46. <https://doi.org/10.1136/hrt.67.1.42>.
- [25] Z. Jia, V. Valiunas, Z. Lu, H. Bien, H. Liu, H.-Z. Wang, B. Rosati, P.R. Brink, I.S. Cohen, E. Entcheva, Stimulating cardiac muscle by light: cardiac optogenetics by cell delivery, *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 4 (2011) 753–760. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.111.964247>.
- [26] P.B. Bennett, T.B. Begenisich, Catecholamines modulate the delayed rectifying potassium current (IK) in guinea pig ventricular myocytes, *Pflugers Arch.* 410 (1987) 217–219. <https://doi.org/10.1007/BF00581919>.
- [27] Y. Qu, H.M. Vargas, Proarrhythmia Risk Assessment in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Using the Maestro MEA Platform, *Toxicol. Sci.* 147 (2015) 286–295. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv128>.

- [28] J. Magyar, N. Iost, Á. Körtvély, T. Bányász, L. Virág, P. Szigligeti, A. Varró, M. Opincariu, J. Szécsi, J.G. Papp, P.P. Nánási, Effects of endothelin-1 on calcium and potassium currents in undiseased human ventricular myocytes, (n.d.) 6.
- [29] E.G. Lakatta, V.A. Maltsev, T.M. Vinogradova, A coupled SYSTEM of intracellular Ca²⁺ clocks and surface membrane voltage clocks controls the timekeeping mechanism of the heart's pacemaker, *Circ. Res.* 106 (2010) 659–673. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.206078>.
- [30] J.J. Kim, L. Yang, B. Lin, X. Zhu, B. Sun, A.D. Kaplan, G.C.L. Bett, R.L. Rasmusson, B. London, G. Salama, Mechanism of automaticity in cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 81 (2015) 81–93. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.01.013>.
- [31] M.L. Milstein, H. Musa, D.P. Balbuena, J.M.B. Anumonwo, D.S. Auerbach, P.B. Furspan, L. Hou, B. Hu, S.M. Schumacher, R. Vaidyanathan, J.R. Martens, J. Jalife, Dynamic reciprocity of sodium and potassium channel expression in a macromolecular complex controls cardiac excitability and arrhythmia, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109 (2012) E2134-2143. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109370109>.
- [32] A. Varghese, Reciprocal Modulation of IK₁-I_{Na} Extends Excitability in Cardiac Ventricular Cells, *Front Physiol.* 7 (2016) 542. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00542>.
- [33] M. Halbach, U. Egert, J. Hescheler, K. Banach, Estimation of action potential changes from field potential recordings in multicellular mouse cardiac myocyte cultures, *Cell. Physiol. Biochem.* 13 (2003) 271–284. <https://doi.org/10.1159/000074542>.
- [34] G. Gintant, P.T. Sager, N. Stockbridge, Evolution of strategies to improve preclinical cardiac safety testing, *Nat Rev Drug Discov.* 15 (2016) 457–471. <https://doi.org/10.1038/nrd.2015.34>.
- [35] A.J. D'Alonzo, J.L. Zhu, R.B. Darbenzio, Effects of Class III antiarrhythmic agents in an in vitro rabbit model of spontaneous torsades de pointe, *European Journal of Pharmacology.* 369 (1999) 57–64. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(99\)00057-6](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(99)00057-6).
- [36] K.R. Sipido, Calcium overload, spontaneous calcium release, and ventricular arrhythmias, *Heart Rhythm.* 3 (2006) 977–979. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2006.01.013>.

- [37] C. Zhang, D. He, J. Ma, W. Tang, T.D. Waite, Faradaic reactions in capacitive deionization (CDI) - problems and possibilities: A review, *Water Res.* 128 (2018) 314–330. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.10.024>.
- [38] M.S. Humayun, J.D. Weiland, G. Chader, E. Greenbaum, eds., *Artificial Sight: Basic Research, Biomedical Engineering, and Clinical Advances*, Springer-Verlag, New York, 2007. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-49331-2>.
- [39] Q. Li, R. (Ruby) Ni, H. Hong, K.Y. Goh, M. Rossi, V.G. Fast, L. Zhou, Electrophysiological Properties and Viability of Neonatal Rat Ventricular Myocyte Cultures with Inducible ChR2 Expression, *Scientific Reports.* 7 (2017) 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01723-2>.
- [40] M. Lemme, I. Braren, M. Prondzynski, B. Aksehirlioglu, B.M. Ulmer, M.L. Schulze, D. Ismaili, C. Meyer, A. Hansen, T. Christ, M.D. Lemoine, T. Eschenhagen, Chronic intermittent tachypacing by an optogenetic approach induces arrhythmia vulnerability in human engineered heart tissue, *Cardiovasc Res.* (n.d.). <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz245>.
- [41] M. Fujii, S. Ohya, H. Yamamura, Y. Imaizumi, Development of recombinant cell line co-expressing mutated Nav1.5, Kir2.1, and hERG for the safety assay of drug candidates, *J Biomol Screen.* 17 (2012) 773–784. <https://doi.org/10.1177/1087057112442102>.
- [42] J. Park, C.A. Werley, V. Venkatachalam, J.M. Kralj, S.D. Dib-Hajj, S.G. Waxman, A.E. Cohen, Screening fluorescent voltage indicators with spontaneously spiking HEK cells, *PLoS ONE.* 8 (2013) e85221. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085221>.
- [43] K. Ronaldson-Bouchard, S.P. Ma, K. Yeager, T. Chen, L. Song, D. Sirabella, K. Morikawa, D. Teles, M. Yazawa, G. Vunjak-Novakovic, Advanced maturation of human cardiac tissue grown from pluripotent stem cells, *Nature.* 556 (2018) 239–243. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0016-3>.

Figure 1. Inducible expression of KCNJ2 and CASQ2 in genetically engineered hiPSCs and hiPSC-CMs

(A) Live imaging and immunofluorescence of a KCNJ2-CASQ2 hiPSC clone before and after 48 hours of doxycycline treatment. KCNJ2-eGFP fluorescence (green) and immunostaining of CASQ2 (red). Nuclei are stained with HOECHST (blue). All cells showed expression of CASQ2 or KCNJ2-eGFP after adding doxycycline.

(B) A KCNJ2-CASQ2 hiPSC clone was analyzed for expression of stemness markers Oct3/4 and Sox2 by FACS analysis.

(C) Immunostaining of doxycycline-induced CASQ2 hiPSC-CMs.

(D) KCNJ2-eGFP fluorescence in doxycycline-induced KCNJ2 hiPSC-CMs. The fluorescence localizes at the plasma membrane.

Figure 2. Spontaneous beating rates reported by monitoring fluovolt oscillations (FDSS) and patch clamp studies of hiPSC-CMs.

(A) Comparison of the spontaneous beating rate. Doxycycline-induced KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs have a drastically reduced beating activity and doxycycline-induced KCNJ2 hiPSC-CMs are quiescent. Mann-Whitney test, **** P < 0.0001. N = 3 independent experiments. For WT: n = 22 vs. 21 monolayers; CASQ2: n = 31 vs. 20 monolayers; KCNJ2: n = 25 vs. 31 monolayers; KCNJ2-CASQ2: n = 22 vs. 19 monolayers, doxycycline-induced vs. non-induced, respectively.

(B) Resting membrane potentials are significantly more polarized in doxycycline-induced KCNJ2 hiPSC-CMs (n = 39 cells) and KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs (n = 18 cells) and close to the RMP of the adult cardiomyocytes *in vitro*, compared to the doxycycline treated WT (n = 48 cells) and CASQ2 hiPSC-CMs (n = 24 cells), Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison test, *** P < 0.001 comparison with WT clone; ### P < 0.001 comparison with CASQ2 clone.

(C) Hyperpolarization of the membrane potential after Ba²⁺ removal for doxycycline-induced KCNJ2 hiPSC-CMs (n = 39 cells) and KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs (n = 6 cells) whereas doxycycline treated WT-hiPSC-CMs membrane potential does not change (n = 48 cells), Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison test, *** P < 0.001 comparison with WT clone.

(D) Representative traces of whole cell currents elicited by a series of voltage steps (duration = 400 ms) at 0,5 Hz ranging from -120 mV to -40 mV or +30 mV (in 10 mV increments inset) recorded from WT, KCNJ2 and KCNJ2-CASQ2 expressing hiPSC-CMs.

(E) Current–voltage (I-V) relationship of the putative I_{K1} current is obtained by subtracting the currents recorded in the presence of 200μM mM BaCl₂ from the currents recorded in the absence of BaCl₂ in doxycycline-induced KCNJ2 hiPSC-CMs (n = 15 cells), KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs (n = 9 cells) and WT hiPSC-CMs (n = 12 cells).

All data are presented as mean ± SEM.

Figure 3. Doxycycline-induced KCNJ2 and KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs demonstrate shortened APDs and can follow high electrical pacing frequencies.

(A) Corrected action potential durations (APDc20, APDc50 and APDc80) of the doxycycline-induced KCNJ2 and KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs are reduced in comparison with the non-induced cells. The hiPSC-CMs are paced at 1 Hz via EFS. APDc = APD / Beating Period ^{1/3}. Mann-Whitney test; ** P < 0.01; *** P < 0.001; **** P < 0.0001. N = 3 independent experiments. For WT: n = 21 vs. 29 monolayers; CASQ2: n = 21 vs. 15 monolayers; KCNJ2: n = 24 vs. 28 monolayers; KCNJ2-CASQ2: n = 18 vs. 6 monolayers, doxycycline-induced vs. non-induced, respectively. All data are presented as mean ± SEM.

(B) Percentage of the hiPSC-CM layers that follow the electrical pacing at different frequencies. N = 3 independent experiments. For CASQ2: n = 31 vs. 21 monolayers; KCNJ2: n = 25 vs. 31 monolayers; KCNJ2-CASQ2: n = 22 vs. 21 monolayers, doxycycline-induced vs. non-induced, respectively. All data are presented as mean.

(C) Action potential durations of the doxycycline-induced KCNJ2 and KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs shorten as electrical pacing frequencies increase. Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison test. * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001. N = 3 independent experiments. For CASQ2: n = 31 vs. 21 monolayers; KCNJ2: n = 25 vs. 31 monolayers; KCNJ2-CASQ2: n = 22 vs. 21 monolayers, doxycycline-induced vs. non-induced, respectively. All data are presented as mean ± SEM.

Figure 4. Ca²⁺ handling properties of CASQ2 and KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs

(A) Typical Ca²⁺ transients (Cal-520 fluorescence) and response to 5 mM caffeine injection (arrow) in non-induced control (left) and doxycycline-induced (right) KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs.

(B) Quantification of the increase of caffeine-induced Ca²⁺ peak transients amplitude in the CASQ2 and KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs; The fold changes are calculated according to the formula: maximum value of the first Ca²⁺ peak / baseline. Mann-Whitney test * P < 0.5; ** P < 0.01. For CASQ2: N = 3 independent experiments, n = 11 vs. 9 monolayers; KCNJ2-CASQ2: N = 4 independent experiments, n = 13 vs. 13 monolayers, doxycycline-induced vs. non-induced, respectively.

(C) Quantification of the thapsigargin-induced decrease of Ca²⁺ transients amplitude in the CASQ2 and KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs. The fold changes are calculated according to the formula: amplitude after dispensing / amplitude before dispensing. Mann-Whitney test * P < 0.5; *** P < 0.001. CASQ2: N = 3 independent experiments, n = 10 vs. 7 monolayers; KCNJ2-CASQ2: N = 4 independent experiments, n = 9 vs. 14 monolayers, doxycycline-induced vs. non-induced, respectively.

All data are presented as mean ± SEM.

Figure 5. Functional analysis of genetically engineered hiPSC-CMs stimulated by optical pacing in MEA system.

(A) GFP fluorescence of the HEK-293T cell line expressing Chr2-2A-GFP.

(B) Pacing is dependent on functional gap junctions between hiPSC-CMs and HEK-ChR2 cells. Addition of Carbenoxolone (CBX) inhibits the coupling effect of gap junctions established between the two cell types in co-culture. Top: the doxycycline non-induced hiPSC-CMs beat spontaneously in presence of CBX. Middle: in absence of CBX, the cell layers follow the 1 Hz optical pacing. Down: in presence of CBX, the cell layers do not follow the stimulation.

(C) Spike amplitude and (D) spike slope ratio of CASQ2, KCNJ2 and KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs optogenetically paced at 1.5 Hz. The ratios are calculated for each cell line according to the formula: spike metric for doxycycline-induced hiPSC-CMs / spike metric for non-induced hiPSC-CMs. Mann-Whitney test * $P < 0.5$. For CASQ2: $N = 4$ independent experiments, $n = 13$ vs. 13 monolayers; KCNJ2: $N = 3$ independent experiments, $n = 7$ vs. 7 monolayers; KCNJ2-CASQ2: $N = 4$ independent experiments, $n = 12$ vs. 12 monolayers, doxycycline-induced vs. non-induced, respectively.

(E) Corrected Field Potential Duration (FPDc) of hiPSC-CMs optogenetically paced at 1.5 Hz, $FPDc = FPD / \text{Beating Period}^{1/3}$. Mann-Whitney test * $P < 0.5$; *** $P < 0.001$. For CASQ2: $N = 4$ independent experiments, $n = 13$ vs. 12 monolayers; KCNJ2: $N = 2$ independent experiments, $n = 6$ vs. 14 monolayers; KCNJ2-CASQ2: $N = 4$ independent experiments, $n = 14$ vs. 11 monolayers, doxycycline-induced vs. non-induced, respectively.

All data are presented as mean \pm SEM.

Figure 6. Effect of isoproterenol on the genetically engineered hiPSC-CMs.

(A) Effects of isoproterenol on the beating rate of the indicated doxycycline-induced and non-induced hiPSC-CMs co-cultured with HEK-ChR2 cells. For CASQ2: $N = 6$ independent experiments, $n = 14$ vs. 14 monolayers; KCNJ2: $N = 6$ independent experiments, $n = 10$ vs. 14 monolayers; KCNJ2-CASQ2: $N = 6$ independent experiments, $n = 13$ vs. 12 monolayers, doxycycline-induced vs. non-induced, respectively.

(B) Effects of isoproterenol on the FPDc of the indicated doxycycline-induced and non-induced hiPSC-CMs co-cultured with HEK-ChR2 cells. For CASQ2: $N = 6$ independent experiments, $n = 14$ vs. 14 monolayers; KCNJ2: $N = 6$ independent experiments, $n = 10$ vs. 14 monolayers; KCNJ2-CASQ2: $N = 6$ independent experiments, $n = 13$ vs. 12 monolayers, doxycycline-induced vs. non-induced, respectively.

(C) Comparison of the beating rate ratios of the indicated doxycycline-induced and non-induced hiPSC-CMs co-cultured with HEK-ChR2 cells after 0.2 μ M isoproterenol dispensing. Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison test, *** $P < 0.001$. For KCNJ2: $N = 4$ independent experiments, $n = 8$ vs. 9 monolayers; KCNJ2-CASQ2: $N = 5$ independent experiments, $n = 11$ vs. 11 monolayers, doxycycline-induced vs. non-induced, respectively.

(D) Comparison of the beating rate ratios of doxycycline-induced and non-induced KCNJ2-CASQ2 hiPSC-CMs after application of 0.3 μ M isoproterenol. Mann-Whitney test * $P < 0.5$; For KCNJ2-CASQ2: $N = 4$ independent experiments; $n = 13$ vs. 13 monolayers, doxycycline-induced vs. non-induced, respectively.

All data are presented as mean \pm SEM.

Figure 7. Pharmacological properties of the genetically engineered hiPSC-CMs.

(A and B) Effect of lidocaine on the beating rate and the quiescence of doxycycline induced and non-induced hiPSC-CMs co-cultured with HEK-ChR2 cells. For CASQ2, KCNJ2 and KCNJ2-CASQ2: $N = 4$ independent experiments, $n = 8$ vs. 8 monolayers, doxycycline-induced vs. non-induced, respectively.

(C) Effect of verapamil on the beating activity of in the indicated doxycycline-induced and non-induced hiPSC-CMs co-cultured with HEK-ChR2 cells. For CASQ2, KCNJ2 and KCNJ2-CASQ2: $N = 3$ independent experiments, $n = 8$ vs. 8 monolayers, doxycycline-induced vs. non-induced, respectively.

(D) Concentration-dependent effect of E-4031 on the FPDc of doxycycline-induced and non-induced hiPSC-CMs co-cultured with HEK-ChR2 cells. For CASQ2: $N = 3$ independent experiments, $n = 12$ vs. 12 monolayers; KCNJ2-CASQ2: $N = 3$ independent experiments, $n = 12$ vs. 11 monolayers, doxycycline-induced vs. non-induced, respectively.

(E) Effect of 1 μ M E-4031 on arrhythmias observed in the indicated doxycycline-induced and non-induced hiPSC-CMs co-cultured with HEK-ChR2 cells. For CASQ2: $N = 3$ independent experiments, $n = 14$ vs. 14 monolayers; KCNJ2-CASQ2: $N = 3$ independent experiments, $n = 12$ vs. 11 monolayers, doxycycline-induced vs. non-induced, respectively.

All data are presented as mean \pm SEM.

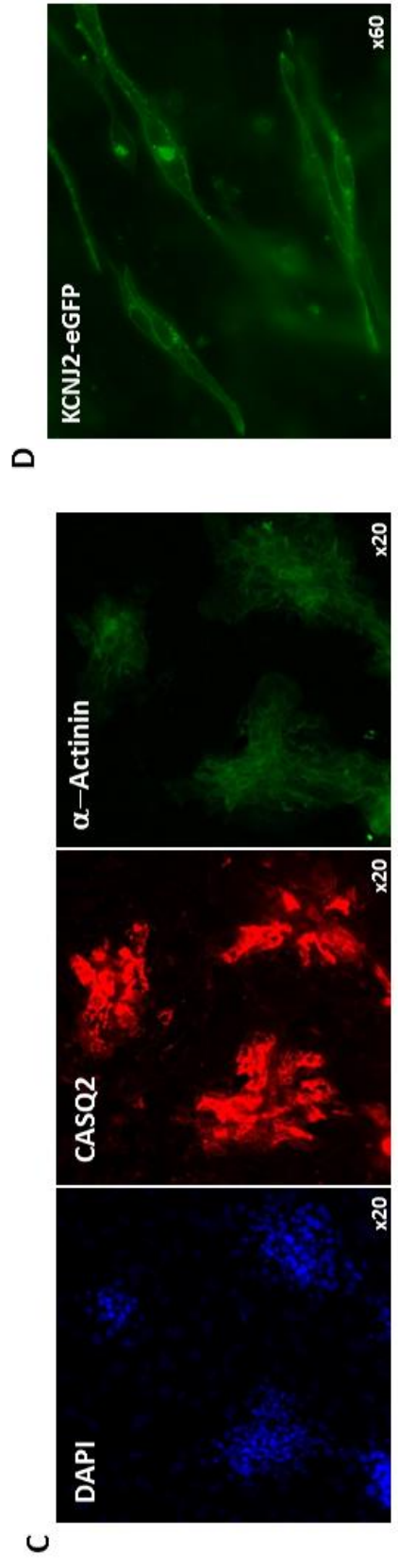
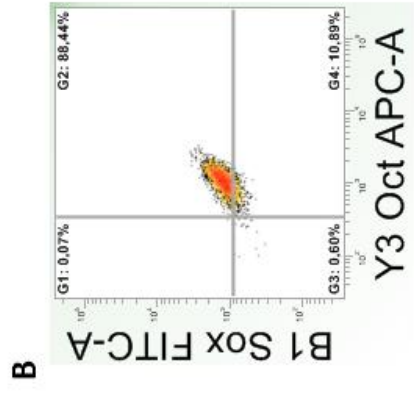
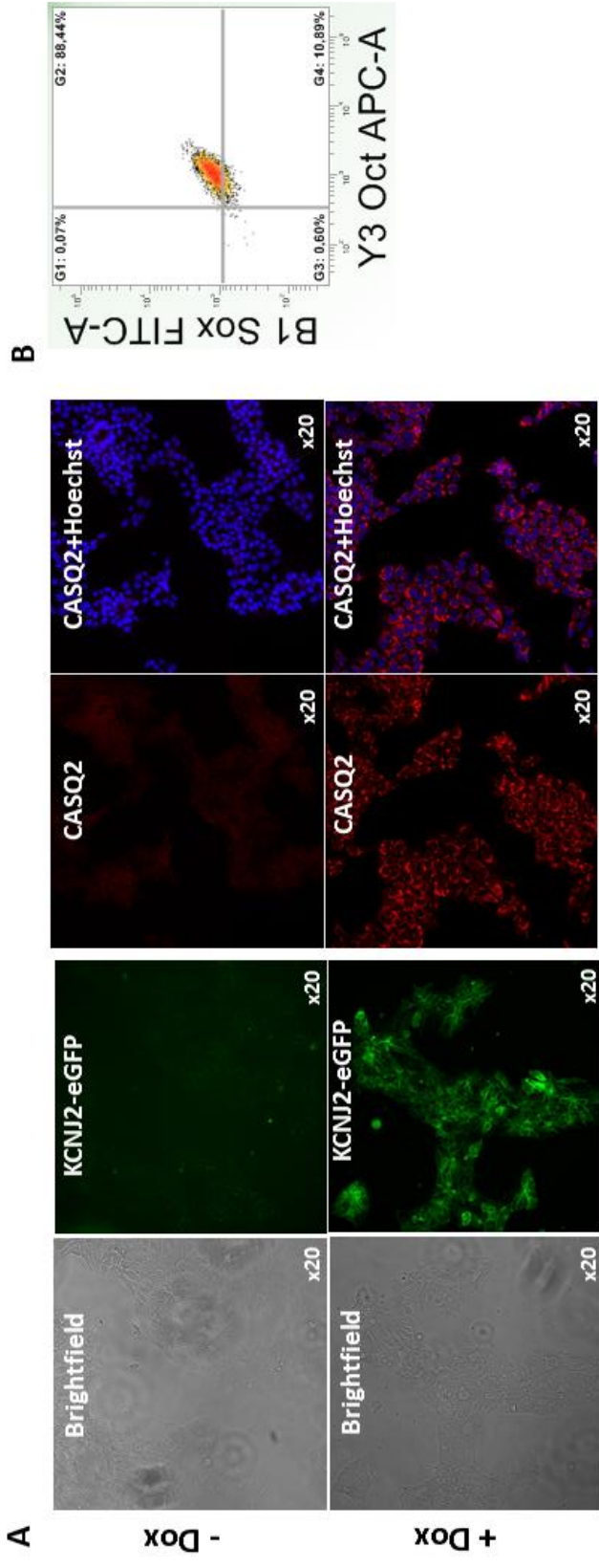


Figure 1

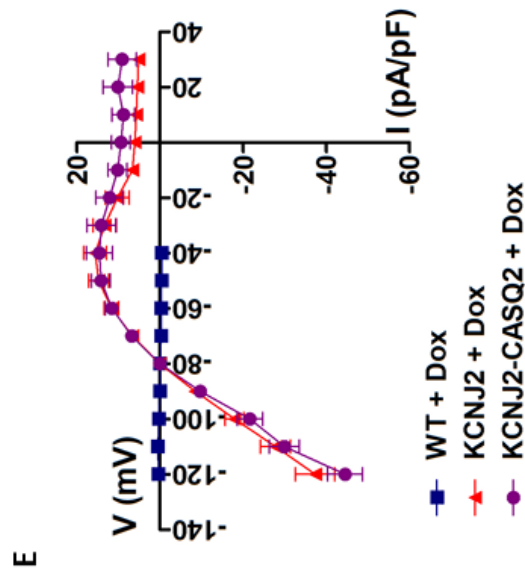
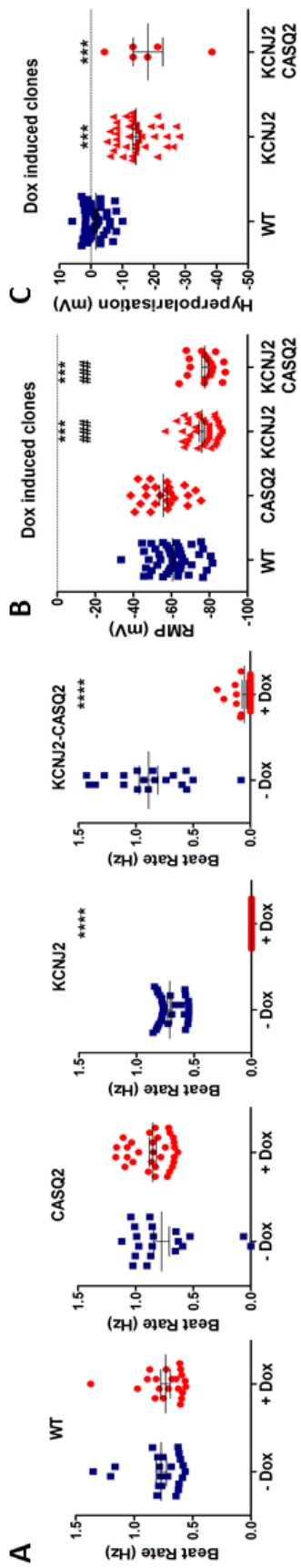


Figure 2

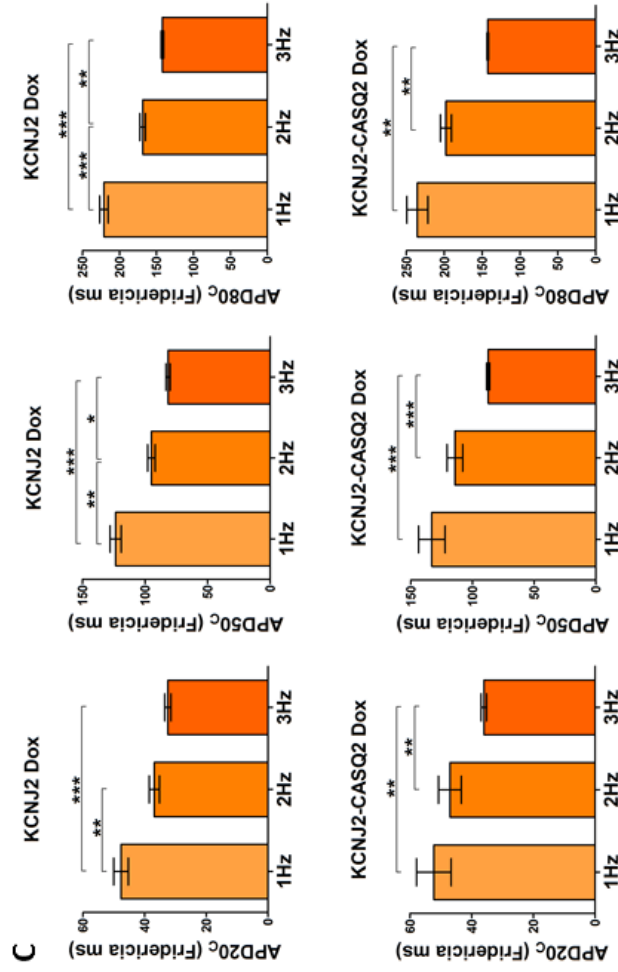
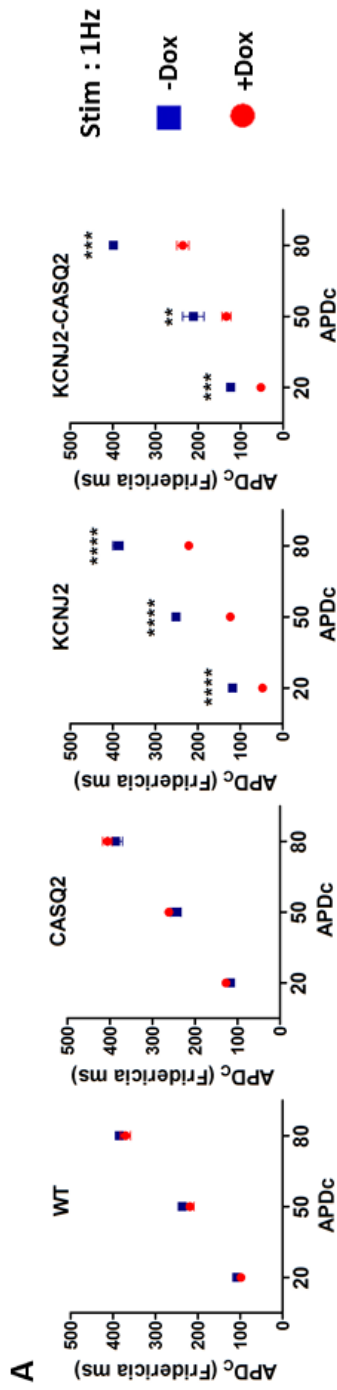


Figure 3

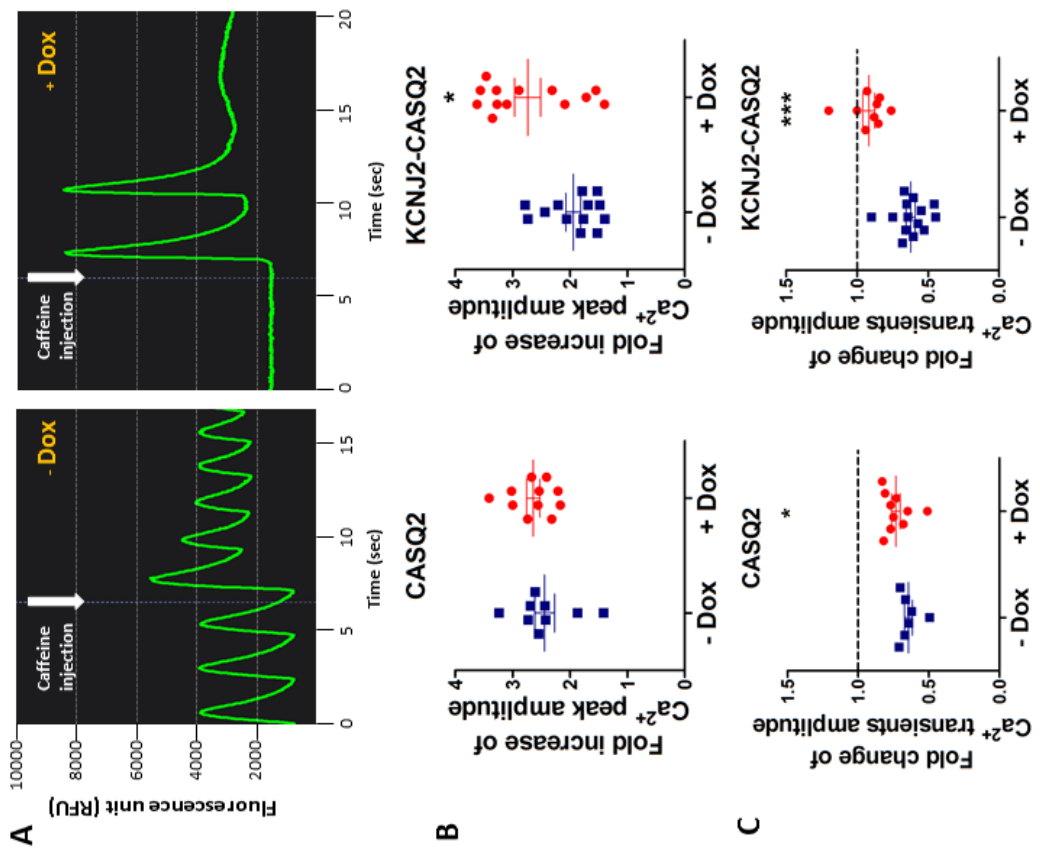


Figure 4

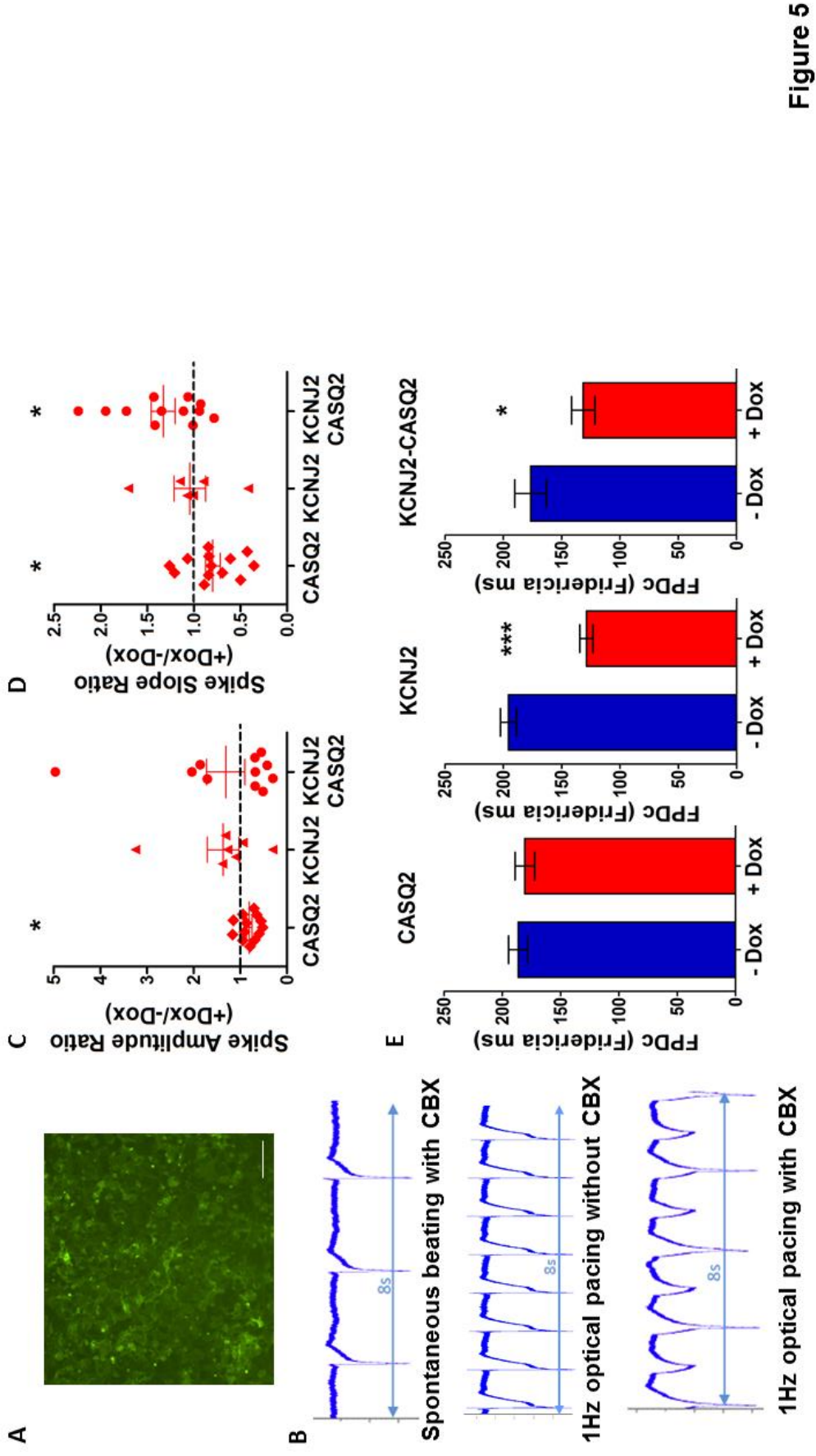


Figure 5

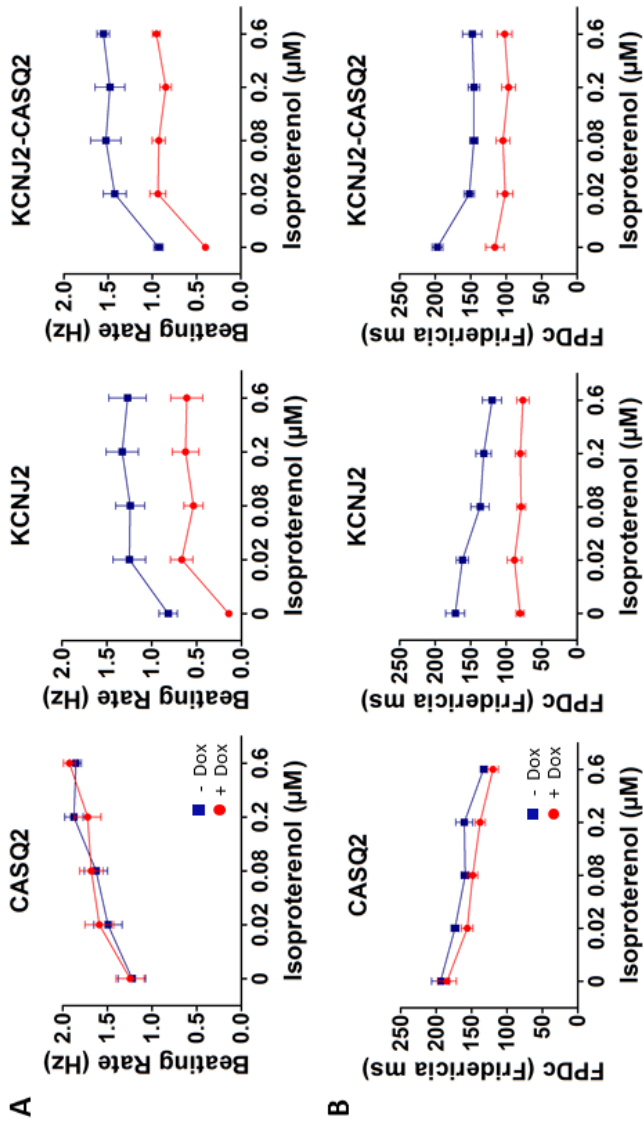


Figure 6

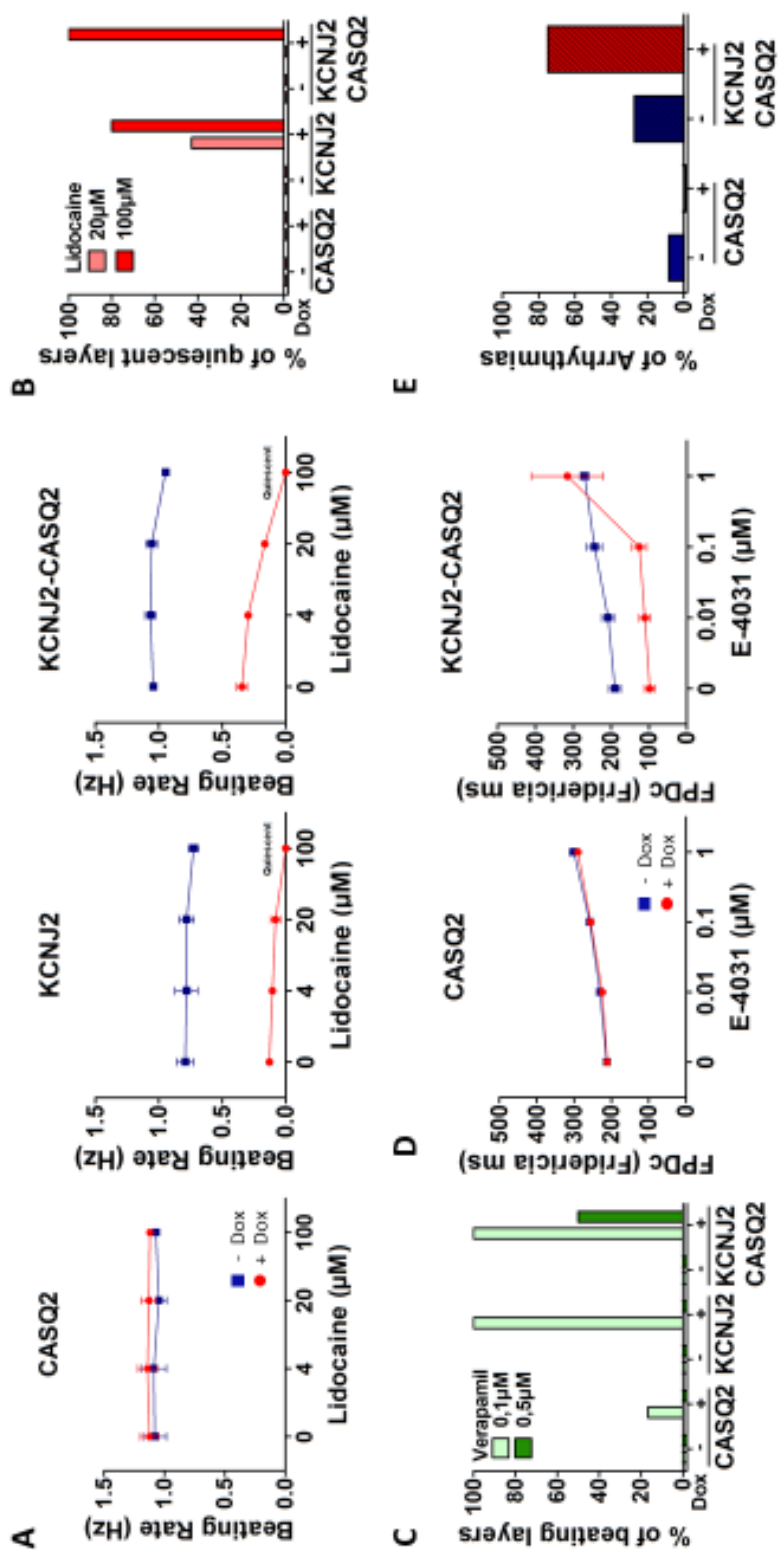


Figure 7

II. Amélioration de l'édition du génome par la fusion Cas9-CtIP : évaluation dans les hiPSCs

Stratégies pour améliorer l'efficacité d'édition du génome par la voie HDR :

L'édition du génome des hiPSC-CMs en utilisant le système CRISPR/Cas9 offre de nombreuses potentialités pour la recherche biomédicale que ce soit pour la modélisation de maladies ou bien pour la thérapie cellulaire. Afin de pouvoir exploiter entièrement les potentialités de ces deux biotechnologies, des améliorations sont notamment nécessaires afin d'augmenter l'efficacité de la modification précise de gènes par la voie HDR. En effet, l'édition du génome est particulièrement difficile dans de nombreux systèmes biologiques, dont les hPSCs, étant donné que la voie de réparation par HDR impliquée y est très peu efficace (Zwaka and Thomson, 2009). De ce fait, différentes stratégies ont été utilisées afin d'augmenter l'édition ciblée de l'ADN avec le système CRISPR/Cas9 par la voie HDR.

Une des approches pour atteindre cet objectif repose sur l'inhibition de la voie de réparation cNHEJ. Des études ont décrit que l'inhibition des acteurs de la voie cNHEJ tels que la DNA ligase IV (Chu et al., 2015; Maruyama et al., 2015) ou les DNA PKcs (Robert et al., 2015) conduisait à l'augmentation significative de la voie HDR à la suite d'une cassure double brin induite par le système CRISPR/Cas9. De même, l'inhibition de la voie cNHEJ est possible en ciblant la protéine 53BP1. En effet, cette protéine a pour rôle d'empêcher le recrutement de BRCA1 au niveau des cassures double-brin afin d'inhiber la résection de l'ADN. Canny et ses collègues ont montré que l'inhibition de la protéine 53BP1 contrecarrait son recrutement au niveau des cassures double-brin et augmentait l'insertion d'ADN exogène par la voie HDR stimulée par le système CRISPR/Cas9 (Canny et al., 2018). Plus récemment, un inhibiteur de DNA-PKcs permettant d'augmenter de manière très importante l'efficacité d'introduction de mutations ponctuelles dans les hiPSCs a été décrit et semble très prometteur (Riesenberg et al., 2019).

Parallèlement, l'utilisation d'ADN donneur de nature différente tels que les oligonucléotides simple brin représentent une alternative intéressante pour augmenter l'efficacité de l'édition précise du génome par HDR. Dans une étude menée par notre laboratoire, l'utilisation d'oligonucléotides simple brin, modifiés aux extrémités par des liaisons phosphorothioates, a permis d'insérer des séquences pouvant atteindre 100 nucléotides de manière efficace et précise, ces oligonucléotides simple brin n'incluant que

des séquences courtes d'homologie (~ 35 nucléotides) pour exercer leur activité. L'intégration de ce type de donneur simple brin court dépend d'un système de réparation proche du *Single Strand Annealing* (Renaud et al., 2016). Par ailleurs, une étude a montré que les oligonucléotides simple brin étaient moins susceptibles de s'intégrer de manière aléatoire que les ADN donneurs double brin (Paix et al., 2017).

Une autre approche décrite pour augmenter la réparation des cassures double brin par la voie HDR consiste à synchroniser les cellules dans les phases préférentielles de la voie HDR. Effectivement, Zhang et ses collègues ont utilisé la cycline CCND1, impliquée dans la transition G1/S, combinée au nocodazole, une molécule qui bloque les cellules dans les phases G2/M, pour coordonner les cellules vers les phases S/G2/M. Grâce à cette stratégie, ils ont observé une augmentation significative de l'insertion précise d'ADN exogène, stimulée par le système CRISPR/Cas9, dans les loci *CTNNB1* et *PRDM14* des iPSCs (Zhang et al., 2017). Une stratégie alternative a consisté à fusionner le degron de la GEMININ à la Cas9 afin d'induire la dégradation de ce complexe en phase G1 lorsque la voie cNHEJ prédomine. Ceci a permis de restreindre la coupure de l'ADN lors des phases S et G2, fenêtre d'action durant laquelle la voie HDR est majoritaire. Cette approche a conduit à l'augmentation de 87% de l'intégration de transgène par la voie HDR (Howden et al., 2016).

Enfin, le fait de fusionner la Cas9 avec des protéines impliquées dans la voie HDR constitue une stratégie de choix pour stimuler la réparation fidèle de l'ADN. Cette approche permet notamment de positionner la protéine effectrice directement au niveau de la cassure double brin et cela permet d'éviter des effets plus globaux sur la réparation cellulaire de l'ADN qui pourraient être induits lors de l'inhibition pharmacologique des autres voies de réparation. Par exemple, Shao et ses collaborateurs ont décrit que le fait de fusionner la protéine RAD52 à la Cas9 augmentait de manière significative la réparation des cassures double-brin par la voie HDR (Shao et al., 2017).

Notre étude :

Dans notre étude, nous avons développé ce type d'approche locale pour augmenter l'efficacité de l'édition du génome par la voie HDR, sans avoir recours à l'utilisation d'inhibiteurs des voies de réparation de l'ADN et sans perturber le cycle cellulaire. En effet, nous avons fusionné la protéine CtIP, qui est une protéine impliquée dans la résection de

l'ADN après une cassure double brin, à la Cas9. Cette approche a permis de contraindre le positionnement de CtIP au niveau de la coupure et d'augmenter l'intégration de transgène par la voie HDR. Nous avons identifié le fragment N-terminal de la protéine CtIP, appelé HE pour *HDR enhancer*, qui est nécessaire et suffisant pour la stimulation de la voie HDR. Ainsi, la stimulation de la voie réparation HDR avec la Cas9-HE a permis d'augmenter d'un facteur 2 la fréquence d'intégration précise des transgènes à différents loci et dans plusieurs modèles expérimentaux dont des lignées cellulaires humaines immortalisées, des hiPSCs et des zygotes de rat. Nous avons observé que l'usage de la protéine fusion Cas9-HE pour l'édition précise du génome n'affectait ni les propriétés de pluripotence et de différenciation des hiPSC, ni le développement embryonnaire des rats. De plus, notre étude montre que l'efficacité de la stimulation de la voie HDR par la Cas9-HE dépend du choix du guide utilisé et que cette limite peut être surmontée en testant plusieurs guides. Enfin, en l'absence d'ADN donneur pour la réparation, la Cas9-HE induit des profils de mutations *indels* différents de la Cas9, avec notamment des délétions entre des petites séquences d'homologies qui sont favorisées, suggérant que la voie MMEJ est privilégiée au détriment de la voie cNHEJ, ceci étant compatible avec le rôle de CtIP dans la résection des extrémités après cassure, une étape précoce de la voie HDR et commune avec la voie MMEJ.

Article 2

ARTICLE

DOI: 10.1038/s41467-018-03475-7

OPEN

CtIP fusion to Cas9 enhances transgene integration by homology-dependent repair

M. Charpentier¹, A.H.Y. Khedher^{1,2}, S. Menoret³, A. Brion¹, K. Lamribet¹, E. Dardillac⁴, C. Boix¹, L. Perrouault¹, L. Tesson³, S. Geny¹, A. De Cian¹, J.M. Itier², I. Anegon³, B. Lopez⁴, C. Giovannangeli¹ & J.P. Concordet¹

In genome editing with CRISPR-Cas9, transgene integration often remains challenging. Here, we present an approach for increasing the efficiency of transgene integration by homology-dependent repair (HDR). CtIP, a key protein in early steps of homologous recombination, is fused to Cas9 and stimulates transgene integration by HDR at the human *AAVS1* safe harbor locus. A minimal N-terminal fragment of CtIP, designated HE for HDR enhancer, is sufficient to stimulate HDR and this depends on CDK phosphorylation sites and the multimerization domain essential for CtIP activity in homologous recombination. HDR stimulation by Cas9-HE, however, depends on the guide RNA used, a limitation that may be overcome by testing multiple guides to the locus of interest. The Cas9-HE fusion is simple to use and allows obtaining twofold or more efficient transgene integration than that with Cas9 in several experimental systems, including human cell lines, iPS cells, and rat zygotes.

¹Museum National d'Histoire Naturelle, INSERM U1154, CNRS UMR 7196, Sorbonne Universités, 43 rue Cuvier, Paris F-75231, France. ²Translational Sciences, Sanofi, 13 Quai Jules Guesde, F-94400 Vitry-sur-Seine, France. ³Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie UMR1064, INSERM, Université de Nantes, CHU de Nantes, 30 Avenue Jean Monnet, F-44093 Nantes, France. ⁴Equipe Labellisée Ligue Contre le Cancer, Institut de Cancérologie Gustave-Roussy, Université Paris-Saclay, CNRS UMR 8200, 114 rue Edouard Vaillant, Villejuif F-94805, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.P.C. (email: jean-paul.concordet@mnhn.fr)

The CRISPR–Cas9 system has hugely facilitated genome editing. In pioneer studies with mammalian cells, the introduction of a DNA double-strand break (DSB) at a unique position in the genome, using the homing endonuclease I-SceI, allowed to stimulate gene targeting by homologous recombination^{1,2}. Subsequently, different artificial sequence-specific nucleases, such as zinc finger and TALE nucleases, and more recently CRISPR–Cas9 nucleases have been used to target predetermined genomic sites^{3–7}. With CRISPR–Cas9, a guide RNA with a spacer sequence complementary to the target DNA directs DNA cleavage by the Cas9 endonuclease⁸. Modification of the genome sequence takes place during DSB repair, and the molecular pathways that come into play determine the type of sequence change. Canonical nonhomologous end joining (cNHEJ) and alternative end-joining pathways such as microhomology-mediated end joining (MMEJ) proceed by ligation of DNA ends after they have been processed and result in targeted but imprecise indels (generally small insertions or deletions). Microhomologies of two or more nucleotides may be exposed after DNA cleavage through resection and may be used during repair by MMEJ. In contrast to end-joining pathways, homology-dependent repair (HDR) using an exogenous DNA repair template supports precise genome editing. Typically, a transgene with homology arms to sequences flanking the DSB can be used and the transgene will thus be precisely integrated. In order to enhance genome editing by HDR, different strategies have been developed so far. For example, when cells are synchronized in S/G2 phases, the cell-cycle phases to which DNA repair by homologous recombination are restricted, and HDR can be increased up to fivefold⁹. NHEJ inhibition, for instance, following Ligase 4 inactivation, can also increase HDR¹⁰. Another approach has been to fuse the Geminin degron to Cas9 in order to induce its degradation in G1 and restrict target DNA cleavage to S/G2 phases^{11,12}.

Here, we report a simple approach to increase HDR using Cas9 nuclease fused to an N-terminal domain of CtIP, a key protein in early steps of homologous recombination. This approach forces CtIP to the cleavage site and increases transgene integration by HDR. An N-terminal fragment of CtIP, called HE for HDR enhancer, is sufficient for HDR stimulation and requires the CtIP multimerization domain and CDK phosphorylation sites to be active. HDR stimulation with Cas9–HE resulted in an increase of twofold or more in the frequency of targeted transgene integration at independent loci tested in multiple systems, including human cell lines, human iPS cells, and rat zygotes. HDR stimulation by the Cas9–HE fusion depends on the guide RNA used, and this limitation may be overcome by testing multiple guide RNAs. In the absence of donor DNA, Cas9–HE induced a pattern of indels different from Cas9, and deletions between short stretches of homologous sequences were favored, suggesting that cNHEJ was partially inhibited and MMEJ was enhanced, likely due to the stimulation of DNA resection by the HE domain. Using Cas9–HE is straightforward, does not require using genetically modified cells or pharmacological reagents, and our results suggest that DNA repair pathways can be biased locally, at the site of DNA cleavage, to favor HDR and precise genome editing.

Results

Forcing CtIP to the DNA break site stimulates HDR. CtIP is a key protein in the initial step of homologous recombination that acts as a cofactor for MRE11 endonuclease in triggering DNA end resection^{13–16}. In order to favor transgene integration by HDR, we sought to force CtIP recruitment to the DNA cleavage site by two different approaches based on fusion of CtIP to catalytically inactive Cas9 (dCas9) or to Cas9.

We first targeted DNA cleavage at the *AAVSI* locus with TALENs and coexpressed dCas9–CtIP with guide RNAs specific to sequences next to the TALEN cleavage site (Fig. 1a) in RG37DR cells, human fibroblasts transformed by SV40¹⁷. *AAVSI* is a well-established model locus for genome-editing experiments in human cells and is generally considered to be a safe harbor locus for transgene integration¹⁸. This approach stimulated the integration of a GFP transgene with 800-bp homology arms by twofold with guide RNA D1, one of the guide RNAs lying closest to the TALEN cleavage site (Fig. 1b). Other guide RNAs did not efficiently stimulate the integration. This finding indicated that the expression of dCas9–CtIP is not sufficient, by itself, to stimulate integration and suggested that the position of dCas9–CtIP binding relative to the cleavage site is critical. The frequency of indels induced by *AAVSI* TALENs, measured by the T7 endonuclease I (T7EI) assay, was not significantly modified by co-expression of dCas9–CtIP (Fig. 1b).

We next tried to force CtIP to the DSB by direct fusion of CtIP to Cas9 nuclease. T2 guide RNA was used to induce cleavage next to the *AAVSI* TALEN cleavage site. The Cas9–CtIP fusion allowed to stimulate GFP cDNA integration by twofold compared to Cas9 (Fig. 1c). In contrast, the frequency of indels was not significantly modified when using Cas9–CtIP compared to Cas9 (Fig. 1c).

Altogether, these results show that forcing CtIP recruitment to the nuclease cleavage site, through fusion to either dCas9 or Cas9, can significantly stimulate targeted integration of a transgene.

Identification of minimal HDR enhancer fragment of CtIP. In order to identify a minimal CtIP domain that can be used to stimulate homology-dependent insertion of a transgene, we tested the activity of two series of CtIP deletions, progressively removing fragments of ~200 amino acids (aa) starting from N- or C-terminal ends (Fig. 2a). Truncated CtIP proteins were fused to Cas9 nuclease and tested in RG37DR cells for GFP transgene integration at the *AAVSI* locus using T2 guide RNA. When C-terminal deletions were tested, we observed that deleting from aa 296 to the C-terminal end of CtIP did not affect HDR stimulation, and that the fragment from aa 1 to 296 was sufficient to stimulate HDR as efficiently as full-length CtIP (Fig. 2b). Conversely, when testing N-terminal deletions, we observed that deleting the fragment from aa 1 to 416 eliminated the HDR stimulation effect. The two N-terminal deletions tested were unable to stimulate HDR, although inducing roughly similar levels of imprecise mutations as measured by the T7EI assay (Fig. 2b). We conclude that the N-terminal fragment of CtIP from aa 1 to 296 is sufficient for HDR stimulation. The N-terminal fragment from aa 1 to 296 was coined as HE for HDR-Enhancer domain, and the corresponding Cas9 fusion was designated as Cas9–HE.

Phosphorylation and multimerization domain essential to HE.

Next, to examine how the small HE domain of CtIP stimulates transgene integration by HDR, we tested different Cas9–HE mutants in HEK293 cells. The HE domain includes several sequences recently reported to be essential for CtIP activity: the CtIP dimerization and tetramerization domains¹⁹, and three out of six CDK phosphorylation sites necessary for CtIP activity in HR²⁰ (shown in Fig. 2a). First, we tried to dissect HE into smaller fragments, HE[1–170] that includes CtIP dimerization and tetramerization domains but lacks the three CDK phosphorylation sites, HE[46–296] lacking the first 45 aa of CtIP needed for interaction with the Mre11–Rad50–Nbs1 (MRN) complex²⁰, and tetramerization¹⁹ and HE [166–296] containing the three CDK phosphorylation sites (shown in Fig. 2a). None of the HE

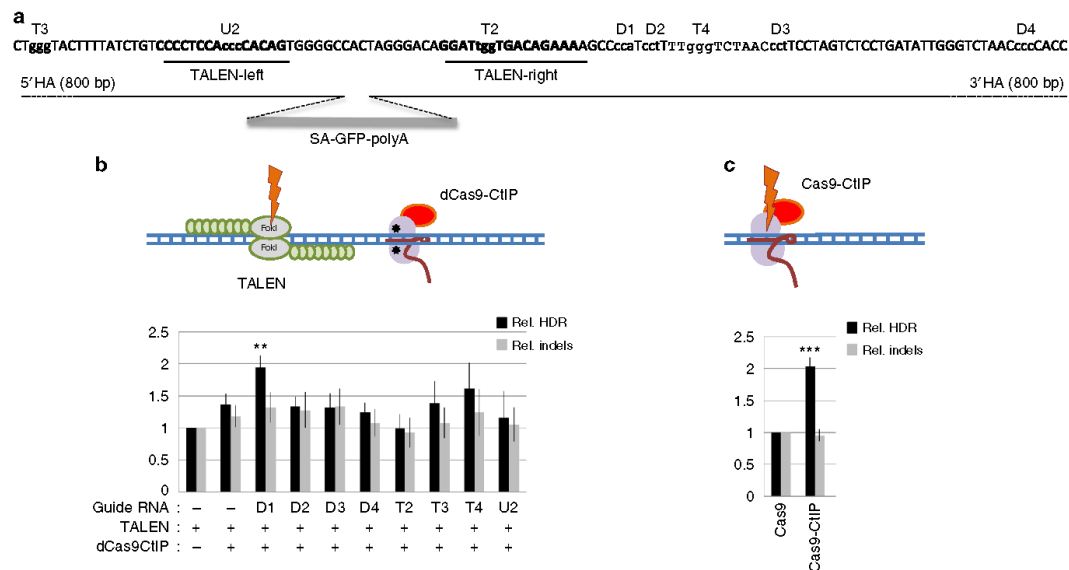


Fig. 1 Forcing CtIP recruitment to the DNA cleavage site stimulates targeted transgene integration. **a** Distribution of TALEN and guide RNAs at AAVS1 safe harbor locus. gRNAs are indicated on top of their corresponding PAM motif, which is shown as lowercase in the sequence. The donor DNA used had 5' and 3' homology arms as indicated. **b** Relative HDR and indel frequencies induced by TALEN and dCas9-CtIP recruitment near the cleavage site using different guide RNAs. Human RG37 fibroblasts were transfected with the indicated plasmids and GFP transgene donor with homology arms to the targeted AAVS1 locus. HDR-mediated transgene integration was measured by FACS analysis of GFP-positive cells resulting from targeted GFP transgene integration. Indels at the cleavage site were measured by the T7E1 assay. The results are expressed as the mean of relative HDR or indel frequencies calculated by normalizing HDR or indel frequencies by that induced by TALEN transfection alone. Asterisks indicate the difference that is statistically significant when comparing cotransfection of dCas9-CtIP, guide RNA, and TALEN to TALEN-alone transfection in t-test ($*P < 0.05$). Data are from three independent experiments. Error bars indicate standard deviation. **c** Relative HDR and indel frequencies induced by Cas9 and Cas9-CtIP at the cleavage site directed by T2 guide RNA. The results are expressed as the mean of relative HDR or indel frequencies calculated by normalizing HDR or indel frequencies by that induced by Cas9. Asterisks indicate that the difference is statistically significant when comparing Cas9-CtIP to Cas9 in t-test ($**P < 0.005$). Data are from three independent experiments. Error bars indicate standard deviation. Guide RNA T2 was used because in contrast to other guides, it did not cleave the donor DNA available

fragments tested stimulated the integration of the GFP transgene, suggesting that all the different functional domains previously reported to be essential for CtIP activity are important for the full HE effect (Fig. 2c). Next, the three CDK sites were mutated either to alanine (Cas9-HE(3A)), to block phosphorylation, or to glutamic acid (Cas9-HE(3E)), to mimic phosphorylation by CDKs (Supplementary Fig. 2A). In HEK293 cells, the Cas9-HE(3E) mutant led to GFP transgene integration levels comparable to those achieved with Cas9-HE (Supplementary Fig. 2B). In contrast, when using the Cas9-HE(3A) mutant, which cannot be phosphorylated by CDKs, the levels of GFP transgene integration were similar to those achieved with Cas9, showing that the three CDK phosphorylation sites are essential for stimulating HDR with the HE domain. Finally, we wanted to test if the activity of the CtIP tetramerization domain is necessary. For that purpose, we used a L27E mutation shown to abrogate CtIP tetramerization while preserving dimerization¹⁹. We found that in HEK293 cells, it did not affect transgene integration compared to Cas9-HE (Supplementary Fig. 2C). The mutants were tested in a second cell line, HCT116 cells, and transgene integration was no longer stimulated with Cas9-HE(3A) nor with Cas9-HE(L27E), even though all proteins were expressed at similar levels as detected by western blot, pointing to a more important role of the tetramerization site in HCT116 cells (Supplementary Fig. 2D). The different impact of the L27E mutation in HEK293 and HCT116 cells suggests that the importance of CtIP tetramerization activity may vary depending on cell lines, perhaps due to the differences

in the abundance of transfected proteins or endogenous CtIP. In any case, it therefore appears that the interplay of several functional features of CtIP, including known CDK phosphorylation sites and CtIP multimerization domain [1–170], is essential for the activity of the HE domain and that the HE domain as defined here is the smallest possible fragment that can be used to stimulate transgene integration.

Cas9-HE induces a different pattern of indels than Cas9. Recent studies have indicated that the pattern of indels induced by Cas9 is not random and is determined by the spacer sequence rather than genomic context²¹. In addition, the mutation pattern could be modified by the DNA-PK inhibitor NU7441, which inhibits end-joining by cNHEJ, suggesting that the mutation pattern is dependent on the DNA repair pathways that have been involved. We were therefore interested in examining whether Cas9-HE induces a different pattern of indels than that of Cas9. Two guide RNAs, Spacer 54 and Spacer 93 targeting JAK and PCSK genes, respectively, which were previously characterized by van Overbeek et al.²¹ and the T2 guide RNA targeting the AAVS1 locus were tested in HEK293 cells and the mutation pattern determined by deep sequencing of PCR products of the target loci. The proportion of mutant reads obtained with Cas9-HE and Cas9 was similar for Spacer 54 and Spacer 93, while for guide T2, Cas9-HE gave ~50% fewer mutant reads than Cas9. We examined in detail indels representing more than 2% of mutant reads

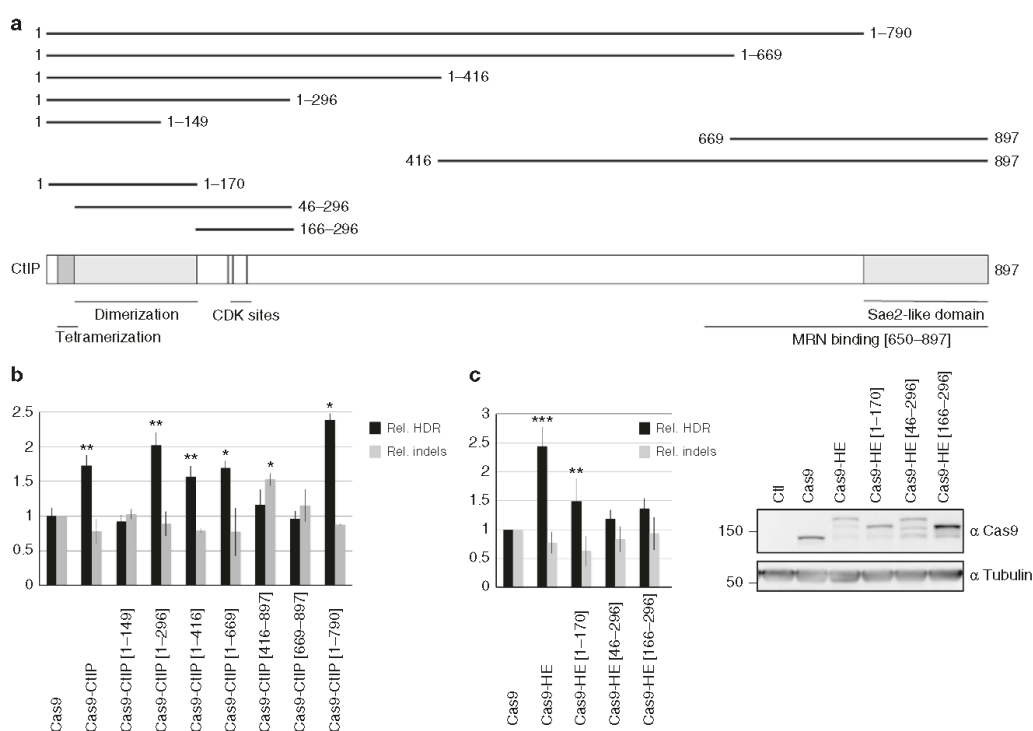


Fig. 2 Identification of the “HDR-enhancer” (HE) domain of CtIP. **a** Schematic diagram of CtIP protein showing the different truncated CtIP proteins that have been fused to Cas9 and tested for their ability to stimulate HDR. Various sequence features of CtIP, including tetramerization and dimerization domains, and CDK phosphorylation sites S233, T245, and S276, are indicated. **b** Identification of a domain of CtIP, called HE, spanning aa 1 to 296, which is able to stimulate HDR when fused to Cas9. Human RG37 fibroblasts were transfected with the indicated plasmids expressing Cas9 or Cas9-CtIP derivatives, T2 guide RNA plasmid, and GFP transgene donor with homology arms to the targeted *AAVS1* locus. Expression of fusion proteins was examined by western blot (Supplementary Fig. 1). Data are from four independent experiments. Error bars indicate standard deviation. **c** Functional analysis of HE domain. HEK293 cells were transfected with the indicated Cas9 plasmids, T2 guide RNA, and GFP transgene donor with homology arms to the *AAVS1* targeted locus. HDR-mediated transgene integration was measured by FACS analysis of GFP-positive cells, resulting from targeted GFP transgene integration. Indels at the cleavage site were measured by the T7E1 assay. The results are expressed as the mean of relative HDR or indel frequencies calculated by normalizing every HDR or indel frequency by that induced by Cas9, respectively. Asterisks indicate that the difference is statistically significant when comparing Cas9-CtIP or Cas9-HE derivatives to Cas9 in nonparametric *t*-test (* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.0005$). Data are from four independent experiments. Error bars indicate standard deviation. The relative expression levels of Cas9 and Cas9-HE derivatives were analyzed by western blot using anti-Cas9 and control anti-tubulin antibodies

for Cas9 and Cas9-HE. Depending on the guide RNA, they corresponded to seven to nine different indels that taken all together represented 47–70% of the total mutant reads. Interestingly, for all three guides, we observed that the patterns of indels induced by Cas9-HE were different from those induced by Cas9. The extent of changes, however, depended on the guide RNA (Table 1). As a control, we repeated the NU7441 treatment of Cas9-transfected cells that was previously reported²¹. Interestingly, for all three guide RNAs, Cas9-HE, and NU7441 treatment resulted for most indels in similar types of changes compared to those of Cas9 (changes were similar for 20 out of 24 indels). The differences, however, were generally of greater amplitude with NU7441. In particular, for spacer 54, the two most frequent mutations observed with Cas9 were reduced to tenfold by NU7441 treatment but only twofold when using Cas9-HE. This is reminiscent of the effects of lower NU7441 doses observed by van Overbeek et al.²¹. We also noted that indels with increased frequency were almost all deletions flanked

by microhomologies. When comparing Cas9-HE to Cas9, 13 out of 14 indels with increased frequency were deletions flanked by microhomologies of two or more nucleotides and 10 out of 12 for NU7441 treatment. Taken together, these results are consistent with Cas9-HE inducing a different balance of end-joining pathways compared to those of Cas9 and having an effect similar to a low NU7441 dose, with a partial inhibition of cNHEJ and an increase of MMEJ, likely due to stimulation of resection by the HE domain.

Equivalent HDR stimulation by Cas9-HE and Cas9-HE-Geminin. Fusion of the 110-aa degron of Geminin to Cas9 can increase homology-directed transgene integration¹¹. The Geminin degron and HE domain of CtIP are expected to stimulate HDR by different mechanisms. In order to examine whether their activities could be additive, we compared Cas9-HE and Cas9-HE-Geminin fusions at the *AAVS1* locus in HEK293

Table 1 Indel mutation patterns induced by Cas9, Cas9-HE, and Cas9+NU7441

<i>JAK</i> (spacer 54)	Indel size	MH motif	Cas9 (a)	Cas9-HE (b)	Cas9+NU7441 (c)	(c)/(a)	(b)/(a)
TCCAGGTTACCTCAGTCTTCTTGGAGCTCCTCATTTTAG							
TCCAGGTTACCTCAGTCTTCTTGGAGCTCCTCATTTTAG	1		20.7%	12.9%	1.6%	0.1	0.6
TCCAGGTTACCTCAG--TTCTTGGAGCTCCTCATTTTAG	-2		8.5%	3.9%	0.5%	0.1	0.5
TCCAGGTTACCC----TCTTCTGGAGCTCCTCATTTTAG	-4	TC	7.3%	11.0%	10.0%	1.4	1.5
TCCAGGTTCA-----CCTCATTTTAG	-19	CCTCA	5.4%	6.6%	17.0%	3.1	1.2
TCCAGGTTACCTCAG-CTTCTGGAGCTCCTCATTTTAG	-1		2.9%	1.7%	1.7%	0.6	0.6
TCCAGGTTACCTCAG---TCTTGGAGCTCCTCATTTTAG	-3	TCT	2.7%	1.4%	<0.1%	<0.03	0.5
TCCAGGTTAC-----CTTCTGGAGCTCCTCATTTTAG	-6	CT	2.5%	4.0%	3.7%	1.5	1.6
TCCAGG-----TTCTTGGAGCTCCTCATTTTAG	-12	TTC	1.9%	2.2%	3.8%	2.0	1.1
TCCAGGTTACCC-----TCTTGGAGCTCCTCATTTTAG	-7	TC	1.8%	4.0%	6.5%	3.6	2.2
<i>PCKS</i> (spacer 93)	Indel size	MH motif	Cas9 (a)	Cas9-HE (b)	Cas9+NU7441 (c)	(c)/(a)	(b)/(a)
GAGCTTTAAAATGGTCCGACTTGTCCCTCTCTCAGCCCTC							
GAGCTTTAAAATGGTCCGACTTGTCCCTCTCTCAGCCCTC	1		26.8%	16.4%	8.3%	0.3	0.6
GAGCTTTAAAATG-----GTCCCTCTCTCAGCCCTC	-10	GT	11.1%	16.0%	7.5%	0.7	1.4
GAGCTTTAAAATGGTCCGAC-TGTCCCTCTCTCAGCCCTC	-1		8.8%	6.4%	0.4%	0.04	0.7
GAGCTTTAAAATGGTCCGA-----CTCTCAGCCCTC	-9	CT	4.0%	5.9%	11.9%	3.0	1.5
GAGCTTTAAAATGGT-----TCCCTCTCTCAGCCCTC	-9	TCC	2.4%	2.6%	1.8%	0.8	1.1
GAGCTTTAAAATGGT-----TC	-24	TCC	2.2%	2.9%	14.7%	6.8	1.4
GAGCTTTAAAA-----TGTCCCTCTCTCAGCCCTC	-11	TG	1.9%	2.6%	0.8%	0.4	1.3
<i>AAVSI</i>	Indel size	MH motif	Cas9 (a)	Cas9-HE (b)	Cas9+NU7441 (c)	(c)/(a)	(b)/(a)
AAGGATGGGGCTTTTCTGTGTCACCAATCCTGTCCCTAGTGCC							
AAGGATGGGGCTTTTCTGTGTCACCAAT-CTGTCCCTAGTGCC	-1		40.9%	26.9%	27.5%	0.7	0.7
AAGGATGGGGCTTTTCTGTGTCACCAATCC-GTCCCTAGTGCC	-1		9.7%	4.1%	5.4%	0.4	0.6
AAGGATGGGGCTTTT-----CTGTCCCTAGTGCC	-12	CTGTC	4.8%	10.0%	8.8%	2.1	1.8
AAGGATGGGGCTTTTCTGTGTCACCAATcCCTGTCCCTAGTGCC	1		5.5%	3.3%	3.6%	0.6	0.7
AAGGATGGGGCTTTTCTGTGTCACCAA-----TCCCTAGTGCC	-5	TCC	3.9%	8.0%	9.4%	2.0	2.4
AAGGATGGGGCTTTTCTGTGTCACCAATC--GTCCCTAGTGCC	-2		2.7%	5.0%	2.9%	1.9	1.1
AAGGATGGGGCTTTTCTGTGTCACCAATCctgCTGTCCCTAGTGCC	3		2.1%	4.0%	1.9%	1.9	0.9
AAGGATGGGGCTTTTCTGTGTC-----CCTAGTGCC	-11	CC	0.9%	2.4%	2.9%	3.1	2.6

Indel mutation patterns induced after transfection of nucleases and guide RNA expression vectors were determined by sequencing of PCR amplicons of the targeted region. The wild-type target sequence is indicated on top of mutant sequences. When indicated, cells were treated with 10 μM DNA-PK inhibitor NU7441. The indels shown are indels that represented more than 2% of mutant reads obtained with Cas9 or Cas9-HE. If present, microhomologies (MH) of two or more nucleotides flanking the deletion are indicated.

Spacer 54 and Spacer 93 are from guide RNAs previously analyzed by van Overbeek et al.²¹

For spacer 54, mutant reads were 35.7% (of the total 47,199 reads), 29.8% (of the total 48,265 reads), and 6.5% (of the total 116,354 reads) for Cas9, Cas9-HE, and Cas9+NU7441, respectively. For spacer 93, mutant reads were 31.3% (of the total 45,398 reads), 24.2% (of the total 55,573 reads), and 4.1% (of the total 36,979 reads) for Cas9, Cas9-HE, and Cas9+NU7441, respectively. For T2 guide RNA, mutant reads were 39% (of the total 68,852 reads), 16.8% (of the total 67,815 reads), and 31.8% (of the total 69,696 reads) for Cas9, Cas9-HE, and Cas9+NU7441, respectively.

cells. We therefore tested the activity of a Cas9-HE-Geminin fusion, containing both the HE domain and the Geminin degron. However, addition of the Geminin degron did not further enhance HDR compared with Cas9-HE (Fig. 3). One likely explanation is that HDR stimulation by Cas9-HE may already be limited to the G2/S phases of the cell cycle so that fusion to the Geminin degron and the resulting degradation during the G1 phase cannot further enhance the activity of Cas9-HE. The results obtained with Cas9-Geminin were similar to those reported by Gutschner et al., and the activity of Cas9-HE appeared slightly more efficient than that of Cas9-Geminin (Fig. 3).

HDR stimulation in human iPS cells and rat oocytes. We next compared the efficiency of Cas9-HE and Cas9 for the targeted

integration of transgenes in different experimental contexts. We first examined Cas9-HE activity in human iPS cells, an important model system for biomedical research. In preliminary experiments, we could not detect GFP-positive cells after cotransfection of the GFP transgene donor with Cas9 targeting the *AAVSI* locus. This was perhaps due to insufficient GFP expression from the *AAVSI* locus, and we therefore replaced the GFP cDNA with a puromycin resistance cDNA in the donor plasmid. After cotransfection of the puromycin resistance donor with T2 guide RNA and Cas9 or Cas9-HE expression vectors, puromycin selection was applied for 2 weeks and puromycin-resistant colonies were counted. As found above in immortalized RG37DR fibroblasts, HEK293, and HCT116 cells, Cas9-HE resulted in more efficient HDR than Cas9 in human iPS cells (Fig. 4a). Several clones of puromycin-resistant cells were further analyzed.

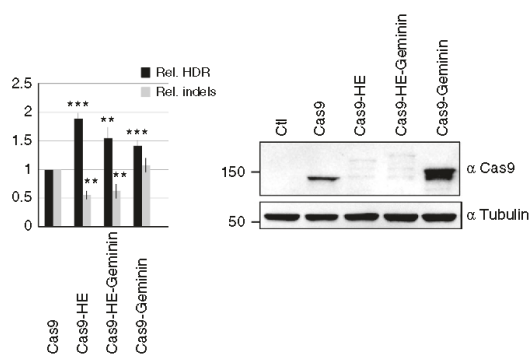


Fig. 3 Stimulation of transgene integration by Cas9-HE and Cas9-Geminin. Relative frequencies of HDR and indels induced by Cas9 or fusion of Cas9 to HE domain, Geminin degron, or both. Human HEK293 cells were transfected with the indicated Cas9 plasmids, T2 guide RNA, and GFP transgene donor with homology arms to the *AAVS1* targeted locus. HDR-mediated transgene integration was measured by FACS analysis of GFP-positive cells, resulting from targeted GFP transgene integration. Indels at the cleavage site were measured by the T7E1 assay. The results are expressed as the mean of relative HDR or indel frequency calculated by normalizing every HDR or indel frequency by that induced by Cas9. Asterisks indicate that the difference is statistically significant when comparing Cas9-HE, Cas9-HE-Geminin, and Cas9-Geminin to Cas9 in *t*-test (* $P < 0.05$ or ** $P < 0.005$). Data are from three independent experiments. Error bars indicate standard deviation. Relative expression levels of Cas9 and other fusions were analyzed by western blot with anti-Cas9 and control anti-tubulin antibodies. Protein extracts were obtained with lysis buffer containing 150 mM NaCl, which resulted in inefficient solubilization of Cas9 fusions with the HE domain compared to those of Cas9 and Cas9-Geminin

At the DNA level, targeted integration of the puromycin cDNA cassette was validated by PCR amplification of the expected junctions between the donor construct and the target locus (Supplementary Fig. 3). Recent reports indicate that DSB repair pathways are important for cell reprogramming and properties of iPS cells^{22,23}. We therefore wanted to examine whether Cas9-HE may have modified the behavior of iPS cells. Importantly, stem cell morphology of clones was similar for cells treated with either Cas9-HE or Cas9. Furthermore, in the clones tested, the expression of stemness markers was maintained (Fig. 4b), and cardiac differentiation could be efficiently induced (Fig. 4c), suggesting that treatment with Cas9-HE did not compromise the basic features of iPS cells. One potential concern with overexpression of Cas9-HE is that it might interfere with endogenous CtIP activity. In order to examine this possibility, we performed a RPA foci formation assay. After resection mediated by CtIP during DSB repair by HR, 3' single-stranded DNA is initially bound by RPA and the formation of RPA foci is therefore a standard marker of DNA resection. Cells were transfected with Cas9-HE, Cas9-CtIP, or Cas9 as well as with siRNA directed toward CtIP or control. Two days after transfection, cells were X-ray irradiated to induce DSBs and RPA foci counted at 1, 2, 4, 6, and 8 h afterward (Supplementary Fig. 4). CtIP knockdown mildly decreased RPA foci formation ($p < 0.0005$), while none of the Cas9 versions, i.e., Cas9, Cas9-CtIP, nor Cas9-HE significantly affected RPA foci formation. These results suggest that overexpression of Cas9-HE does not interfere with endogenous

CtIP activity and does not seem to perturb the cell's general ability to cope with DNA DSBs.

Next, we wanted to test the activity of Cas9-HE in rat oocytes. For this purpose, we co-microinjected into rat zygotes a long donor DNA (containing 4.7 kbp flanked by homology arms of ~1 kbp), sgRNAs targeting the *Rosa26* or *Il22bp* locus and Cas9-HE or Cas9 mRNA. As indicated in Table 2, zygotes that survived microinjection were reimplanted in foster mothers, and embryos at day 14 of gestation were harvested and genotyped (using the strategy depicted in Supplementary Fig. 5). For both *Rosa26* and *Il22bp* loci, sequencing of PCR amplicons spanning the targeted sequence revealed similar frequencies of indels, due to DSB repair by end-joining pathways, in Cas9-HE and Cas9 mRNA injections. In contrast, integration by HDR was strongly increased at the *Rosa26* locus in zygotes microinjected with Cas9-HE compared to those of Cas9 (representing 8% and 1% of harvested embryos for Cas9-HE and Cas9, respectively) but not at the *Il22bp* locus (representing 2% and 4% of harvested embryos for Cas9-HE and Cas9, respectively).

HDR stimulation depends on the guide RNA. When experiments were performed in rats, transgene integration was increased at the *Rosa26* locus but not at the *Il22BP* locus. We therefore tested five additional target loci in human HEK293 cells and found that Cas9-HE stimulated more efficient transgene integration at four of the five sites tested (Fig. 5a). Several non-exclusive explanations could be considered to explain why integration was not stimulated at some targets, including a specific role of the target sequence or chromatin context. We wanted to examine the possibility that the guide RNA could play a role in determining whether Cas9-HE will stimulate HDR more efficiently than Cas9. We chose to compare five guide RNAs that all target cleavage in a short 50-bp sequence of the *AAVS1* locus. The homology arms in the donor DNA used in the experiments above (depicted in Fig. 1a) were first slightly shortened to avoid potential cleavage by the guide RNAs so that the same donor DNA could be used with all five guides. When Cas9-HE and Cas9 were compared with the different guides and modified donor, we found that Cas9-HE directed approximately twofold higher levels of transgene integration than Cas9 for guides T2, T4, and D1 but not with the other two guides tested, guides D2 and D3 (Fig. 5b). The results indicate that, unexpectedly, the stimulation of HDR by Cas9-HE is dependent on the guide RNA used to trigger genome editing. In order to further examine the role of the guide RNA sequence, we tested the impact of mutations of guide T4, the guide RNA which gave the strongest stimulation of HDR by Cas9-HE at the *AAVS1* locus. Out of 15 mutations tested, one mutation at position 3 of the guide RNA sequence eliminated the stimulation of HDR by Cas9-HE (mutant guide T4-m3, Supplementary Fig. 6A). This mutation decreased transgene integration and indel frequencies and therefore also interfered with DNA cleavage (Supplementary Fig. 6B and 6D, respectively). Interestingly, a second mutation, at position 18 of the guide RNA sequence, also significantly interfered with DNA cleavage (as shown from decreased indel and transgene integration frequencies for mutant guide T4-m18bis) but HDR could still be stimulated by Cas9-HE. PAM-distal and proximal sequences predominantly influence different steps of DNA cleavage²⁴. Given the different effects of mutations at positions 3 and 18, we decided to test a truncated form of guide T4, lacking the first two ribonucleotides. HDR stimulation by Cas9-HE was no longer observed, while on the other hand, indel and transgene integration frequencies were not significantly affected. All together, these studies of mutant forms of guide T4 suggest that PAM-distal

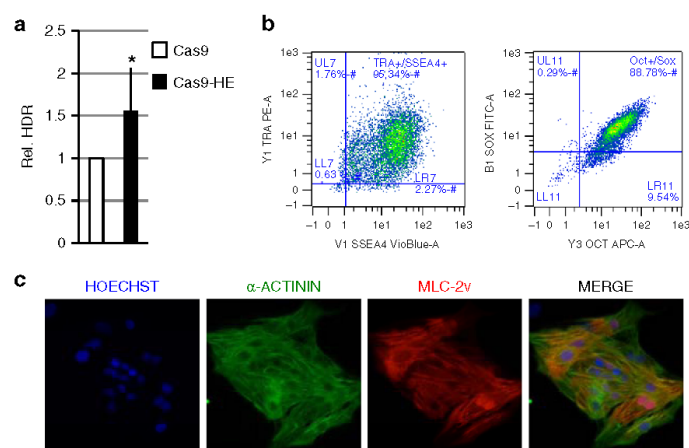


Fig. 4 Stimulation of transgene integration by Cas9-HE in iPS cells. **a** Relative frequencies of HDR induced by Cas9-HE at DNA cleavage site directed by T2 guide RNA. Human iPS cells were transfected with the indicated Cas9 plasmids, T2 guide RNA, and puromycin transgene donor with 800-bp homology arms to the *AAVS1* locus. HDR-mediated transgene integration was measured by counting puromycin-resistant clones, resulting from targeted integration at the *AAVS1* locus of the puromycin resistance exon carried by the transgene. The results are expressed as the mean relative number of puromycin-resistant clones after normalizing the number of puromycin-resistant clones by that induced by Cas9. The difference between Cas9-HE and Cas9 was statistically significant (t-test, $*P < 0.05$). Data represented are from four independent experiments. Error bars indicate standard deviation. **b** A clone of puromycin-resistant cells derived from puromycin selection of cells transfected with Cas9-HE, T2 guide RNA, and puromycin-resistant transgene donor was analyzed for expression of stemness markers TRA-1-60 and SSEA4 or Oct3/4 and Sox2 by FACS analysis. **c** After induction of cardiomyocyte differentiation in the clone analyzed in **b**, expression of cardiomyocyte markers alpha-actinin and MLC2-v was analyzed by immunohistochemistry. Scale bar, 50 μ m

Table 2 Comparison of Cas9-HE and Cas9 in obtaining targeted transgene integration into the rat <i>Rosa26</i> and <i>Il22bp</i> loci									
Cas9 form	Target locus	KI fragments	Dose Cas9 mRNA/sgRNA/donor DNA (ng/ μ l)	Eggs injected (survival rate %)	Eggs transferred	E14 embryos (% transferred)	Indels + (% of E14)	Donor integration+ (% of E14)	HDR+ (% of E14)
Cas9-HE	<i>Rosa26</i>	CAG-GFP	50/10/2	216 (75%)	154	37 (24%)	29 (78%)	5 (13%)	3 (8%)
Cas9	<i>Rosa26</i>	CAG-GFP	50/10/2	284 (77%)	211	84 (39%)	62 (73%)	2 (2%)	1 (1%)
Cas9-HE	<i>Il22bp</i>	Il22bp-2A-GFP	50/10/2	277 (78%)	217	82 (37%)	45 (55%)	7 (8%)	2 (2%)
Cas9	<i>Il22bp</i>	Il22bp-2A-GFP	50/10/2	286 (80%)	226	91 (40%)	55 (60%)	8 (8%)	4 (4%)

HDR+, HDR-mediated GFP transgene integration was defined as positive in E14 embryos for which both 5' and 3' in-out PCRs were detected using primers in the transgene and outside the homology arms (with PCR products confirmed by DNA sequencing, schematic of PCR primer positions in Supplementary Fig. 5); indels+, E14 embryos in which indels were detected by sequencing of PCR amplicons from the targeted genomic region; donor integration, E14 embryos in which PCR amplification of the transgene was positive

sequences may play a crucial role in determining the efficiency of HDR stimulation by Cas9-HE.

Discussion

We describe here a simple approach to efficiently stimulate HDR after CRISPR-Cas9-mediated DNA cleavage. Our approach is based on forcing CtIP to the DNA cleavage site by using a Cas9-CtIP fusion. Such a fusion strategy was previously used to modulate DNA repair at the cut site, allowing to inhibit base-excision repair when fusing Cas9 to the uracil DNA glycosylase inhibitor from *Bacillus subtilis* bacteriophage²⁵ or to increase indels when fusing Cas9 to *E. coli* Rec A²⁶. This report shows that it can also be used to stimulate HDR. Previous approaches for stimulating HDR were based on cNHEJ inhibition or Rad51

recombinase stimulation by genetic or pharmacological manipulation of cells^{10,27}. The direct fusion strategy reported here is based on targeted activity of a key component of the homologous recombination DNA repair pathway and is potentially less likely to have a global effect on DNA repair. Importantly, we show that HDR stimulation is due to the N-terminal 296 aa of CtIP (designated as the HDR-enhancer domain, HE). Activity of the HE domain of CtIP required several molecular features known to be essential to CtIP activity in homologous recombination. We speculate that the HE domain, normally involved in multimerization of CtIP, could recruit endogenous CtIP at the cleavage site, and thereby stimulate HDR with donor DNA.

As shown in Supplementary Fig. 2B three known CDK phosphorylation sites (S233, T245, and S276) are essential for HDR stimulation by the HE domain. These CDK sites are known to be

required for the interaction of CtIP with Nbs1²⁰. This finding suggests that Nbs1, and perhaps the whole Mre11–Rad50–Nbs1 endonuclease complex, may be recruited at the target site by Cas9–HE and may stimulate HDR.

During homologous recombination, CtIP and the MRN complex trigger end resection at the DSB, generating single-stranded DNA needed to search for and copy a DNA repair template. CtIP is also known to contribute to alternative end-joining, which requires resection and is mechanistically different from cNHEJ. Similarly, Cas9–HE may stimulate DSB repair by HR, as suggested by elevated transgene integration, as well as favor alternative end-joining pathways. Indeed, the mutation patterns were different for Cas9–HE and Cas9, suggesting that the balance of cNHEJ and MMEJ end-joining pathways is affected by the fusion of the HE domain to Cas9. The effect of Cas9–HE was reminiscent of the effects of low NU7441 dose reported by van Overbeek et al.²¹, suggesting that the HE domain may exert a mild inhibition of cNHEJ. In addition, deletions flanked by micro-homologies had increased the frequency with Cas9–HE (Table 1), suggesting that MMEJ was favored relative to cNHEJ. These findings are consistent with the known role of CtIP in triggering DNA resection and antagonizing cNHEJ at the earlier steps of choice between the DSB repair pathways. The increased role of MMEJ may explain why, even though transgene integration is stimulated, the frequency of indels is not significantly different from Cas9–HE compared to those of Cas9.

Enhancement of HDR with Cas9–HE relative to Cas9 was observed at different loci, but unexpectedly, it was only observed for certain guides at a given locus (Fig. 5). One way to overcome this limitation may be to use several guides simultaneously. Alternatively, a side-by-side comparison of Cas9 and Cas9–HE may be performed for each candidate guide. The reason for such dependence on the guide RNA is not clear. Guide RNA sequence, however, is known to have different roles in Cas9 activity. For example, mismatches in the PAM-distal sequence can specifically inhibit conformational changes needed to activate Cas9 nuclease domains without affecting DNA binding²⁸. A recent study also showed that association and dissociation kinetics of dCas9 to DNA are influenced by different parts of the guide RNA sequence, with dissociation being influenced by PAM-distal sequences²⁴. Our finding that mutants of guide T4 with a PAM-distal mutation or with a deletion of the two most PAM-distal nucleotides can no longer support stimulation of integration by Cas9–HE that is reminiscent of these findings. One possibility is that in cells, specific guide RNA features such as PAM-distal sequences, influence how long Cas9–HE remains bound to DNA after cleavage and thereby impacts the activity of the HE domain on subsequent DNA repair. We propose that such features will also influence the efficiency of other Cas9 fusions.

As shown in the present work, using the Cas9–HE fusion allows to achieve more efficient HDR-mediated transgene integration at the *AAVS1* locus, which given its safe harbor properties, is an important locus for transgene integration in gene therapy and functional studies. Cas9–HE activity was demonstrated at the *AAVS1* locus in human-immortalized and transformed cell lines, as well as in iPS cells. Importantly, iPS features did not appear to be compromised during genome editing with Cas9–HE since modified clones expressed stemness markers and had preserved their ability to differentiate into cardiomyocytes. In addition, when the *Rosa26* locus was targeted in rat zygotes, injections with Cas9–HE mRNA led to higher frequency of transgene integration than Cas9 mRNA, showing that enhanced frequency of targeted integration can also be induced at another important safe harbor locus and that using Cas9–HE does not compromise development. The addition of Cas9–HE to the

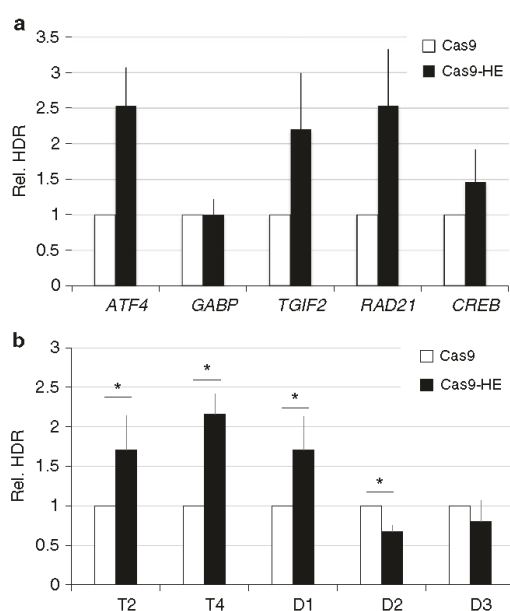


Fig. 5 HDR stimulation by the HE domain takes place at different target genes and can depend on the guide RNA used. **a** Relative frequencies of HDR induced by Cas9–HE were compared to those induced by Cas9 at five different target genes in HEK293 cells using previously published guide RNAs and donor plasmids³⁶. Targeted integration of the donor plasmid results in in-frame insertion of *E2A-neoR* cDNA³⁶. G418 (neomycin)-resistant colonies were counted after Cresyl violet staining to measure HDR-mediated events and normalized by the number of colonies obtained with Cas9 to give the relative HDR frequencies indicated. Data represented are from three independent experiments for *TGIF2*, *RAD21*, and *CREB* genes and from four experiments for *ATF4* and *GABP* genes and are provided in Supplementary Fig. 7. Error bars indicate standard deviation. **b** Relative frequencies of HDR induced by Cas9–HE were compared to those induced by Cas9 with the indicated guide RNAs, which all cleave to a small 50-bp region of the *AAVS1* locus, and a common p84Δ donor plasmid, harboring ~800-bp homology arms. P84Δ was derived from the p84 donor plasmid depicted in Fig. 1a by shortening the homology arms so that they would not be cleaved by any of the guide RNAs. Asterisks indicate that the difference is statistically significant when comparing Cas9–HE to Cas9 in t-test (* $P < 0.05$). Data represented are from five independent experiments and are provided in Supplementary Fig. 7. Error bars indicate standard deviation

genome-editing toolbox opens a promising avenue for higher efficiency of precise genome editing with the CRISPR–Cas9 system. Further studies will aim at better understanding the importance of the guide RNA used and at combining additional regulatory domains of DNA repair proteins to further stimulate HDR. In particular, by further Cas9 engineering, it may be possible to overcome the inhibition of homologous recombination during the G1 phase, as suggested by recent studies of DNA DSB repair during the cell cycle²⁹, and achieve efficient precision genome editing in quiescent cells.

Methods

Plasmids. TALE nucleases were produced starting with plasmids for TALE repeats kindly provided by Dr. Bo Zhang⁷. TALEN DNA-binding domains targeted the

following sequences: CCCTCCACCCACAG (AAVS1 TALEN-left) and TTTCTGTACCAATCC (AAVS1 TALEN-right). Guide RNA sequences were cloned in MLM3636-derived vector (Addgene #43860, a kind gift of the Joung lab), and Cas9-expression vector Addgene #41815 from the Church lab was used. CtIP-expression vector was kindly sent by Dr. Xiao Wu²⁰. CtIP fragments were amplified by PCR and inserted between EcoRI and AgeI restriction sites in Cas9-expression vector by standard cloning, resulting in the fusion of CtIP fragments at the C-terminus of Cas9. GFP donor plasmid, containing a GFP transgene with an artificial splice acceptor site, *E2A-GFP* coding sequence, and bGH polyA sequence flanked by 800-bp homology arms to the AAVS1 locus, was kindly provided by Dr. Urnov¹⁸. Guide RNAs and donor plasmids targeting the human *ATP4*, *GABP*, *TGIF2*, *RAD21*, and *CREB* genes were from the Mendenhall lab (Addgene #72350, #72351, #64253, and #64254).

Cell culture and transfection. All cells were cultured at 37 °C in a humidified chamber with 5% CO₂ and transfected with the AMAXA electroporation system. HEK293 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). iPSCs purchased from Univercell-Biosolutions were maintained on mTeSR1 basal medium supplemented with mTeSR1 5× Supplement (Stemcell Technologies). A total of 10⁶ HEK293 cells were nucleofected with 1 µg of Cas9 expression plasmid, 1 µg of gRNA expression plasmid, and 1 µg of GFP donor using V solution (Lonza) and Amaxa A-023 program. RG37 cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS and nucleofected with 1 µg of Cas9 expression plasmid, 1 µg of guide RNA expression plasmid, and 1 µg of GFP donor using NHDF solution (Lonza) and Amaxa P-022 program. HCT116 cells were cultured in McCoy supplemented with 10% FBS and transfected with 4 µg of Cas9 expression plasmid, 2 µg of guide RNA expression plasmid, and 6 µg of GFP donor using V solution (Lonza) and Amaxa D-032 program. For experiments reported in Fig. 5b and Supplementary Fig. 6 and 7, HEK293 cells were transfected with Lipofectamine 3000 reagent (Thermo Fisher Scientific) according to supplier recommendations: 2 µg of Cas9 expression plasmid, 1 µg of guide RNA expression plasmid, and 1 µg of GFP donor were mixed with Lipofectamine 3000 and added to the culture medium of a well from a six-well plate that had been seeded the previous day with 0.7 × 10⁶ cells. Electroporation of iPSCs was performed according to the manufacturer's instructions with Lonza 4D-Nucleofector System and the following parameters P3 Primary Cell 4D-Nucleofector program: CM-113. Differentiation of iPSCs into cardiomyocytes was performed according to a protocol adapted from ref. 30. The basal medium made with RPMI 1640 medium (ref. 11875-093, Life Technologies), 500 µg/ml human albumin (ref. A9731, Sigma), and 213 µg/ml L-ascorbic acid (ref. A8960, Sigma), was complemented with 4 µM CHIR99021 (ref. 77052, Stemcell Technologies) and 10 ng/ml BMP4 (ref.130-111-164, Miltenyi) from day 0 to day 2, or 2 µM Wnt C59 (ref. S7037, Selleckchem) from day 3 to day 4. From day 5, the cells were maintained in the basal medium. Beating areas were observed from day 9. HEK293 and HCT116 cells were purchased from ATCC, and RG37 is a human cell line derived from the SV40-transformed human fibroblasts GM639 by the laboratory of Bl³¹. The parental GM639 cell line was obtained from Dr. Monnat RJ (University of Washington)³².

Analysis of GFP transgene integration by FACS. When targeting the AAVS1 locus with the GFP donor¹⁸, targeted integration of GFP cDNA results in cells becoming GFP-positive, which can be easily monitored by FACS analysis. Cells were analyzed for GFP expression by flow cytometry using an Accuri C6 analyzer (BD Biosciences) 6–7 days after transfection. The relative HDR frequency was calculated by normalizing HDR frequencies by the HDR frequency induced by Cas9 alone. GFP-positive cells ranged between 0.5% and 15% of cells analyzed depending on the cell line used and the experiment.

Analysis of imprecise mutation frequencies by the T7E1 assay. T7 endonuclease I (T7E1) assays were performed to analyze the frequency of imprecise mutations induced by end-joining pathways of DSB repair. Seventy-two hours after transfection, genomic DNA was extracted with DNA mini kit (EZNA tissue DNA kit, Omega Biotek), and the AAVS1 target locus was amplified by PCR using the following primers: T7AAVFW 5'-cagcaccaggatcagtgaaa-3' and T7AAVREV 5'-ctatgtccatccagcagaca-3'. PCR products were denatured, annealed to form heteroduplexes in a PCR machine (5 min at 95 °C, 95–25 °C at –0.5 °C/30 s, and 15 min at 4 °C), digested with 1.5 units of T7E1 (New England Biolabs) for 10 min at 37 °C, and run on a 2.5% agarose gel. After migration, sequence modification frequencies were estimated as commonly done³³: %indels = 1 – (1 – Xc)^{1/2} with Xc, amount of cleaved products, and if Xc < 0.15, %indels = Xc/2. %indels calculated from the T7E1 assay at the AAVS1 locus varied between 2% and 20% depending on the cell line used and the experiment.

Analysis of protein expression levels by western blot. Proteins were isolated 48 h after transfection. Cells were resuspended in lysis buffer (Tris-HCl 50 mM, pH 7, NaCl 150 mM or KCl 300 mM, Triton-X-100 1%, SDS 0.1%, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, aprotinin 1 µg/µl, pepstatin 10 µg/µl, and leupeptin 1 µg/µl), centrifuged at 15,000 × g for 15 min at 4 °C, and supernatants were used. We observed that lysis with buffer containing 300 mM KCl, which is known to favor the release of

chromatin-bound proteins, allowed better extraction of Cas9-HE and derivatives compared to lysis buffer with 150 mM NaCl. Western blots were performed by standard Tris-glycine SDS-PAGE followed by transfer to nitrocellulose membranes. Following blocking with 5% BSA in TBS-T (Tris 24 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.68 mM, and Tween-20 0.1%), membranes were probed with anti-Cas9 antibody (Novus Biologicals, NBP2-36440SS) at 1 µg/ml and anti-tubulin antibody (Sigma, T6074200UL) at 0.1 µg/ml, and visualized by chemiluminescence with a GBox (Syngene) or exposure to the X-ray film. Uncropped scans are provided as Supplementary Fig. 8.

Analysis of indel mutation patterns. DNA was isolated from transfected cells (EZNA tissue DNA kit, Omega Biotek), and the target region was amplified by PCR with Phusion Polymerase (NEB). Each sample was assigned to a primer set with a unique barcode to enable multiplex sequencing. PCR products were purified on a 2% agarose gel and treated by the MNHN genomics center and sequences on Ion Torrent PGM. A custom python pipeline was used to count and characterize indels as detailed in ref. 31. All sequence data from Table 1 are available from NCBI BioProject with the accession number PRJNA433647.

Generation of genome-edited rats. Zygotes were obtained from superovulated Sprague-Dawley (SD/Crl) rats (Charles River, L'Arbresle, France) and microinjected as follows. Prepubescent females (4–5-weeks old) were superovulated with pregnant mare serum gonadotropin (30 IU; Centravet, France) and followed 48 h later with human chorionic gonadotropin (20 IU; Centravet, France) before breeding. Briefly, linearized excised donor DNA consisted of (i) when targeting the *Rosa26* locus, the CAG promoter controlling GFP expression flanked by homology arms of 800 bp of *Rosa26* contiguous to the site of cleavage directed by guide RNA with the following target sequence GTGTATGAAACTAATCTGTC TGG³⁴ or (ii) when targeting the *IL22BP* locus, *E2A-GFP* cDNA flanked by 2-kbp homology arms to the following guide RNA target site TGTGTGCAGATTCATAAAC TGG. The Cas9-HE or Cas9 mRNAs, sgRNA, and donor DNA were mixed (50, 10, and 2 ng/µl, respectively) and microinjected into the pronucleus and cytoplasm of zygotes. Zygotes surviving microinjection were implanted into pseudopregnant females. At day 14, females were sacrificed, and DNA was extracted from embryos for genotyping. Genotyping was performed using the primers and PCR conditions described in Supplementary Fig. 5 and Supplementary Table 1. PCR products were analyzed by microfluidic capillary electrophoresis³⁵ and Sanger sequencing. The study was approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Pays de la Loire Region, France, in accordance with the guidelines from the French National Research Council for the Care and Use of Laboratory Animals (Permit Numbers: Apafis 692).

Immunohistochemistry. Briefly, cells were fixed with PBS containing 8% paraformaldehyde for 20 min at 4 °C. After washing with PBS, cells were permeabilized and blocked with PBS containing 0.1% Triton-X-100 for 15 min at 4 °C. After washing with PBS, the cells were blocked with PBS containing 1% BSA and 10% horse serum for 1 h at room temperature. Then, the cells were incubated, with mouse anti-α-actinin antibody (dilution: 1/800; A7811; Sigma) and with rabbit anti-MYL2 antibody (dilution: 1/600; 10906-1-AP; Proteintech), overnight at 4 °C. The cells were incubated the next day with goat anti-mouse IgG antibody conjugated to Alexa Fluor 488 (dilution: 1/500; A-11001; Invitrogen) and a goat anti-rabbit IgG antibody conjugated to Alexa Fluor 555 (dilution: 1/500; A-21428; Invitrogen) for 1 h at room temperature in the dark. Counterstaining was performed using Hoechst (dilution: 1/4000; H3570, Invitrogen) for 10 min at room temperature. The stained cells were analyzed with a Nikon Eclipse Ti microscope.

Flow cytometric analysis of iPSCs. iPSCs were singularized with Accutase. For the surface pluripotent markers, cells were resuspended in staining buffer. Then, the cells were incubated with monoclonal anti-SSEA-4 antibodies conjugated to Vioblu (dilution: 1/10; clone REA101, reference no. 130-098-366, MACS Miltenyi Biotec) and monoclonal anti-TRA-1-60 antibodies conjugated to PE (dilution: 1/10; clone REA157, reference no. 130-100-350, MACS Miltenyi Biotec) at 4 °C for 10 min. Finally, the cells were washed with stain buffer, centrifuged, and resuspended in a suitable amount of stain buffer for flow cytometry analysis. For the intracellular pluripotent markers, the cells were fixed using Cytofix for 20 min at 4 °C and washed with stain buffer. Then, the cells were incubated with monoclonal anti-OCT3/4 antibodies conjugated to APC (dilution: 1/10; clone REA338, reference no. 130-105-607, MACS Miltenyi Biotec) and monoclonal anti-Sox2 antibodies conjugated to FITC (dilution: 1/10; clone REA320, reference no. 130-104-993, MACS Miltenyi Biotec), and diluted in Perm/Wash buffer, at 4 °C for 30 min. Finally, the cells were washed with stain buffer, centrifuged, and resuspended in a suitable amount of stain buffer for flow cytometry analysis. For each sample, the events were captured on the MACSQuant VYB flow cytometer and analyzed with MACSQuantify Software.

RPA foci formation assay. Twenty-four hours after plating, RG37 fibroblast cells were transfected with siRNA using Interferin (Polyplus, Ozyme). siNT(control): AUGAACGUGAAUUGCUCAA(dTdT). siCtIP:

GCUAAAACAGGAACGAAUC. Three days after plating, cells were transfected with expression plasmids for Cas9, Cas9-HE, and Cas9-CtIP using JetPei (Polyplus, Ozyme). Five days after plating, cells were irradiated with X-rays at 6 Gy (XRAD 320, 1.03 Gy/min). At 0, 1, 2, 4, 6, and 8 h after irradiation, cells on coverslips were pre-permeabilized with PBS-Triton 0.25% for 3 min on ice, and then fixed in paraformaldehyde 2% for 15 min. The cells were then incubated with PBS containing 0.5% Triton-X-100 for 5 min at RT for permeabilization. After blocking in PBS containing 3% BSA and 0.05% Tween-20 solution for 30 min at RT, immunostaining was performed using the following primary antibody: mouse anti-RPA (1:300, ANA19L, Millipore). Incubation was performed for 1 h 30 min at 37 °C with antibodies diluted in PBS containing 3% BSA and 0.05% Tween-20. Next, the coverslips were incubated for 45 min with Alexa-488-conjugated anti-mouse secondary antibody (Life Technologies) at 37 °C and mounted in mounting medium (Dako) supplemented with 40,60-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma). Images were captured using a Zeiss Axio Imager Z1 microscope with a $\times 63$ objective equipped with a Hamamatsu camera. Acquisition was performed using AxioVision (4.7.2). Images were imported, processed, and merged in the ImageJ software.

Statistical tests. Nonparametric Mann-Whitney t-tests were performed to determine statistically significant differences in transgene integration efficiency, and indels between different experimental conditions or the number of RPA foci per cell (* $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, and *** $P < 0.0005$). Error bars indicate standard deviation.

Data availability. The data generated in this study are available in the manuscript and accompanying documents or from the corresponding author upon reasonable request. Sequence data were submitted to NCBI and are accessible with BioProject ID: PRJNA433647.

Received: 3 July 2017 Accepted: 16 February 2018

Published online: 19 March 2018

References

- Choulika, A., Perrin, A., Dujon, B. & Nicolas, J. P. Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 1968–1973 (1995).
- Rouet, P., Smih, F. & Jasin, M. Expression of a site-specific endonuclease stimulates homologous recombination in mammalian cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **91**, 6064–6068 (1994).
- Cong, L. et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* **339**, 819–823 (2013).
- Doyon, Y. et al. Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. *Nat. Biotechnol.* **26**, 702–708 (2008).
- Huang, P. et al. Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs. *Nat. Biotechnol.* **29**, 699–700 (2011).
- Mali, P. et al. Cas9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat. Biotechnol.* **31**, 833–838 (2013).
- Urnov, F. D. et al. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* **435**, 646–651 (2005).
- Jinek, M. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**, 816–821 (2012).
- Yang, D. et al. Enrichment of G2/M cell cycle phase in human pluripotent stem cells enhances HDR-mediated gene repair with customizable endonucleases. *Sci. Rep.* **6**, 21264 (2016).
- Beumer, K. J. et al. Efficient gene targeting in *Drosophila* by direct embryo injection with zinc-finger nucleases. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **105**, 19821–19826 (2008).
- Gutschner, T., Haemmerle, M., Genovese, G., Draetta, G. F. & Chin, L. Post-translational regulation of Cas9 during G1 enhances homology-directed repair. *Cell Rep.* **14**, 1555–1566 (2016).
- Howden, S. E. et al. A Cas9 variant for efficient generation of indel-free knockin or gene-corrected human pluripotent stem cells. *Stem Cell Rep.* **7**, 508–517 (2016).
- Anand, R., Ranjha, L., Cannavo, E. & Cejka, P. Phosphorylated CtIP functions as a co-factor of the MRE11-RAD50-NBS1 endonuclease in DNA end resection. *Mol. Cell* **64**, 940–950 (2016).
- Polato, P. et al. CtIP-mediated resection is essential for viability and can operate independently of BRCA1. *J. Exp. Med.* **211**, 1027–1036 (2014).
- Sartori, A. A. et al. Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* **450**, 509–514 (2007).
- Symington, L. S. Mechanism and regulation of DNA end resection in eukaryotes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **51**, 195–212 (2016).
- Dumay, A. et al. Bax and Bid, two proapoptotic Bcl-2 family members, inhibit homologous recombination, independently of apoptosis regulation. *Oncogene* **25**, 3196–3205 (2006).
- DeKaveler, R. C. et al. Functional genomics, proteomics, and regulatory DNA analysis in isogenic settings using zinc finger nuclease-driven transgenesis into a safe harbor locus in the human genome. *Genome Res.* **20**, 1133–1142 (2010).
- Davies, O. R. et al. CtIP tetramer assembly is required for DNA-end resection and repair. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **22**, 150–157 (2015).
- Wang, H. et al. The interaction of CtIP and Nbs1 connects CDK and ATM to regulate HR-mediated double-strand break repair. *PLoS Genet.* **9**, e1003277 (2013).
- van Overbeek, M. et al. DNA repair profiling reveals nonrandom outcomes at Cas9-mediated breaks. *Mol. Cell* **63**, 633–646 (2016).
- Gómez-Cabello, D., Checa-Rodríguez, C., Abad, M., Serrano, M. & Huertas, P. CtIP-specific roles during cell reprogramming have long-term consequences in the survival and fitness of induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rep.* **8**, 432–445 (2017).
- Tilgner, K. et al. A human iPSC model of Ligase IV deficiency reveals an important role for NHEJ-mediated-DSB repair in the survival and genomic stability of induced pluripotent stem cells and emerging haematopoietic progenitors. *Cell Death Differ.* **20**, 1089–1100 (2013).
- Boyle, E. A. et al. High-throughput biochemical profiling reveals sequence determinants of dCas9 off-target binding and unbinding. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **114**, 5461–5466 (2017).
- Komor, A. C., Kim, Y. B., Packer, M. S., Zuris, J. A. & Liu, D. R. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* **533**, 420–424 (2016).
- Lin, L. et al. Fusion of SpCas9 to *E. coli* RecA protein enhances CRISPR-Cas9 mediated gene knockout in mammalian cells. *J. Biotechnol.* **247**, 42–49 (2017).
- Gandia, M., Xu, S., Font, C. & Marcos, J. F. Disruption of ku70 involved in non-homologous end-joining facilitates homologous recombination but increases temperature sensitivity in the phytopathogenic fungus *Penicillium digitatum*. *Fungal Biol.* **120**, 317–323 (2016).
- Dagdaz, Y. S., Chen, J. S., Sternberg, S. H., Doudna, J. A. & Yildiz, A. A conformational checkpoint between DNA binding and cleavage by CRISPR-Cas9. *Sci. Adv.* **3**, ea00027 (2017).
- Orthwein, A. et al. A mechanism for the suppression of homologous recombination in G1 cells. *Nature* **528**, 422–426 (2015).
- Lian, X. et al. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions. *Nat. Protoc.* **8**, 162–175 (2013).
- Dumay, A. et al. Bax and Bid, two proapoptotic Bcl-2 family members, inhibit homologous recombination, independently of apoptosis regulation. *Oncogene* **25**, 3196–3205 (2006).
- Saintigny, Y., Makienko, K., Swanson, C., Emond, M. J. & Monnat, R. J. Homologous recombination resolution defect in Werner syndrome. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 6971–6978 (2002).
- Renaud, J.-B. et al. Improved genome editing efficiency and flexibility using modified oligonucleotides with TALEN and CRISPR-Cas9 nucleases. *Cell Rep.* **14**, 2263–2272 (2016).
- Ménoret, S. et al. Homology-directed repair in rodent zygotes using Cas9 and TALEN engineered proteins. *Sci. Rep.* **5**, 14410 (2015).
- Chenouard, V. et al. A rapid and cost-effective method for genotyping genome-edited animals: a heteroduplex mobility assay using microfluidic capillary electrophoresis. *J. Genet. Genomics* **43**, 341–348 (2016).
- Savic, D. et al. CETCh-seq: CRISPR epitope tagging ChIP-seq of DNA-binding proteins. *Genome Res.* **25**, 1581–1589 (2015).

Acknowledgements

Work reported here was supported by grants ANR-II-INSB-0014, ANR-16-CE18-0012-01, AFM no. 18566, from Region Pays de la Loire through Biogenouest, and ANR-14-LAB5-0008, ANR-11-LABX-0016-01 (LABEX IGO), ANR-10-IBHU-005 (IHU-CESTI). A.K. was partially supported by ANRT. Plasmids were kindly sent by the Wu lab and made available from the Joung, Church, Mendenhall, and Zhang labs through Addgene as indicated in the Methods section. We are grateful to Régis Debryne at the MNEN genomics center for deep sequencing of PCR products and to Jean-Baptiste Renaud for help with preliminary experiments.

Author contributions

B.L., C.G., and J.P.C. conceived the project and designed the experiments. M.C., A.K., S. M., A.B., K.L., E.D., L.P., L.T., S.G., and A.D. performed the experiments and analyzed the results; J.M.L., L.A., B.L., C.G., and J.P.C. analyzed the results. M.C. and J.P.C. wrote the manuscript with the help of all authors.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03475-7>.

Competing interests: Authors other than A.K., L.T., and J.M.I. are current or former employees of INSERM, CNRS, or MNHN. Inserm Transfert filed a patent application associated with results from this work on behalf of INSERM, CNRS, and MNHN.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

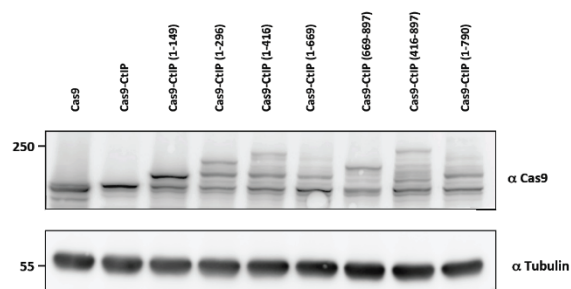


Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

Supplementary information

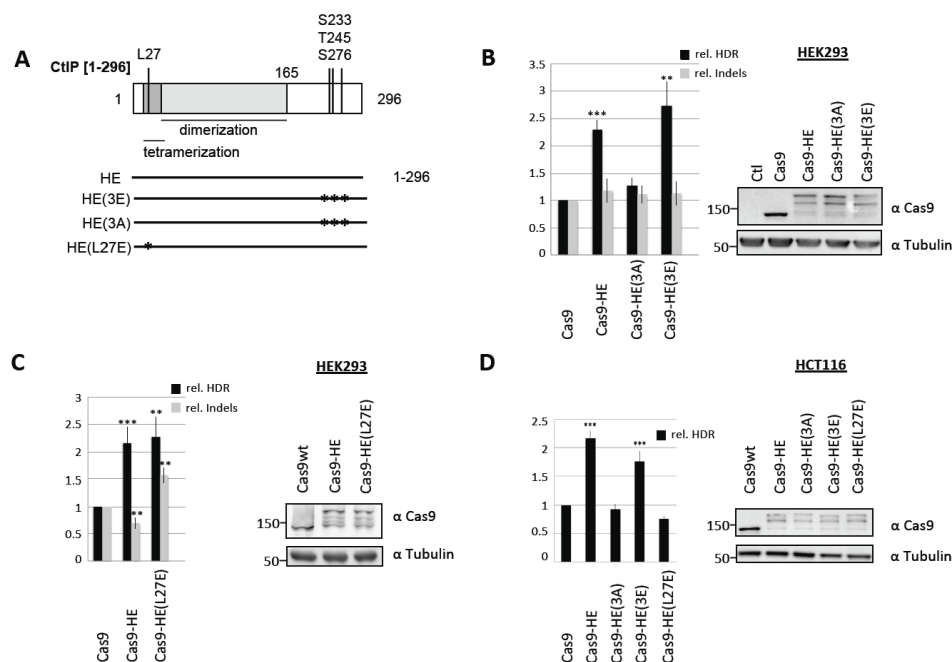
CtIP fusion to Cas9 enhances transgene integration by homology-dependent repair.
Charpentier et al.



Supplementary Figure 1 Relative expression levels of Cas9 and Cas9-CtIP derivatives

Relative expression levels of Cas9 and Cas9-CtIP derivatives were analyzed by western blot with anti-Cas9 and control anti-tubulin antibodies.

Several fusion proteins of Cas9 and CtIP fragments [Cas9-CtIP, Cas9-CtIP[1-669] and Cas9-CtIP[1-790]] were not detected as bands of the expected size and only bands likely corresponding to degradation products could be detected. This may be due to instability of the fusion proteins during extraction. Reminiscent of these difficulties, we note that in structure-function studies, CtIP was found to be very difficult to purify from insect cells with the baculovirus system (Davies et al., 2015). We have also produced recombinant Cas9[1-296] in E Coli and found that solubilization and purification of full-length protein was very inefficient and that a product corresponding roughly to the Cas9 moiety was predominantly isolated.



Supplementary Figure 2 Functional analysis of the HE domain

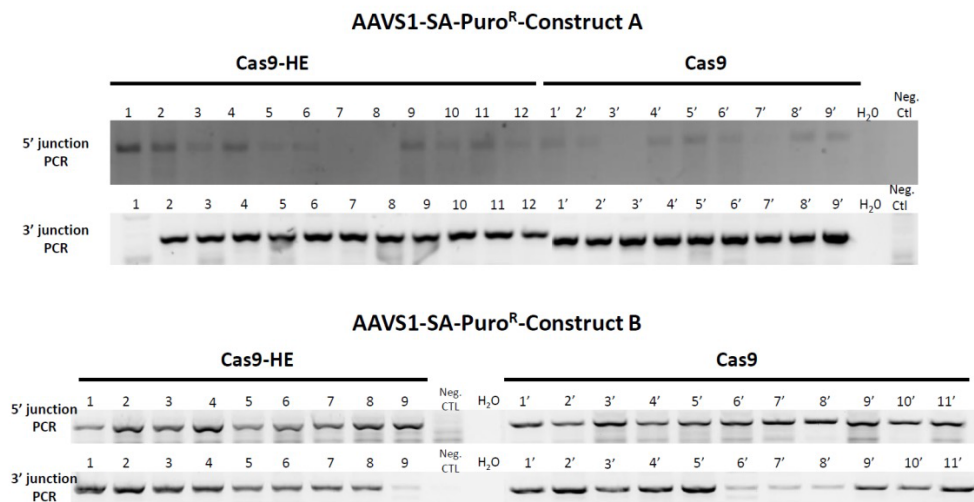
A) Schematic diagram of the HE domain, spanning aa 1 to 296 of CtIP, showing the different mutants that have been tested for their ability to stimulate HDR. Various sequence features of CtIP, including tetramerization and dimerization domains, L27 needed for tetramerization and CDK phosphorylation sites S233, T245 and S276, are indicated.

B) CDK phosphorylation sites are essential for HDR stimulation by the HE domain in HEK293 cells.

C) L27E mutation does not significantly impair activity of the HE domain in HEK293 cells.

D) CDK phosphorylation and L27 are essential for HDR stimulation by the HE domain in HCT116 cells.

Human HEK293 or HCT116 cells were transfected with the indicated plasmids expressing Cas9 or Cas9-HE derivatives, T2 guide RNA plasmid and GFP transgene donor with homology arms to the targeted AAVS1 locus. HDR-mediated transgene integration was measured by FACS analysis of GFP-positive cells resulting from targeted GFP transgene integration. Indels at the cleavage site were measured by the T7E1 assay. Results are expressed as mean of relative HDR or indels frequencies calculated by normalizing every HDR or indels frequency by that induced by Cas9 respectively. Asterisks indicate that difference is statistically significant when comparing Cas9-CtIP or Cas9-HE derivatives to Cas9 in non-parametric t-test (*, $P < 0.05$, **, $P < 0.005$ or ***, $P < 0.0005$). Data in B, C and D are each from 4 independent experiments. Relative expression levels of Cas9 and Cas9-HE derivatives were analyzed by western blot using anti-Cas9 and control anti-tubulin antibodies.



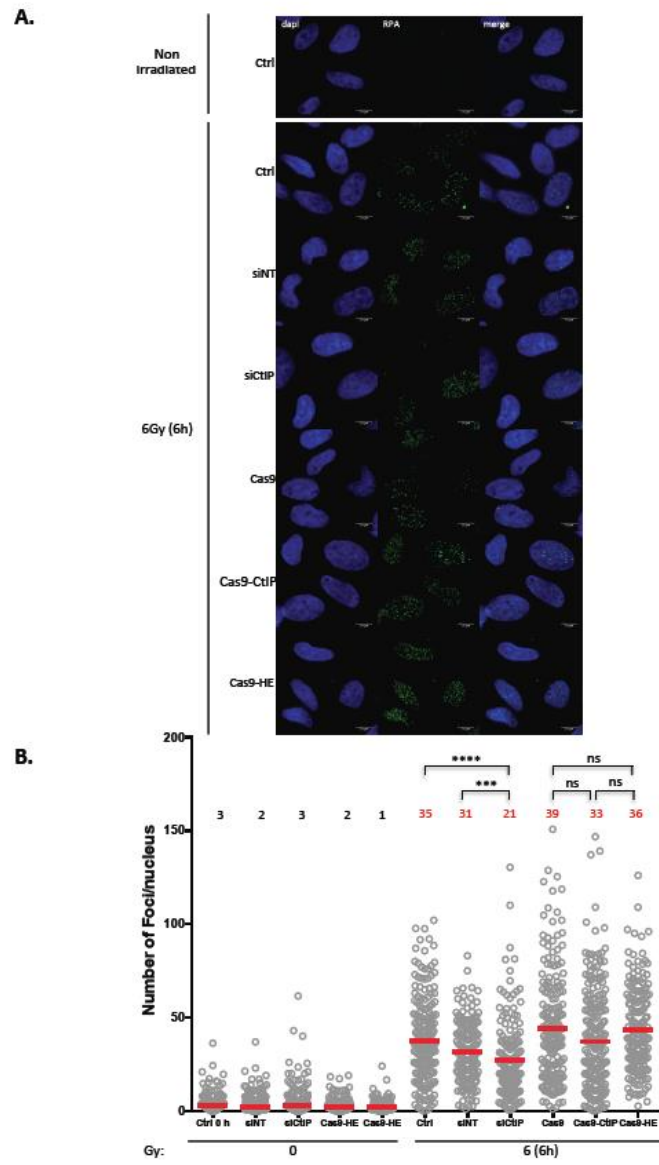
Supplementary Figure 3. Genome editing in iPS cells at the AAVS1 locus with Cas9-HE vs Cas9.

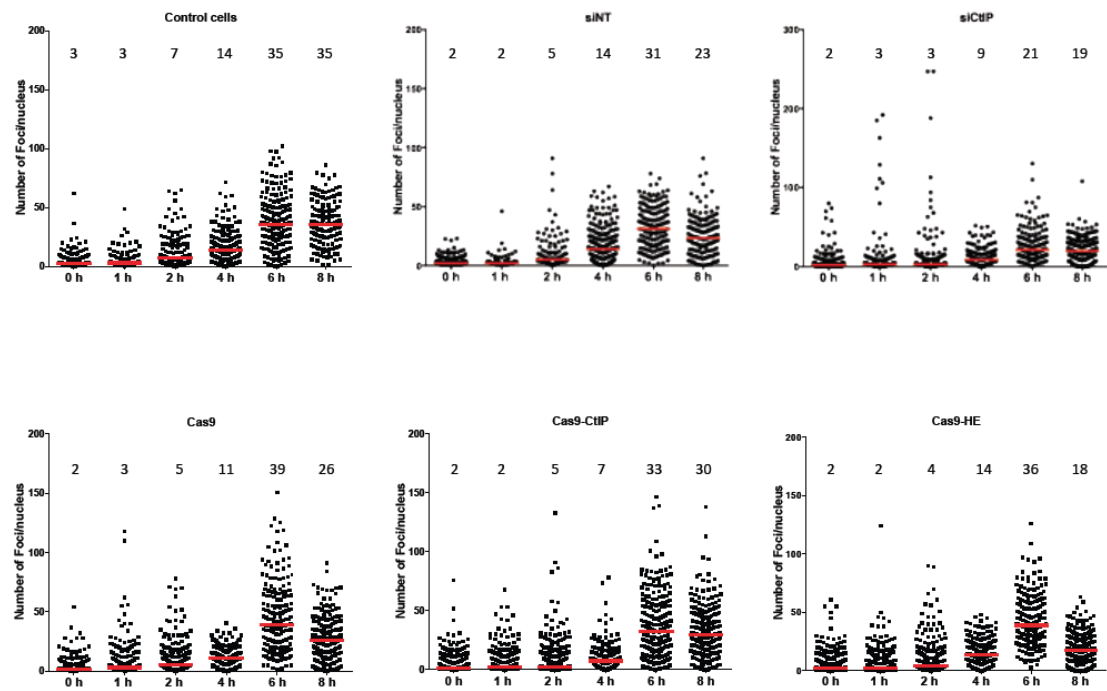
Human iPS cells were transfected with Cas9-HE, T2 guide RNA and puromycin-resistance transgene donors A (used in Figure 4) or B. After selection with puromycin, resistant colonies were expanded and analyzed for targeted integration by PCR analysis. The integration of the transgene was detected by junction PCR. Note, however, that Southern blotting would be needed to potentially reveal complex transgene integration patterns.

The two donor constructs were derived from the GFP donor plasmid used in Figures 1 to 3, replacing the SA-GFP-polyA cassette from (DeKolver et al., 2010) with a SA-Puro^R-polyA cassette and adding an independent transgene, A or B with a fluorescent Cherry reporter driven by a tissue-specific promoter.

A) For construct A, targeted integration of the transgene gives rise to a 931bp band for the 5' junction and to 890bp band for the 3' junction. 75% of the clones edited with Cas9-HE were correctly engineered while 89% of those generated with Cas9 were positive for targeted transgene integration.

B) For construct B, targeted integration of the transgene gives rise to a 931bp band for the 5' extremity and to 887bp band for the 3' end. 100% of the clones edited with Cas9-HE or with Cas9 were positive for targeted integration of the transgene.





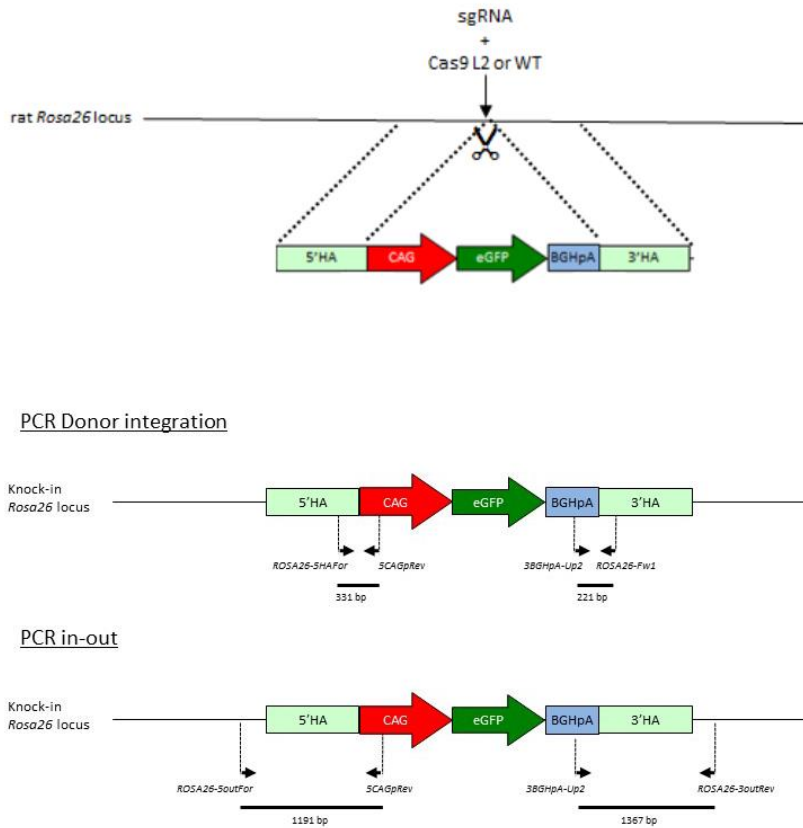
Supplementary Figure 4. RPA foci formation after X-ray irradiation

RPA foci were counted in control cells and at different times after X-ray irradiation in RG37 cells transfected with the indicated Cas9 fusions or anti-CtIP siRNA or control siRNA. Counts of RPA foci per nucleus are cumulated from three independent transfection experiments.

A) Detection of RPA foci by immunostaining with anti-RPA antibody (green) and counterstaining with DAPI (blue).

B) Counts of RPA foci per nucleus are shown at 6 hours after irradiation, which corresponds to the peak of RPA foci per nucleus after irradiation (see full kinetics data in section C). Median number of foci per nucleus is indicated as a red bar, the values on the graph. Silencing CtIP expression diminished RPA foci number per cell compared to control cells and cells transfected with control siRNA (***, $p < 0.0005$; ****, $p < 0.0001$, nonparametric Mann-Whitney t-test) as expected while no difference was found between cells with Cas9, Cas9-CtIP or Cas9-HE.

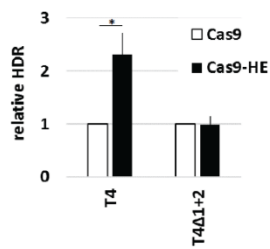
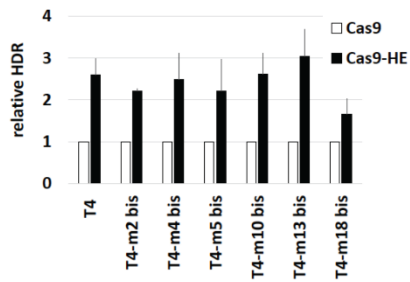
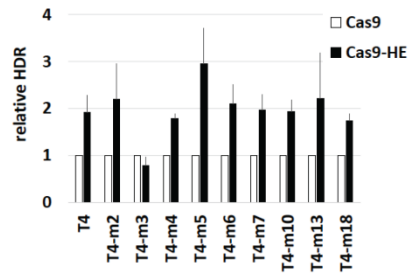
C) Counts of RPA foci per nucleus are shown at the indicated times after irradiation. Median number of foci per nucleus is indicated as a red bar, the values on the graph.



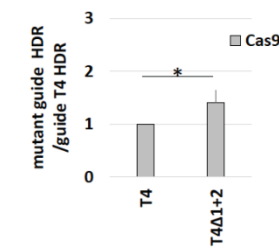
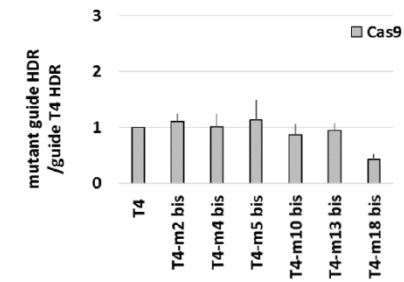
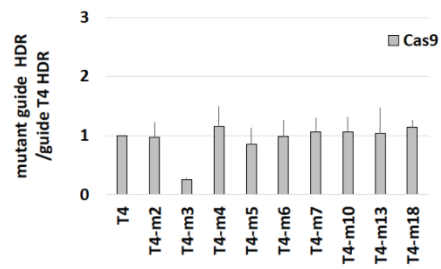
Supplementary Figure 5. PCRs performed to genotype rat embryos following microinjection into rat eggs.

The schematic (lower panel) shows the two types of PCRs used to genotype E14 rat embryos : (i) to analyze whether the insertion has occurred into the *Rosa26* locus as expected at both 5' and 3' extremities, "in-out PCR" were performed with an primer internal to the transgene sequence and a primer corresponding to genomic sequences that are beyond the homology arms of the donor sequence (ROSA26-5outFor and ROSA26-3outRev) (ii) to analyze for donor integration, random or targeted, only primers internal to the donor were used. PCRs using primers rROSAfw1 and rROSArev1 allowed to identify embryos with no donor DNA insertion but with indels at the guide RNA target sequence. A similar PCR strategy was used to analyze donor integration at the *Il22bp* locus. PCR primer sequences are given in supplementary Table 1.

A



B



C

	guide sequence	PAM
T4	GACAGAAAAGCCCCATCCTT	AGG
T4-m2	GtCAGAAAAGCCCCATCCTT	AGG
T4-m3	GAAAGAAAAGCCCCATCCTT	AGG
T4-m4	GACcGAAAAGCCCCATCCTT	AGG
T4-m5	GACaA AAAAGCCCCATCCTT	AGG
T4-m6	GACAGcAAAGCCCCATCCTT	AGG
T4-m7	GACAGAtAAGCCCCATCCTT	AGG
T4-m10	GACAGAAAaCCCCATCCTT	AGG
T4-m13	GACAGAAAAGCcTATCCTT	AGG
T4-m18	GACAGAAAAGCCCCATCgTT	AGG
T4-m2 bis	GcCAGAAAAGCCCCATCCTT	AGG
T4-m4 bis	GACTGAAAAGCCCCATCCTT	AGG
T4-m5 bis	GACAcAAAAGCCCCATCCTT	AGG
T4-m10 bis	GACAGAAAacCCCCATCCTT	AGG
T4-m13 bis	GACAGAAAAGCCgCATCCTT	AGG
T4-m18 bis	GACAGAAAAGCCCCATCaTT	AGG
T4Δ1+2	CAGAAAAGCCCCATCCTT	AGG

D

HDR frequencies

	exp. n1		exp. n2		exp. n3	
	Cas9	Cas9-HE	Cas9	Cas9-HE	Cas9	Cas9-HE
T4	4.4	6.7	3.4	7.5	13.3	27.2
T4-m2	3.1	9.5	3.4	6.4	15.9	26.3
T4-m3	1	0.6	0.9	0.8	3.7	3.3
T4-m4	3.8	6.8	5.2	8.7	14.2	26.8
T4-m5	2.6	9.5	2.7	8.2	15.3	32.9
T4-m6	3	6.2	3.6	9.1	16.2	27.9
T4-m7	4	9.1	3.2	6.4	17.8	28.9
T4-m10	3.8	8.4	3.4	6.4	17.7	30
T4-m13	2.5	8.3	3.9	7	18.7	28.8
T4-m18	4.6	7.5	4.3	7.3	14.9	28.3

Indel frequencies

	exp. n1		exp. n2		exp. n3	
	Cas9	Cas9-HE	Cas9	Cas9-HE	Cas9	Cas9-HE
T4	11.3%	7.2%	3.2%	3.1%	14.1%	9.4%
T4-m2	12.5%	12.8%	6.8%	4.4%	17.8%	19.7%
T4-m3	3.9%	2.1%	3.3%	0.7%	5.3%	2.4%
T4-m4	12.2%	12.6%	8.1%	7.7%	18.6%	17.0%
T4-m5	14.5%	12.8%	6.2%	5.1%	17.6%	16.5%
T4-m6	15.6%	9.8%	6.7%	6.0%	18.6%	18.2%
T4-m7	15.4%	11.3%	5.0%	5.7%	20.2%	18.2%
T4-m10	16.3%	9.5%	4.0%	5.1%	22.7%	19.5%
T4-m13	15.1%	12.6%	5.7%	3.6%	21.6%	19.0%
T4-m18	14.8%	9.2%	5.5%	4.7%	14.0%	13.8%

	exp. n1		exp. n2		exp. n3	
	Cas9	Cas9-HE	Cas9	Cas9-HE	Cas9	Cas9-HE
T4	10.8	25	6.7	20.4	2.4	5.8
T4-m2 bis	10.6	22.7	7.3	16.1	3	6.8
T4-m4 bis	8.4	26.9	6.7	15	3	6.1
T4-m5 bis	9.6	27.2	6.5	15.8	3.7	5.1
T4-m10 bis	7	22.2	6.7	14.7	2.3	5.7
T4-m13 bis	10.9	29.8	7	18.1	1.9	7.2
T4-m18 bis	4.1	6.6	2.4	4.9	1.3	1.7

	exp. n1		exp. n2		exp. n3	
	Cas9	Cas9-HE	Cas9	Cas9-HE	Cas9	Cas9-HE
T4	20.2%	14.3%	8.7%	8.5%	16.7%	11.9%
T4-m2 bis	23.0%	12.2%	10.0%	7.4%	19.5%	12.3%
T4-m4 bis	22.7%	25.2%	12.2%	8.8%	22.1%	15.6%
T4-m5 bis	25.8%	19.9%	10.0%	9.7%	21.8%	15.8%
T4-m10 bis	14.7%	12.5%	7.6%	7.6%	15.7%	11.4%
T4-m13 bis	23.0%	22.9%	11.8%	9.4%	18.7%	16.2%
T4-m18 bis	4.5%	2.6%	2.7%	1.8%	4.4%	2.5%

HDR frequencies

	exp. n1		exp. n2		exp. n3		exp. n4		exp. n5		exp. n6	
	Cas9	Cas9-HE	Cas9	Cas9-HE	Cas9	Cas9-HE	Cas9	Cas9-HE	Cas9	Cas9-HE	Cas9	Cas9-HE
T4	10.8	25	6.7	20.4	2.4	5.8	3.7	6.9	1	2.1	4.5	9.5
T4Δ1+2	14	15.4	9.3	10.9	4	4.4	3.9	3.6	1.7	1.4	5.8	4.6

Indel frequencies

	exp. n1		exp. n2		exp. n3		exp. n4		exp. n6	
	Cas9	Cas9-HE	Cas9	Cas9-HE	Cas9	Cas9-HE	Cas9	Cas9-HE	Cas9	Cas9-HE
T4	20.0%	14.0%	8.7%	8.5%	16.7%	11.9%	18.1%	13.7%	9.5%	6.0%
T4Δ1+2	21.0%	13.0%	12.8%	7.5%	20.9%	14.3%	22.8%	14.0%	8.5%	3.5%

Supplementary Figure 6 Analysis of guide RNA T4 sequence involved in HDR stimulation

Human HEK293 cells were transfected with the indicated mutants of guide RNA T4, Cas9 or Cas9-HE and a GFP transgene donor with homology arms to the AAVS1 targeted locus. HDR-mediated transgene integration was measured by FACS analysis of GFP-positive cells resulting from targeted GFP transgene integration. Indels were measured by the T7 assay. The sequence of mutants tested is indicated in section C (the name of the mutant corresponds to the position of the mutation in the guide RNA sequence).

A) Relative frequencies of HDR induced by Cas9-HE were compared to those induced by Cas9 with the indicated mutants of guide RNA T4. Results are expressed as mean of relative HDR calculated by normalizing every HDR by that induced by Cas9. The data represented is from 3 independent experiments and raw experimental results are provided in section D here below.

B) Impact of guide RNA mutations on HDR with Cas9. Results are expressed as mean of relative HDR calculated by normalizing every HDR by that induced by guide RNA T4.

C) Sequence of mutants of guide RNA T4. Mutants are named according to the position of the mutation in the guide RNA sequence. Substitutions were chosen based on systematic studies of guide RNA mutations (Doench et al., 2016) that predicted either little impact on indel frequency (T4-m2 to T4-m18 mutants) or a stronger impact (T4-m2 bis to T4-m18 bis).

D) Raw data of HDR frequency (GFP-positive cells resulting from targeted GFP transgene integration) and indel frequency (as measured by the T7 assay).

A

Target	Cas9 form	number of G418-resistant colonies			
		exp.n1	exp.n2	exp.n3	exp.n4
ATF4	Cas9	177	151	95	70
	Cas9-HE	332	388	300	160
GABP	Cas9	1200	650	1264	2176
	Cas9-HE	1540	600	1008	2500
TGIF2	Cas9	not tested	118	402	1188
	Cas9-HE	"	367	650	2224
RAD21	Cas9	"	216	600	260
	Cas9-HE	"	586	1000	840
CREB	Cas9	"	410	244	2200
	Cas9-HE	"	444	480	2950

B

HDR frequencies

	exp. n1		exp. n2		exp. n3		exp. n4		exp. n5	
	Cas9	Cas9-HE	Cas9	Cas9-HE	Cas9	Cas9-HE	Cas9	Cas9-HE	Cas9	Cas9-HE
T2	0.8	1.6	0.2	0.2	4.3	8.3	3.3	5.3	0.5	1
T4	2.7	5.8	0.9	2	8.6	16.1	7.6	15.3	1.1	2.8
D1	1.2	2.6	0.3	0.4	4.2	9	7	9.2	0.9	1.4
D2	5.7	4.2	1.3	0.7	11.6	8.6	12	7.8	1.9	1.3
D3	6	4.5	1	0.6	11	9.1	9.3	11.6	2.3	1.3

Indel frequencies

	exp. n1		exp. n2		exp. n3		exp. n4		exp. n5	
	Cas9	Cas9-HE	Cas9	Cas9-HE	Cas9	Cas9-HE	Cas9	Cas9-HE	Cas9	Cas9-HE
T2	11.8%	16.1%	1.6%	2.0%	13.2%	16.6%	20.8%	18.5%	16.5%	17.8%
T4	12.4%	9.2%	2.3%	2.7%	3.1%	8.3%	18.9%	20.5%	18.7%	13.1%
D1	8.8%	10.5%	1.4%	4.9%	18.5%	14.9%	28.0%	18.7%	15.6%	15.0%
D2	11.5%	6.3%	5.8%	4.5%	18.2%	8.6%	30.8%	22.6%	16.9%	9.9%
D3	11.2%	10.5%	3.9%	5.1%	19.6%	14.4%	28.4%	31.3%	20.0%	14.7%

Supplementary Figure 7 Raw data from experiments reported in Figure 5 is given here.

A) HDR frequencies induced by Cas9-HE were compared to those induced by Cas9 at 5 different target genes in HEK293 cells using previously published guide RNAs and donor plasmids (Savic et al., 2015). Targeted integration of donor plasmid results in in frame-insertion of E2A-neoR cDNA (Savic et al., 2015). G418(neomycin)-resistant colonies were counted after Cresyl violet staining to measure HDR-mediated events and the number of G418-resistant colonies is given here for each experiment. Data is from 3 independent experiments for TGIF2, RAD21, and CREB genes and from 4 for ATF4 and GABP genes.

B) HDR and indel frequencies induced by Cas9-HE were compared to those induced by Cas9 with the indicated guide RNAs, which all target cleavage to a small 50 bp region of the AAVS1 locus, and a common p84Δ donor plasmid, harboring approximately 800 bp homology arms. P84Δ was derived from the p84 donor plasmid depicted in Fig1A by shortening the homology arms so that they would not be cleaved by any of the guide RNAs. Data represented is from 5 independent experiments. The HDR and indel frequencies (corresponding to the percentage of GFP-positive cells and indel frequencies measured with the T7 assay respectively) are given

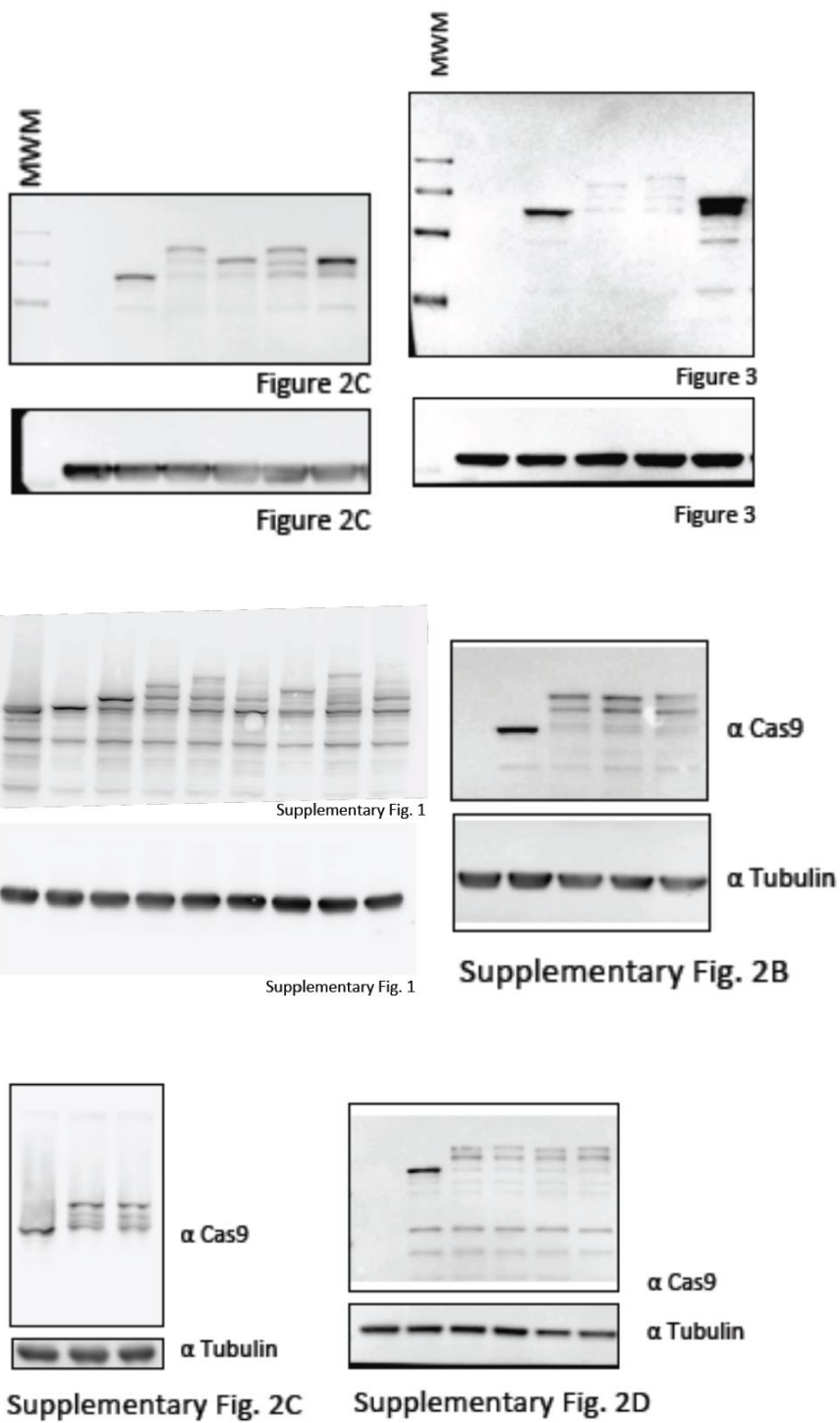
here without the normalization that was performed to represent data in Figure 5B. Absolute levels of HDR and indel frequencies varied significantly between independent replicate experiments shown here. This variation appeared to be influenced at least in part by cotransfection efficiency. Transfection efficiency was measured in parallel by transfection of GFP expression plasmid into cells of an independent well (GFP-positive cells measured by FACS: exp.n1, 93%; n2, 75%; n3, 99%; n4, 99%, n5,86%). We noted that in the data of the table in 5B, the highest HDR frequencies obtained for each guide with Cas9 or Cas9-HE (exp. n3 and n4) corresponded to the highest transfection efficiencies (99% GFP positive cells). Higher transfection efficiencies are likely important for most efficient cotransfection of all three plasmids (which is a prerequisite for HDR to take place). Other parameters may come into play such as cell cycle stage or specific optimization of the donor construct to each guide RNA cleavage site but were not investigated.

Primers for analysis of ROSA locus targeting	5'-3' Sequence
<i>NHEJ detection</i> rROSAfw1 rROSArev1	TGAACTGTGAATAGGCCCAAGTG GCATTTTAAAAGAGCCCAGTACTCA
<i>Donor insertion</i> GFP Up GFP Lo3	CCTCGTGACCACCTGACCT TCCATGCCGAGAGTGATCCC
<i>In/out PCR</i> rROSA26-5outFor 5CAGpRev 3BGHpA-Up2 rROSA26-3outRev	TCCCACCCTCCCCTTCCTCT GGCTATGAACTAATGACCCCGTAAT CCAGATTTTTCCTCCTCTCCTG TGGGTATCACTGGCTGTCCTAGATA

Primers for analysis of IL22BP locus targeting	5'-3' Sequence
<i>NHEJ detection</i> Up2 64-rIL22bp Lo2 64-rIL22bp	CCATCCAGGAGACATCCTGTGGCGCA CCAGGCTGGCCCTAAAGACAGA
<i>Donor insertion</i> GFP Up GFP Lo3	CCTCGTGACCACCTGACCT TCCATGCCGAGAGTGATCCC
<i>In/out PCR</i> rIL22BP5HAOutFor GFP Lo3 GFP Up rIL22BP5HAOutRev	AAGCTCCTTCTGTCATTACTIONGCCT TCCATGCCGAGAGTGATCCC CCTCGTGACCACCTGACCT ACCCTTCCAGCATGTTCTTCC

Supplementary table 1.

Primers for PCR analysis of transgene integration at the ROSA and IL22BP loci in rat.



Supplementary Figure 8. Uncropped western blots.

Discussion

Au cours de cette discussion, je vais, dans un premier temps, revenir sur les principaux résultats que nous avons obtenus avec nos expériences de surexpression de *KCNJ2* et *CASQ2* dans les hiPSC-CMs. Dans un second temps, je vais discuter des limites de notre étude et proposer différentes expériences qui pourraient être réalisées pour approfondir la caractérisation de la maturation des hiPSC-CMs. Dans un troisième temps, je proposerai différentes stratégies pour améliorer la maturation des hiPSC-CMs, avec notamment une approche originale d'activation ectopique des gènes sous-exprimés dans les hiPSC-CMs par rapport au CMs adultes. Enfin, je discuterai de l'importance de continuer à améliorer la maturation des hiPSC-CMs, en particulier dans le cadre des études précliniques de toxicité cardiaque.

I. Stimulation de la maturation par co-expression des gènes *KCNJ2* et *CASQ2*

Nous avons généré des hiPSC-CMs qui expriment de manière stable et inducible *KCNJ2*, *CASQ2* ou les deux gènes simultanément pour déterminer si la co-expression de ces deux gènes améliore davantage la maturation, au moins sur le plan électrophysiologique, des hiPSC-CMs produits *in vitro* par rapport à ce qui a déjà été décrit et évaluer l'intérêt de la co-oexpression des transgènes pour des applications en toxicologie prédictive.

Nous avons confirmé que les hiPSC-CMs qui exprimaient *KCNJ2*, ainsi que les hiPSC-CMs qui exprimaient conjointement *KCNJ2* et *CASQ2* (art. 1, Figure 2B et 2C), disposaient d'un RMP hyperpolarisé avec des valeurs proches de celles rapportées dans les CMs adultes humains (Magyar et al., 2000). Nous avons également vérifié que les courbes Intensité-Voltage des hiPSC-CMs exprimant *KCNJ2* ainsi que ceux exprimant *KCNJ2* et *CASQ2* étaient identifiables par la forme en « N » typique de la rectification entrante du canal Kir2.1 (art. 1, Figure 2D et 2E). Ainsi, les deux clones présentaient des durées de PA réduites, ce qui leurs permettait notamment de suivre des fréquences de stimulation allant jusqu'à 4Hz (art. 1, Figure 3B). Dans la mesure où le courant I_{K1} est impliqué dans la phase de fin de la repolarisation, une réduction des APD80 dans les deux lignées d'hiPSC-CMs exprimant *KCNJ2* étaient attendue. Nous avons également observé

une diminution des APD50 (art.1, Figure 3A), comme cela avait été rapporté dans des CMs de cochon d'Inde transduits avec un adénovirus exprimant Kir2.1 (Miake et al., 2003). Cependant, nous n'avons pas d'explication pour la réduction des APD20 dans les hiPSC-CMs exprimant KCN2 ou KCNJ2 et CASQ2 simultanément. De plus, les densités de courant I_{K1} sortant de ces deux clones étaient supérieures à celles observées dans des CMs ventriculaires adultes (art. 1, Figure 2E). Une hypothèse pour expliquer cette différence avec les CMs ventriculaires adultes pourrait être le fait que les niveaux d'expression du canal Kir2.1 dans les hiPSC-CMs transgéniques étaient trop élevés avec la dose de doxycycline utilisée (2 μ g/ml). Nous avons établi cette dose de manière empirique en nous basant sur l'observation de l'arrêt des battements spontanés des hiPSC-CMs exprimant KCNJ2 lorsque la concentration de doxycycline était comprise entre 1 μ g et 2 μ g. Avec du recul, il aurait été plus judicieux d'essayer de trouver une dose de doxycycline induisant une expression de Kir2.1 qui génère des niveaux de courants sortants identiques à ceux observés dans les hiPSC-CMs adultes.

Par ailleurs, nous avons confirmé qu'une induction de l'expression de la CASQ2 conduisait à une augmentation de l'amplitude de relargage du Ca^{2+} à la suite du traitement par la caféine. De façon intéressante, cette augmentation est plus forte lorsque *KCNJ2* et *CASQ2* sont co-exprimées (art 1, Figure 4B). Ce résultat suggère que la co-expression des deux protéines augmente le contenu calcique du SR à des niveaux plus élevés qu'avec la surexpression de *CASQ2* seule. Dans de telles conditions, il est plausible que des libérations spontanées et rythmiques de Ca^{2+} puissent se produire dans les hiPSC-CMs surexprimant *KCNJ2* et *CASQ2*, activant alors le mode dépolarisant de la pompe NCX, ce qui entrainerait l'activation des canaux sodiques et ainsi l'induction d'une faible activité de battements spontanés.

De plus, nous avons montré que la pente associée au courant sodique dans les potentiels de champs extracellulaire était significativement augmentée dans les hiPSC-CMs exprimant *KCNJ2* et *CASQ2* (art.1, Figure 5D) ce qui suggère que l'expression simultanée des deux protéines augmente l'activité des canaux sodiques. De manière inattendue, nous avons constaté que la surexpression de la *CASQ2* dans les hiPSC-CMs conduisait à une diminution de l'amplitude et de la pente relative à l'activité des canaux sodiques (art.1, Figure 5C et 5D). Nous n'avons pas d'hypothèse pouvant expliquer cette observation.

Ainsi, le fait d'exprimer conjointement *KCNJ2* et *CASQ2* dans les hiPSC-CMs récapitule dans une cellule unique les bénéfices de l'expression de chacune de ces protéines. De plus, nos résultats suggèrent que cette co-expression améliore davantage les

propriétés électrophysiologiques (avec une augmentation de l'activité des canaux Na^+) et la gestion du calcium (avec une augmentation du relargage du Ca^{2+} par le SR) par rapport aux cellules qui expriment individuellement *KCNJ2* ou *CASQ2*.

Le fait d'exprimer *KCNJ2* a rendu les hiPSC-CMs totalement quiescents (clone *KCNJ2*) ou a diminué très significativement leur activité spontanée (clone *KCNJ2-CASQ2*) (art. 1, Figure 2A). L'absence d'activité contractile pouvant être dommageable pour la structure et la machinerie contractile des hiPSC-CMs (Lieu Deborah K. et al., 2013), nous avons développé une approche optogénétique pour stimuler les cellules à court et long terme. Pour ce faire, nous avons généré une lignée cellulaire HEK-293T exprimant la Channelrhodopsine-2 (appelée ChR2-HEK). Nous avons privilégié cette approche par rapport à une expression de ChR2 directement dans les hiPSC-CMs dans la mesure où des études ont décrit que l'expression de ChR2 ralentissait la différenciation cardiaque dans les hiPSC-CMs (Lemme et al., 2019) et entraînait une diminution de la viabilité des CMs chez le rat (Q. Li et al., 2017). Nous avons cultivé les ChR2-HEK avec les hiPSC-CMs et confirmé, après stimulation de ChR2 par la lumière, l'activité de jonctions électriques fonctionnelles entre les cellules ChR2-HEK et les hiPSC-CMs (art. 1, figure 5B). Nous avons ainsi pu stimuler nos lignées d'hiPSC-CMs à différentes fréquences sans noter d'effets indésirables sur la viabilité des cellules. Les cellules HEK-ChR2 offrent l'intérêt de pouvoir stimuler les clones hiPSC-CMs sur une longue période de temps. Ainsi, cette méthode de stimulation pourrait permettre d'améliorer la maturation d'autres propriétés cardiaques, en particulier les propriétés ultrastructurales et la force de contraction, comme l'ont montré des études précédentes avec la stimulation électrique d'hiPSC-CMs (Lieu Deborah K. et al., 2013; Ronaldson-Bouchard et al., 2018).

Cette étude avait également pour objectif de d'évaluer s'il était possible de générer des modèles complémentaires aux hiPSC-CMs utilisées dans le cadre du CIPA pour les essais précliniques de sécurité des médicaments. En effet, même si la majorité des courants présents dans les CMs ventriculaires adultes sont retrouvés dans les hiPSC-CMs, l'électrophysiologie de ces cellules est considérée comme immature du fait entre autres de leur automaticité, de leur RMP moins hyperpolarisé et de leur pente de dépolarisation réduite (Garg et al., 2018a). Les acteurs de la pharmacologie de sécurité des médicaments considèrent que les hiPSC-CMs auront un rôle important pour l'évaluation des risques arythmogènes lorsque ces cellules auront atteint un degré de maturité qui récapitule l'électrophysiologie adulte (Gintant et al., 2016). C'est dans cette optique que nous avons voulu évaluer si nos hiPSC-CMs génétiquement modifiés pouvaient être utiles pour la pharmacologie de sécurité.

Ainsi, lorsque les cellules étaient traitées avec l'inhibiteur du canal hERG E-4031, à la dose de 1 μ M, nous avons détecté une augmentation d'évènements arythmiques d'un facteur 2,76 avec les hiPSC-CMs qui exprimaient simultanément *KCNJ2* et *CASQ2* par rapport aux cellules contrôles (art. 1, Figure 7E). Ceci peut s'expliquer par le fait que certains inhibiteurs du canal hERG ont un effet dit *reverse use-dependent* sur la repolarisation, leurs effets inhibiteurs étant d'autant plus efficaces que le rythme cardiaque est lent (Hondeghem and Snyders, 1990). Ainsi, l'absence d'activité spontanée des hiPSC-CMs exprimant *KCNJ2* ou bien la faible activité spontanée des hiPSC-CMs coexprimant *KCNJ2* et *CASQ2* présentent un intérêt pour la pharmacologie de sécurité car les hiPSC-CMs courantes (par exemple celles disponibles commercialement) ont une fréquence de battements rapide du fait de leur automaticité et il n'est pas possible de leur imposer un rythme plus lent (via stimulation électrique ou optogénétique). De ce fait, nos lignées transgéniques pourraient être stimulées à des fréquences similaires à celles retrouvées dans les bradycardies, cela permettant alors de mieux détecter les potentiels effets pro-arythmiques d'inhibiteurs de canaux potassiques.

Enfin, nous avons montré que les hiPSC-CMs exprimant *KCNJ2* ou coexprimant *KCNJ2* et *CASQ2* pouvaient être stimulées à des fréquences élevées, allant jusqu'à 4Hz (art.1, Figure 3B). Elles pourraient donc permettre de mieux évaluer les risques liés aux molécules qui ont un effet dit *use-dependent* (avec un effet inhibiteur proportionnel à la fréquence de stimulation ou d'utilisation). Une autre application potentielle serait une meilleure détection des bloqueurs des canaux Na⁺. En effet, il est actuellement difficile d'identifier les bloqueurs des canaux Na⁺ à l'aide des hiPSC-CMs commerciales (Qu and Vargas, 2015) tandis que nous avons constaté que les hiPSC-CMs exprimant *KCNJ2* et *CASQ2* présentaient une sensibilité significativement améliorée à la lidocaïne, un bloqueur typique des canaux Na⁺ (art.1, Figure 7B).

II. Limites des modèles développés et expériences complémentaires

Des expériences complémentaires permettraient de consolider notre étude. Par exemple, afin d'augmenter la puissance statistique de nos expériences visant à évaluer l'intérêt de la coexpression des transgènes pour des applications en toxicologie prédictive, il faudrait répéter les expérimentations avec les différentes molécules utilisées (en particulier art.1, Figure 7).

Afin d'approfondir la caractérisation de ces hiPSC-CMs génétiquement modifiés, il aurait été intéressant d'évaluer par des analyses transcriptomiques si la surexpression de *KCNJ2* et *CASQ2* augmentait l'expression des autres canaux ioniques (comme Nav1.5) et des autres acteurs de la gestion du calcium (comme la TRD-1 ou la JN) qui sont faiblement exprimés dans les hiPSC-CMs non modifiés (Lee et al., 2011; van den Heuvel et al., 2014).

Par ailleurs, il aurait été intéressant d'évaluer les bénéfices de l'expression simultanée des deux transgènes sur les autres caractéristiques du PA. En effet, une modélisation *in silico* a suggéré que l'expression d' I_{K1} dans des hiPSC-CMs conduirait à des PAs ayant une morphologie de type adulte avec notamment une augmentation significative de l'amplitude et de la pente de dépolarisation (Bett et al., 2013). En pratique, il ne nous était cependant pas possible de stimuler les hiPSC-CMs lors des expériences de Patch-Clamp.

Il aurait aussi été intéressant d'évaluer les cinétiques des courants transitoires calciques. En effet, Vaidyanathan et ses collègues ont observé une augmentation de l'amplitude des courants transitoires calciques dans les hiPSC-CMs surexprimant Kir2.1 lors de leurs stimulations électriques à 0,5 Hz et 1,0 Hz (Vaidyanathan et al., 2016) tandis que Liu et ses collaborateurs ont également décrit une augmentation de l'amplitude et des cinétiques (*V_{max upstroke}* et *V_{max decay}*) des courants transitoires calciques dans les hESC-CMs exprimant la *CASQ2* lors d'une stimulation électrique à 0,5 Hz (Liu et al., 2009). Cependant, pour des raisons techniques (la mesure des fluctuations calciques avec la sonde Cal520 n'étant pas possible lors de la stimulation électrique avec le FDSS/ μ Cell), nous n'avons pas été en mesure d'évaluer l'amplitude et les cinétiques des transitoires calciques lorsque nos cellules étaient stimulées électriquement à une fréquence imposée.

Enfin, il aurait été intéressant d'examiner si l'augmentation du relargage de Ca^{2+} dans les hiPSC-CMs coexprimant *KCNJ2* et *CASQ2* se traduisait par un bénéfice sur la cinétique ou la force de contraction mais les méthodes nécessaires (par exemple, l'analyse du déplacement de micro-billes et le marquage fluorescent des myofibrilles pour quantifier la longueur des sarcomères lors des contractions (Ribeiro et al., 2017)) sont difficiles à mettre en œuvre et n'ont pas été développées au cours de notre étude.

III. Approches complémentaires pour augmenter la maturation des hiPSC-CMs

Dans le cadre de notre étude, nous avons eu recours à l'édition du génome avec le système CRISPR/Cas9 pour insérer deux transgènes permettant d'induire l'expression de *KCNJ2* et *CASQ2*, impliqués respectivement dans les propriétés électrophysiologiques et la gestion du calcium des hiPSC-CMs. L'analyse transcriptomique montre que de nombreux autres gènes sont sous-exprimés dans les hiPSC-CMs par rapport aux CMs adultes. Il pourrait donc être très intéressant de pouvoir stimuler simultanément l'expression de nombreux gènes clés de la maturation. Pour ce faire, une variante du système CRISPR/Cas9, appelée CRISPRa pour CRISPR *activation*, pourrait être utilisée (Maeder et al., 2013). Dans ce système, un mutant inactif de Cas9 (dit *dead* Cas9, avec des mutations inactivant les sites catalytiques des domaines nucléases) est fusionné avec les domaines transactivateurs de la transcription VP64, p65 et rta (Chavez et al., 2015). La protéine de fusion, dite dCas9-VPR, est capable de stimuler la transcription de gènes d'intérêt de manière très efficace en utilisant des ARN guides ciblant le promoteur. Cette variante du système CRISPR/Cas9 présente des avantages pour la surexpression de gènes par rapport à l'approche traditionnelle d'insertion de transgènes. D'une part, pour les gènes qui ont des exons alternatifs, le fait de stimuler la transcription endogène conduit à l'épissage correct, ce qui dispense de sélectionner un isoforme spécifique lors de la surexpression de gène par KI. D'autre part, cette stratégie permet de plus facilement stimuler l'expression de plusieurs gènes en même temps. En effet, des vecteurs lentiviraux ont été développés pour exprimer jusqu'à quatre ARNg différents, ce qui ouvre la possibilité de stimuler simultanément l'expression de quatre gènes endogènes (Kabadi et al., 2014), et nous pourrions envisager d'utiliser plusieurs vecteurs pour stimuler un plus grand nombre de gènes. Il serait possible de stimuler l'expression de régulateurs de l'expression des gènes (comme des facteurs de

transcription, des longs ARNs non codants ou des microRNAs), ce qui permettrait d'activer la transcription de plusieurs gènes impliqués dans des voies de signalisation favorisant la maturation.

Nous avons réalisé des expériences préliminaires pour mettre en place cette approche. Avec l'aide de Litchy Boueya qui était stagiaire dans notre équipe, nous avons testé et validé différents guides permettant de stimuler l'expression de *KCNJ2* et *CASQ2* dans des cellules HEK293T exprimant la dCas9-VPR. En parallèle, nous avons également généré des clones hiPSCs qui expriment la dCas9-VPR de manière inductible. L'étape suivante consisterait à valider la stimulation de l'expression des gènes endogènes *KCNJ2* et *CASQ2* dans les hiPSC-CMs et vérifier si la maturation est ainsi améliorée. Ensuite, il serait alors possible de tester de nouveaux gènes candidats pour induire la maturation des hiPSC-CMs.

Par exemple, l'expression du facteur de transcription *Homeodomain Only-Protein X* (HOPX) est significativement plus élevée dans les CMs ventriculaires adultes que dans les CMs ventriculaires fœtaux et les hPSC-CMs (Miklas et al., 2019). Il a été montré que la surexpression de HOPX dans les hPSC-CMs conduisait à la diminution de l'expression de gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire (ex. *BUB1*, *MKI67*, *CENPE*) et l'élévation de l'expression de gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire (ex. *CDKN1C*). De plus, la surexpression de HOPX menait à l'hypertrophie des cellules ainsi qu'à l'augmentation de l'expression des réseaux de gènes impliqués dans la croissance et la maturation cellulaire (ex. *IGF1*, *MYL2*). Ainsi, la surexpression de HOPX augmentait mécaniquement la taille des CMs en gouvernant la sortie du cycle cellulaire et en induisant leur hypertrophie (Friedman et al., 2018; Miklas et al., 2019). HOPX représente donc une cible de choix pour augmenter la maturation des hiPSC-CMs en stimulant plusieurs voies de signalisation impliquées dans la maturation.

Le gène *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Coactivator 1- α* (*PPARGC1A*) constitue également une cible intéressante. L'expression de *PPARGC1A*, ainsi que celle de ses gènes cibles est plus faible dans les PSC-CMs (humains et murins) en comparaison aux CMs ventriculaires adultes (Poon et al., 2015; Uosaki et al., 2015). *PPARGC1A* code pour le co-activateur transcriptionnel PGC-1 α qui s'associe avec les *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors* (PPARs) et d'autres récepteurs nucléaires afin de contrôler la transcription des gènes du métabolisme énergétique cardiaque adulte (Finck and Kelly, 2006). Dans le cœur adulte, la quasi-totalité de la production d'ATP (> 95%) est dérivée de

la phosphorylation oxydative mitochondriale, le reste étant dérivé de la glycolyse et de la formation de GTP dans le cycle de Krebs. Ainsi, le cœur adulte obtient 50 à 70% de son ATP à partir de la β -oxydation des acides gras (Lopaschuk et al., 2010). Dans les CMs adultes, PGC-1 α s'associe avec PPAR α et *Estrogen-related Receptor α* (ERR α) pour stimuler l'expression des gènes *ACADM* (*acyl-CoA dehydrogenase medium chain*) et *ACADVL* (*acyl-CoA dehydrogenase very long chain*) impliqués respectivement dans la dégradation des acides gras à très longues chaînes et chaînes moyennes (Huss. and Kelly, 2004). De même, PGC-1 α se lie aux facteurs de transcription *Nuclear Respiratory Factor-1 & 2* (NRF-1 et NRF-2) pour activer l'expression de gènes responsables de la biogenèse des mitochondries, de la réplication de l'ADN mitochondrial (comme *TFAM*) et de l'activation de la phosphorylation oxydative (comme *NDUFS1*) (Huss and Kelly, 2004; Wu et al., 1999).

En tirant profit du système lentiviral qui permet d'exprimer quatre guides simultanément, il serait intéressant de stimuler simultanément l'expression des gènes *KCNJ2*, *CASQ2*, *HOPX* et *PPARGC1A* pour améliorer les différents aspects de la maturation des hiPSC-CMs correspondant respectivement à l'électrophysiologie, la gestion du calcium, l'hypertrophie ainsi que la machinerie des myofibrilles et le métabolisme.

De manière plus générale, il serait intéressant de combiner plusieurs stratégies de maturation des hiPSC-CMs. Par exemple, on pourrait imaginer le scénario suivant pour essayer de pousser la maturation. Des hiPSC-CMs exprimant dCa9-VPR de manière inductible pourraient être cultivées avec des cellules Chr2-HEK sur des structures en PDMS recouvertes avec du matrigel. La stimulation optogénétique débuterait au 12^e jour de différenciation et l'intensité de celle-ci augmenterait graduellement afin de permettre le développement de la machinerie contractile (Ronaldson-Bouchard et al., 2018). Le fait d'ensemencer des hiPSC-CMs sur des supports souples tels que le PDMS favoriserait également l'augmentation de la force de contraction. Au bout du 21^e jour de différenciation, la transcription des quatre gènes cités plus haut (*KCNJ2*, *CASQ2*, *HOPX* et *PPARG1CA*) pourrait être stimulée par le biais de la doxycycline. Le milieu de culture serait alors déplété en glucose et enrichi en acides gras pour promouvoir un métabolisme oxydatif en coordination avec l'expression de *PPARGC1A* (Correia et al., 2017). Ainsi, au bout du 35^e jour, la combinaison de ces approches pourrait générer des hiPSC-CMs avec des propriétés, incluant l'électrophysiologie, la gestion du calcium, l'ultrastructure, la machinerie contractile et le métabolisme encore plus proches des CMs adultes.

IV. L'amélioration de la maturité des hiPSC-CMs est nécessaire pour une meilleure prédiction des effets indésirables induits par les médicaments candidats

Le programme CiPA représente un changement de paradigme pour l'évaluation de l'innocuité des médicaments en ne se focalisant plus sur l'approche réductionniste basée sur la seule activité du canal potassique hERG, mais en procédant à une évaluation des risques pro-arythmiques reposant sur l'évaluation de plusieurs canaux ioniques (Sager et al., 2014). Cette méthode permet également de réduire la dépendance aux modèles animaux lors des phases précliniques.

L'utilisation des hiPSC-CMs dans le cadre de cette démarche est particulièrement intéressante pour améliorer la prédiction des risques d'arythmies, y compris celles des Torsades de Pointes. Deux études clés ont étudié le potentiel des hiPSC-CMs pour caractériser les médicaments selon leurs effets pro-arythmiques. Ainsi, Ando et ses collaborateurs ont testé 57 médicaments connus pour leurs propensions à provoquer un risque faible, modéré ou fort de Torsades de Pointes (Ando et al., 2017). Leur système d'évaluation, basé sur le suivi électrophysiologique de la lignée d'hiPSC-CMs iCell® à l'aide du système de microélectrodes MEA (Microelectrode array), a démontré une concordance élevée à classer correctement les médicaments selon leur risque pro-arythmiques comme en témoignent la sensibilité de 81% (vrai positifs / [vrais positifs + faux négatifs]) et la spécificité de 87% (vrais négatifs / [vrai négatifs + faux positifs]) de cet essai. De même, une collaboration internationale a effectué une étude à grande échelle pour évaluer la reproductibilité des essais ayant recours aux hiPSC-CMs dans l'évaluation des effets pro-arythmiques des médicaments. Pour cette étude, deux lignées commerciales (iCell2® (Cellular Dynamics International) et Cor.4U® (NCardia)) ont été évaluées avec les techniques de MEA ainsi que les sondes fluorescentes sensibles au voltage (Blinova et al., 2018). A partir des données récoltées entre les différents laboratoires, deux modèles de régression ont été établis afin de classer 28 molécules selon leurs risques (faible, intermédiaire ou élevé) de provoquer des arythmies. Les paramètres les plus utiles pour ces modèles étaient la capacité d'un médicament à induire des événements de type arythmie « légère » ou « sévère » indépendamment de la concentration utilisée, l'étendue de la prolongation de la durée de repolarisation induite par le médicament à n'importe quelle concentration et l'étendue de l'allongement de la repolarisation induit par le médicament à la C_{max} clinique. Malgré tous ces efforts, il y avait des médicaments qui n'ont pas été

classés dans la catégorie de risque appropriée. Par exemple, la ranolazine et la méxilétine, qui sont des médicaments associés à un faible risque de Torsades de Pointes, ont induit une prolongation significative de la repolarisation et des arythmies dans les hiPSC-CMs, ce qui est anormal pour cette catégorie de médicament. En effet, bien que ces deux molécules bloquent le canal potassique hERG et prolongent l'intervalle QT, elles ne sont pas associées à des risques de générer des Torsades de Pointes car l'inhibition du canal hERG est équilibrée par un blocage important du courant sodique tardif I_{NaL} (Johannesen et al., 2016). Le fait que les hiPSC-CMs non matures possèdent des niveaux d'expression plus faibles des canaux sodiques par rapport aux CMs ventriculaires humains adultes semble contribuer aux effets pro-arythmiques induits par ces deux médicaments dans les hiPSC-CMs (Blinova et al., 2017; Lemoine et al., 2017).

Ainsi, les différences de niveaux de courants dans les hiPSC-CMs, par rapport aux CMs ventriculaires adultes, sont les caractéristiques les plus importantes à améliorer pour permettre une prédiction plus précise du risque de Torsades de Pointes, en particulier pour les médicaments bloquant plusieurs canaux ioniques simultanément. C'est dans cette optique que notre étude visait à améliorer la maturité électrophysiologique des hiPSC-CMs afin que de telles cellules puissent compléter l'arsenal méthodologique pouvant être utilisé dans le cadre du paradigme CiPA. De plus, le fait de combiner plusieurs approches pour améliorer la maturité des différentes caractéristiques des hiPSC-CMs permettrait de mieux évaluer la cardiotoxicité induite par des candidats médicaments sur la structure, la contractilité et le métabolisme énergétique des CMs humains (de Korte et al., 2020).

Par ailleurs, les hiPSC-CMs, de même que tous les autres modèles cellulaires *in vitro*, présentent la limite intrinsèque de ne pas permettre la prédiction des effets hémodynamiques indésirables ou d'autres effets néfastes sur les tissus non cardiaques. Néanmoins, le développement d'organes sur puces (*organ-on-chip*) et de systèmes microphysiologiques à partir d'hiPSC pourrait offrir des opportunités supplémentaires pour évaluer les effets indésirables induits par les médicaments sur le système vasculaire (Cochrane et al., 2019) et les autres tissus (Mathur et al., 2015; Truskey, 2018). Même si l'utilisation des hiPSC-CMs est en adéquation avec la règle des 3R (Réduire, Remplacer, Raffiner) encadrant l'expérimentation animale, ces cellules ne pourront pas écartier complètement le recours à des modèles animaux pour l'évaluation de l'innocuité et de la toxicité cardiovasculaire. Par exemple, les études précliniques animales fournissent des informations précieuses sur la pharmacocinétique des molécules testées.

Pour conclure, le développement de modèles cellulaires pertinents tels que des hiPSC-CMs matures, comme au cours de ce travail, pourrait utilement compléter la stratégie actuelle ICH S7B et contribuer à améliorer la prédiction des risques pro-arythmiques induits par les nouvelles molécules thérapeutiques.

Références Bibliographiques

- Amin, A.S., Tan, H.L., Wilde, A.A.M., 2010. Cardiac ion channels in health and disease. *Heart Rhythm* 7, 117–126. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2009.08.005>
- Acimovic, I., Refaat, M., Moreau, A., Salykin, A., Reiken, S., Sleiman, Y., Souidi, M., Pribyl, J., Kajava, A., Richard, S., Lu, J., Chevalier, P., Skládál, P., Dvořák, P., Rotrekl, V., Marks, A., Scheinman, M., Lacampagne, A., Meli, A., 2018. Post-Translational Modifications and Diastolic Calcium Leak Associated to the Novel RyR2-D3638A Mutation Lead to CPVT in Patient-Specific hiPSC-Derived Cardiomyocytes. *J. Clin. Med.* 7, 423. <https://doi.org/10.3390/jcm7110423>
- Ando, H., Yoshinaga, T., Yamamoto, W., Asakura, K., Uda, T., Taniguchi, T., Ojima, A., Shinkyo, R., Kikuchi, K., Osada, T., Hayashi, S., Kasai, C., Miyamoto, N., Tashibu, H., Yamazaki, D., Sugiyama, A., Kanda, Y., Sawada, K., Sekino, Y., 2017. A new paradigm for drug-induced torsadogenic risk assessment using human iPS cell-derived cardiomyocytes. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 84, 111–127. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2016.12.003>
- Anumonwo, J.M.B., Lopatin, A.N., 2010. Cardiac strong inward rectifier potassium channels. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology, Special Issue: Ion Channels* 48, 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.08.013>
- Anzalone, A.V., Randolph, P.B., Davis, J.R., Sousa, A.A., Koblan, L.W., Levy, J.M., Chen, P.J., Wilson, C., Newby, G.A., Raguram, A., Liu, D.R., 2019. Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature* 576, 149–157. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1711-4>
- Arceci, R.J., King, A.A., Simon, M.C., Orkin, S.H., Wilson, D.B., 1993. Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart. *Mol Cell Biol* 13, 2235–2246. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.4.2235>
- Auer, T.O., Duroure, K., Cian, A.D., Concordet, J.-P., Bene, F.D., 2014. Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated knock-in in zebrafish by homology-independent DNA repair. *Genome Res.* 24, 142–153. <https://doi.org/10.1101/gr.161638.113>
- Avior, Y., Sagi, I., Benvenisty, N., 2016. Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17, 170–182. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.27>
- Baedke, J., 2013. The epigenetic landscape in the course of time: Conrad Hal Waddington's methodological impact on the life sciences. *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences* 44, 756–773. <https://doi.org/10.1016/j.shpsc.2013.06.001>
- Basso, C., Fox, P.R., Meurs, K.M., Towbin, J.A., Spier, A.W., Calabrese, F., Maron, B.J., Thiene, G., 2004. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy causing sudden cardiac death in boxer dogs: a new animal model of human disease. *Circulation* 109, 1180–1185. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000118494.07530.65>
- Bellin, M., Marchetto, M.C., Gage, F.H., Mummery, C.L., 2012. Induced pluripotent stem cells: the new patient? *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13, 713–726. <https://doi.org/10.1038/nrm3448>
- Berg, C.W. van den, Okawa, S., Lopes, S.M.C. de S., Iperen, L. van, Passier, R., Braam, S.R., Tertoolen, L.G., Sol, A. del, Davis, R.P., Mummery, C.L., 2015. Transcriptome of human foetal heart compared with cardiomyocytes from pluripotent stem cells. *Development* 142, 3231–3238. <https://doi.org/10.1242/dev.123810>
- Bergmann, O., Zdunek, S., Felker, A., Salehpour, M., Alkass, K., Bernard, S., Sjöstrom, S.L., Szewczykowska, M., Jackowska, T., Dos Remedios, C., Malm, T., Andrä, M., Jashari, R., Nyengaard, J.R., Possnert, G., Jovinge, S., Druid, H., Frisén, J., 2015.

- Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart. *Cell* 161, 1566–1575. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.026>
- Bett, G.C.L., Kaplan, A.D., Lis, A., Cimato, T.R., Tzanakakis, E.S., Zhou, Q., Morales, M.J., Rasmusson, R.L., 2013. Electronic “expression” of the inward rectifier in cardiocytes derived from human-induced pluripotent stem cells. *Heart Rhythm, Focus Issue: Devices* 10, 1903–1910. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2013.09.061>
- Bhagwan, J.R., Mosqueira, D., Chairez-Cantu, K., Mannhardt, I., Bodbin, S.E., Bakar, M., Smith, J.G.W., Denning, C., 2020. Isogenic models of hypertrophic cardiomyopathy unveil differential phenotypes and mechanism-driven therapeutics. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 145, 43–53. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2020.06.003>
- Birket, M.J., Ribeiro, M.C., Kosmidis, G., Ward, D., Leitoginho, A.R., van de Pol, V., Dambrot, C., Devalla, H.D., Davis, R.P., Mastroberardino, P.G., Atsma, D.E., Passier, R., Mummery, C.L., 2015. Contractile Defect Caused by Mutation in MYBPC3 Revealed under Conditions Optimized for Human PSC-Cardiomyocyte Function. *Cell Reports* 13, 733–745. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.09.025>
- Bizy, A., Guerrero-Serna, G., Hu, B., Ponce-Balbuena, D., Willis, B.C., Zarzoso, M., Ramirez, R.J., Sener, M.F., Mundada, L.V., Klos, M., Devaney, E.J., Vikstrom, K.L., Herron, T.J., Jalife, J., 2013. Myosin light chain 2-based selection of human iPSC-derived early ventricular cardiac myocytes. *Stem Cell Res.* 11, 1335. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2013.09.003>
- Bjerregaard, P., Gussak, I., 2005. Short QT Syndrome. *Annals of Noninvasive Electrocardiology* 10, 436–440. <https://doi.org/10.1111/j.1542-474X.2005.00064.x>
- Blinova, K., Dang, Q., Millard, D., Smith, G., Pierson, J., Guo, L., Brock, M., Lu, H.R., Kraushaar, U., Zeng, H., Shi, H., Zhang, X., Sawada, K., Osada, T., Kanda, Y., Sekino, Y., Pang, L., Feaster, T.K., Kettenhofen, R., Stockbridge, N., Strauss, D.G., Gintant, G., 2018. International Multisite Study of Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes for Drug Proarrhythmic Potential Assessment. *Cell Reports* 24, 3582–3592. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.08.079>
- Brade, T., Kumar, S., Cunningham, T.J., Chatzi, C., Zhao, X., Cavallero, S., Li, P., Sucov, H.M., Ruiz-Lozano, P., Duester, G., 2011. Retinoic acid stimulates myocardial expansion by induction of hepatic erythropoietin which activates epicardial Igf2. *Development* 138, 139–148. <https://doi.org/10.1242/dev.054239>
- Brade, T., Pane, L.S., Moretti, A., Chien, K.R., Laugwitz, K.-L., 2013. Embryonic Heart Progenitors and Cardiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013847>
- Brandão, K.O., Tabel, V.A., Atsma, D.E., Mummery, C.L., Davis, R.P., 2017. Human pluripotent stem cell models of cardiac disease: from mechanisms to therapies. *Disease Models & Mechanisms* 10, 1039–1059. <https://doi.org/10.1242/dmm.030320>
- Brinkman, E.K., Chen, T., de Haas, M., Holland, H.A., Akhtar, W., van Steensel, B., 2018a. Kinetics and Fidelity of the Repair of Cas9-Induced Double-Strand DNA Breaks. *Mol Cell* 70, 801–813.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.04.016>
- Brinkman, E.K., Kousholt, A.N., Harmsen, T., Leemans, C., Chen, T., Jonkers, J., van Steensel, B., 2018b. Easy quantification of template-directed CRISPR/Cas9 editing. *Nucleic Acids Res* 46, e58. <https://doi.org/10.1093/nar/gky164>
- Burridge, P.W., Anderson, D., Priddle, H., Barbadillo Muñoz, M.D., Chamberlain, S., Allegrucci, C., Young, L.E., Denning, C., 2007. Improved human embryonic stem cell embryoid body homogeneity and cardiomyocyte differentiation from a novel V-96 plate aggregation system highlights interline variability. *Stem Cells* 25, 929–938. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0598>
- Burridge, P.W., Matsa, E., Shukla, P., Lin, Z.C., Churko, J.M., Ebert, A.D., Lan, F., Diecke, S., Huber, B., Mordwinkin, N.M., Plews, J.R., Abilez, O.J., Cui, B., Gold, J.D., Wu,

- J.C., 2014. Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat Methods* 11, 855–860. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2999>
- Canny, M.D., Moatti, N., Wan, L.C.K., Fradet-Turcotte, A., Krasner, D., Mateos-Gomez, P.A., Zimmermann, M., Orthwein, A., Juang, Y.-C., Zhang, W., Noordermeer, S.M., Seclen, E., Wilson, M.D., Vorobyov, A., Munro, M., Ernst, A., Ng, T.F., Cho, T., Cannon, P.M., Sidhu, S.S., Sicheri, F., Durocher, D., 2018. Inhibition of 53BP1 favors homology-dependent DNA repair and increases CRISPR–Cas9 genome-editing efficiency. *Nature Biotechnology* 36, 95–102. <https://doi.org/10.1038/nbt.4021>
- Carroll, D., 2014. Genome Engineering with Targetable Nucleases. *Annu. Rev. Biochem.* 83, 409–439. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060713-035418>
- Caspi Oren, Huber Irit, Gepstein Amira, Arbel Gil, Maizels Leonid, Boulos Monther, Gepstein Lior, 2013. Modeling of Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy With Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Circulation: Cardiovascular Genetics* 6, 557–568. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.113.000188>
- Cassano, M., Berardi, E., Crippa, S., Toelen, J., Barthelemy, I., Micheletti, R., Chuah, M., Vandendriessche, T., Debyser, Z., Blot, S., Sampaolesi, M., 2012. Alteration of cardiac progenitor cell potency in GRMD dogs. *Cell Transplant* 21, 1945–1967. <https://doi.org/10.3727/096368912X638919>
- Cavero, I., Crumb, W., 2005. ICH S7B draft guideline on the non-clinical strategy for testing delayed cardiac repolarisation risk of drugs: a critical analysis. *Expert Opinion on Drug Safety* 4, 509–530. <https://doi.org/10.1517/14740338.4.3.509>
- Ceccaldi, R., Rondinelli, B., D'Andrea, A.D., 2016. Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends Cell Biol* 26, 52–64. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.07.009>
- Chavez, A., Scheiman, J., Vora, S., Pruitt, B.W., Tuttle, M., Iyer, E.P.R., Lin, S., Kiani, S., Guzman, C.D., Wiegand, D.J., Ter-Ovanesyan, D., Braff, J.L., Davidsohn, N., Housden, B.E., Perrimon, N., Weiss, R., Aach, J., Collins, J.J., Church, G.M., 2015. Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nature Methods* 12, 326–328. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3312>
- Chong, J.J.H., Yang, X., Don, C.W., Minami, E., Liu, Y.-W., Weyers, J.J., Mahoney, W.M., Van Biber, B., Cook, S.M., Palpant, N.J., Gantz, J.A., Fugate, J.A., Muskheli, V., Gough, G.M., Vogel, K.W., Astley, C.A., Hotchkiss, C.E., Baldessari, A., Pabon, L., Reinecke, H., Gill, E.A., Nelson, V., Kiem, H.-P., Laflamme, M.A., Murry, C.E., 2014. Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature* 510, 273–277. <https://doi.org/10.1038/nature13233>
- Christian, M., Cermak, T., Doyle, E.L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A.J., Voytas, D.F., 2010. Targeting DNA Double-Strand Breaks with TAL Effector Nucleases. *Genetics* 186, 757–761. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.120717>
- Christoffels Vincent M., Moorman Antoon F.M., 2009. Development of the Cardiac Conduction System. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 2, 195–207. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.108.829341>
- Chu, V.T., Weber, T., Wefers, B., Wurst, W., Sander, S., Rajewsky, K., Kühn, R., 2015. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR–Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nature Biotechnology* 33, 543–548. <https://doi.org/10.1038/nbt.3198>
- Chugh Sumeet S., Havmoeller Rasmus, Narayanan Kumar, Singh David, Rienstra Michiel, Benjamin Emelia J., Gillum Richard F., Kim Young-Hoon, McAnulty John H., Zheng Zhi-Jie, Forouzanfar Mohammad H., Naghavi Mohsen, Mensah George A., Ezzati Majid, Murray Christopher J.L., 2014. Worldwide Epidemiology of Atrial Fibrillation. *Circulation* 129, 837–847. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.005119>

- Chung, C.-Y., Bien, H., Entcheva, E., 2007. The role of cardiac tissue alignment in modulating electrical function. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 18, 1323–1329. <https://doi.org/10.1111/j.1540-8167.2007.00959.x>
- Cochrane, A., Albers, H.J., Passier, R., Mummery, C.L., van den Berg, A., Orlova, V.V., van der Meer, A.D., 2019. Advanced in vitro models of vascular biology: Human induced pluripotent stem cells and organ-on-chip technology. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Human stem cell based organ-on-a-chip models for drug discovery and development 140, 68–77. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.06.007>
- Cooper, R.N., Butler-Browne, G.S., Mouly, V., 2006. Human muscle stem cells. *Current Opinion in Pharmacology, Respiratory/Musculoskeletal* 6, 295–300. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2006.01.007>
- Corrado Domenico, Zorzi Alessandro, Cerrone Marina, Rigato Ilaria, Mongillo Marco, Bauce Barbara, Delmar Mario, 2016. Relationship Between Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy and Brugada Syndrome. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 9, e003631. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.115.003631>
- Correia, C., Koshkin, A., Duarte, P., Hu, D., Teixeira, A., Domian, I., Serra, M., Alves, P.M., 2017. Distinct carbon sources affect structural and functional maturation of cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Scientific Reports* 7, 8590. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08713-4>
- Dattola, E., Parrotta, E.I., Scalise, S., Perozziello, G., Limongi, T., Candeloro, P., Coluccio, M.L., Maletta, C., Bruno, L., Angelis, M.T.D., Santamaria, G., Mollace, V., Lamanna, E., Fabrizio, E.D., Cuda, G., 2019. Development of 3D PVA scaffolds for cardiac tissue engineering and cell screening applications. *RSC Adv.* 9, 4246–4257. <https://doi.org/10.1039/C8RA08187E>
- de Korte, T., Katili, P.A., Mohd Yusof, N.A.N., van Meer, B.J., Saleem, U., Burton, F.L., Smith, G.L., Clements, P., Mummery, C.L., Eschenhagen, T., Hansen, A., Denning, C., 2020. Unlocking Personalized Biomedicine and Drug Discovery with Human Induced Pluripotent Stem Cell–Derived Cardiomyocytes: Fit for Purpose or Forever Elusive? *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 60, 529–551. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010919-023309>
- de Wert, G., Mummery, C., 2003. Human embryonic stem cells: research, ethics and policy. *Hum Reprod* 18, 672–682. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg143>
- Deo, M., Ruan, Y., Pandit, S.V., Shah, K., Berenfeld, O., Blaufox, A., Cerrone, M., Noujaim, S.F., Denegri, M., Jalife, J., Priori, S.G., 2013. KCNJ2 mutation in short QT syndrome 3 results in atrial fibrillation and ventricular proarrhythmia. *PNAS* 110, 4291–4296. <https://doi.org/10.1073/pnas.1218154110>
- Devalla, H.D., Schwach, V., Ford, J.W., Milnes, J.T., El-Haou, S., Jackson, C., Gkatzis, K., Elliott, D.A., Chuva de Sousa Lopes, S.M., Mummery, C.L., Verkerk, A.O., Passier, R., 2015. Atrial-like cardiomyocytes from human pluripotent stem cells are a robust preclinical model for assessing atrial-selective pharmacology. *EMBO Molecular Medicine* 7, 394–410. <https://doi.org/10.15252/emmm.201404757>
- Dhamoon, A.S., Jalife, J., 2005. The inward rectifier current (IK1) controls cardiac excitability and is involved in arrhythmogenesis. *Heart Rhythm* 2, 316–324. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2004.11.012>
- di Barletta Marina Raffaele, Viatchenko-Karpinski Serge, Nori Alessandra, Memmi Mirella, Terentyev Dmitry, Turcato Federica, Valle Giorgia, Rizzi Nicoletta, Napolitano Carlo, Gyorke Sandor, Volpe Pompeo, Priori Silvia G., 2006. Clinical Phenotype and Functional Characterization of CASQ2 Mutations Associated With Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Circulation* 114, 1012–1019. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.623793>
- Ding, Q., Lee, Y.-K., Schaefer, E.A.K., Peters, D.T., Veres, A., Kim, K., Kuperwasser, N., Motola, D.L., Meissner, T.B., Hendriks, W.T., Trevisan, M., Gupta, R.M., Moisan, A., Banks, E., Friesen, M., Schinzel, R.T., Xia, F., Tang, A., Xia, Y., Figueroa, E.,

- Wann, A., Ahfeldt, T., Daheron, L., Zhang, F., Rubin, L.L., Peng, L.F., Chung, R.T., Musunuru, K., Cowan, C.A., 2013. A TALEN genome editing system to generate human stem cell-based disease models. *Cell Stem Cell* 12, 238–251. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.11.011>
- Drawnel, F.M., Boccardo, S., Prummer, M., Delobel, F., Graff, A., Weber, M., Gérard, R., Badi, L., Kam-Thong, T., Bu, L., Jiang, X., Hoflack, J.-C., Kiialainen, A., Jeworutzki, E., Aoyama, N., Carlson, C., Burcin, M., Gromo, G., Boehringer, M., Stahlberg, H., Hall, B.J., Magnone, M.C., Kolaja, K., Chien, K.R., Bailly, J., Iacone, R., 2014. Disease Modeling and Phenotypic Drug Screening for Diabetic Cardiomyopathy using Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Reports* 9, 810–820. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.09.055>
- Dubois, N.C., Craft, A.M., Sharma, P., Elliott, D.A., Stanley, E.G., Elefanty, A.G., Gramolini, A., Keller, G., 2011. SIRPA is a specific cell-surface marker for isolating cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology* 29, 1011–1018. <https://doi.org/10.1038/nbt.2005>
- Dudley, D.D., Chaudhuri, J., Bassing, C.H., Alt, F.W., 2005. Mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination: similarities and differences. *Adv Immunol* 86, 43–112. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(04\)86002-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(04)86002-4)
- Eisen Alon, Ruff Christian T., Braunwald Eugene, Nordio Francesco, Corbalán Ramón, Dalby Anthony, Dorobantu Maria, Mercuri Michele, Lanz Hans, Rutman Howard, Wiviott Stephen D., Antman Elliott M., Giugliano Robert P., 2016. Sudden Cardiac Death in Patients With Atrial Fibrillation: Insights From the ENGAGE AF-TIMI 48 Trial. *Journal of the American Heart Association* 5, e003735. <https://doi.org/10.1161/JAHA.116.003735>
- Elliott, D.A., Braam, S.R., Koutsis, K., Ng, E.S., Jenny, R., Lagerqvist, E.L., Biben, C., Hatzistavrou, T., Hirst, C.E., Yu, Q.C., Skelton, R.J.P., Ward-van Oostwaard, D., Lim, S.M., Khammy, O., Li, X., Hawes, S.M., Davis, R.P., Goulburn, A.L., Passier, R., Prall, O.W.J., Haynes, J.M., Pouton, C.W., Kaye, D.M., Mummery, C.L., Elefanty, A.G., Stanley, E.G., 2011. NKX2-5(eGFP/w) hESCs for isolation of human cardiac progenitors and cardiomyocytes. *Nat. Methods* 8, 1037–1040. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1740>
- Engle, S.J., Vincent, F., 2014. Small Molecule Screening in Human Induced Pluripotent Stem Cell-derived Terminal Cell Types. *J Biol Chem* 289, 4562–4570. <https://doi.org/10.1074/jbc.R113.529156>
- Estrada-Avilés, R., Rodríguez, G., Zarain-Herzberg, A., 2017. The cardiac calsequestrin gene transcription is modulated at the promoter by NFAT and MEF-2 transcription factors. *PLoS One* 12, e0184724. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184724>
- Extramiana, F., Maison-Blanche, P., Cabanis, M.-J., Ortemann-Renon, C., Beaufile, P., Leenhardt, A., 2005. Clinical Assessment of Drug-induced QT Prolongation in Association with Heart Rate Changes. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 77, 247–258. <https://doi.org/10.1016/j.clpt.2004.10.016>
- Fabiato, A., 1983. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum. *Am. J. Physiol.* 245, C1-14. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1983.245.1.C1>
- Faggioni, M., Kryshtal, D.O., Knollmann, B.C., 2012. Calsequestrin Mutations and Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Pediatr Cardiol* 33, 959–967. <https://doi.org/10.1007/s00246-012-0256-1>
- Feric, N.T., Radisic, M., 2016. Maturing human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in human engineered cardiac tissues. *Advanced Drug Delivery Reviews, Tissue engineering of the heart: from in vitro models to regenerative solutions* 96, 110–134. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.04.019>
- Finck, B.N., Kelly, D.P., 2006. PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest* 116, 615–622. <https://doi.org/10.1172/JCI27794>

- Fountoulaki, K., Dagres, N., Iliodromitis, E.K., 2015. Cellular Communications in the Heart. *Card Fail Rev* 1, 64–68. <https://doi.org/10.15420/cfr.2015.1.2.64>
- Freund, C., Oostwaard, D.W., Monshouwer-Kloots, J., Brink, S. van den, Rooijen, M. van, Xu, X., Zweigerdt, R., Mummery, C., Passier, R., 2008. Insulin Redirects Differentiation from Cardiogenic Mesoderm and Endoderm to Neuroectoderm in Differentiating Human Embryonic Stem Cells. *STEM CELLS* 26, 724–733. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0617>
- Friedman, C.E., Nguyen, Q., Lukowski, S.W., Helfer, A., Chiu, H.S., Miklas, J., Levy, S., Suo, S., Han, J.-D.J., Osteil, P., Peng, G., Jing, N., Baillie, G.J., Senabouth, A., Christ, A.N., Bruxner, T.J., Murry, C.E., Wong, E.S., Ding, J., Wang, Y., Hudson, J., Ruohola-Baker, H., Bar-Joseph, Z., Tam, P.P.L., Powell, J.E., Palpant, N.J., 2018. Single-Cell Transcriptomic Analysis of Cardiac Differentiation from Human PSCs Reveals HOPX-Dependent Cardiomyocyte Maturation. *Cell Stem Cell* 23, 586–598.e8. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.09.009>
- Fu, Y., Foden, J.A., Khayter, C., Maeder, M.L., Reyon, D., Joung, J.K., Sander, J.D., 2013. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nature Biotechnology* 31, 822–826. <https://doi.org/10.1038/nbt.2623>
- Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., Hasegawa, M., 2009. Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proceedings of the Japan Academy, Series B* 85, 348–362. <https://doi.org/10.2183/pjab.85.348>
- Gaborit, N., Le Bouter, S., Szuts, V., Varro, A., Escande, D., Nattel, S., Demolombe, S., 2007. Regional and tissue specific transcript signatures of ion channel genes in the non-diseased human heart: Regional ion channel subunit gene expression in the human heart. *The Journal of Physiology* 582, 675–693. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.126714>
- Garg, P., Garg, V., Shrestha, R., Sanguinetti, M.C., Kamp, T.J., Wu, J.C., 2018a. Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes as Models for Cardiac Channelopathies: A Primer for Non-Electrophysiologists. *Circ Res* 123, 224–243. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.311209>
- Garg, P., Oikonomopoulos, A., Chen, H., Li, Y., Lam, C.K., Sallam, K., Perez, M., Lux, R.L., Sanguinetti, M.C., Wu, J.C., 2018b. Genome Editing of Induced Pluripotent Stem Cells to Decipher Cardiac Channelopathy Variant. *Journal of the American College of Cardiology* 72, 62–75. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.04.041>
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P., Siksnys, V., 2012. Cas9–crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *PNAS* 109, E2579–E2586. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208507109>
- Gaudelli, N.M., Komor, A.C., Rees, H.A., Packer, M.S., Badran, A.H., Bryson, D.I., Liu, D.R., 2017. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature* 551, 464–471. <https://doi.org/10.1038/nature24644>
- Giacomelli, E., Meraviglia, V., Campostrini, G., Cochrane, A., Cao, X., van Helden, R.W.J., Krotenberg Garcia, A., Mircea, M., Kostidis, S., Davis, R.P., van Meer, B.J., Jost, C.R., Koster, A.J., Mei, H., Míguez, D.G., Mulder, A.A., Ledesma-Terrón, M., Pompilio, G., Sala, L., Salvatori, D.C.F., Slieker, R.C., Sommariva, E., de Vries, A.A.F., Giera, M., Semrau, S., Tertoolen, L.G.J., Orlova, V.V., Bellin, M., Mummery, C.L., 2020. Human-iPSC-Derived Cardiac Stromal Cells Enhance Maturation in 3D Cardiac Microtissues and Reveal Non-cardiomyocyte Contributions to Heart Disease. *Cell Stem Cell* 26, 862–879.e11. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.05.004>
- Gintant, G., Sager, P.T., Stockbridge, N., 2016. Evolution of strategies to improve preclinical cardiac safety testing. *Nat Rev Drug Discov* 15, 457–471. <https://doi.org/10.1038/nrd.2015.34>

- Giudicessi, J.R., Ackerman, M.J., 2012. Potassium-channel mutations and cardiac arrhythmias—diagnosis and therapy. *Nat. Rev. Cardiol.* 9, 319–332. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2012.3>
- Gottlieb, T.M., Jackson, S.P., 1993. The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell* 72, 131–142. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90057-w](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90057-w)
- Grant Augustus O., 2009. Cardiac Ion Channels. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 2, 185–194. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.108.789081>
- Grawunder, U., Zimmer, D., Fugmann, S., Schwarz, K., Lieber, M.R., 1998. DNA Ligase IV Is Essential for V(D)J Recombination and DNA Double-Strand Break Repair in Human Precursor Lymphocytes. *Molecular Cell* 2, 477–484. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80147-1](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80147-1)
- Gupta, A.K., Maheshwari, A., Tresch, D.D., Thakur, R.K., 2002. Cardiac Arrhythmias in the Elderly. *Card Electrophysiol Rev* 6, 120–128. <https://doi.org/10.1023/A:1017963928016>
- Gurdon, J.B., 1962. Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. *Developmental Biology* 4, 256–273. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(62\)90043-X](https://doi.org/10.1016/0012-1606(62)90043-X)
- Györke, I., Hester, N., Jones, L.R., Györke, S., 2004. The role of calsequestrin, triadin, and junctin in conferring cardiac ryanodine receptor responsiveness to luminal calcium. *Biophys. J.* 86, 2121–2128. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(04\)74271-X](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(04)74271-X)
- Györke, S., Stevens, S.C.W., Terentyev, D., 2009. Cardiac calsequestrin: quest inside the SR. *The Journal of Physiology* 587, 3091–3094. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.172049>
- Györke, S., Terentyev, D., 2008. Modulation of ryanodine receptor by luminal calcium and accessory proteins in health and cardiac disease. *Cardiovasc Res* 77, 245–255. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvm038>
- Han, L., Li, Yang, Tchao, J., Kaplan, A.D., Lin, B., Li, You, Mich-Basso, J., Lis, A., Hassan, N., London, B., Bett, G.C.L., Tobita, K., Rasmusson, R.L., Yang, L., 2014. Study familial hypertrophic cardiomyopathy using patient-specific induced pluripotent stem cells. *Cardiovasc Res* 104, 258–269. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu205>
- Hartman, M.E., Dai, D.-F., Laflamme, M.A., 2016. Human pluripotent stem cells: Prospects and challenges as a source of cardiomyocytes for in vitro modeling and cell-based cardiac repair. *Advanced Drug Delivery Reviews, Tissue engineering of the heart: from in vitro models to regenerative solutions* 96, 3–17. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.05.004>
- Harvey, R.P., 2002. Patterning the vertebrate heart. *Nature Reviews Genetics* 3, 544–556. <https://doi.org/10.1038/nrg843>
- Hattori, T., Makiyama, T., Akao, M., Ehara, E., Ohno, S., Iguchi, M., Nishio, Y., Sasaki, K., Itoh, H., Yokode, M., Kita, T., Horie, M., Kimura, T., 2012. A novel gain-of-function KCNJ2 mutation associated with short-QT syndrome impairs inward rectification of Kir2.1 currents. *Cardiovasc Res* 93, 666–673. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvr329>
- He Jia-Qiang, Ma Yue, Lee Youngsook, Thomson James A., Kamp Timothy J., 2003. Human Embryonic Stem Cells Develop Into Multiple Types of Cardiac Myocytes. *Circulation Research* 93, 32–39. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000080317.92718.99>
- Heikinheimo, M., Scandrett, J.M., Wilson, D.B., 1994. Localization of transcription factor GATA-4 to regions of the mouse embryo involved in cardiac development. *Dev Biol* 164, 361–373. <https://doi.org/10.1006/dbio.1994.1206>
- Hershberger, R.E., Hedges, D.J., Morales, A., 2013. Dilated cardiomyopathy: the complexity of a diverse genetic architecture. *Nature Reviews Cardiology* 10, 531–547. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2013.105>
- Hinson, J.T., Chopra, A., Nafissi, N., Polacheck, W.J., Benson, C.C., Swist, S., Gorham, J., Yang, L., Schafer, S., Sheng, C.C., Haghighi, A., Homsy, J., Hubner, N., Church,

- G., Cook, S.A., Linke, W.A., Chen, C.S., Seidman, J.G., Seidman, C.E., 2015. Titin mutations in iPSC cells define sarcomere insufficiency as a cause of dilated cardiomyopathy. *Science* 349, 982–986. <https://doi.org/10.1126/science.aaa5458>
- Hirt, M.N., Boeddinghaus, J., Mitchell, A., Schaaf, S., Börnchen, C., Müller, C., Schulz, H., Hubner, N., Stenzig, J., Stoehr, A., Neuber, C., Eder, A., Luther, P.K., Hansen, A., Eschenhagen, T., 2014. Functional improvement and maturation of rat and human engineered heart tissue by chronic electrical stimulation. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 74, 151–161. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.05.009>
- Hoekstra, M., Mummery, C.L., Wilde, A.A.M., Bezzina, C.R., Verkerk, A.O., 2012. Induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes as models for cardiac arrhythmias. *Front Physiol* 3, 346. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00346>
- Holubarsch, C., Lüdemann, J., Wiessner, S., Ruf, T., Schulte-Baukloh, H., Schmidt-Schweda, S., Pieske, B., Posival, H., Just, H., 1998. Shortening versus isometric contractions in isolated human failing and non-failing left ventricular myocardium: dependency of external work and force on muscle length, heart rate and inotropic stimulation. *Cardiovasc Res* 37, 46–57. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(97\)00215-0](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(97)00215-0)
- Hondeghem L M, Snyders D J, 1990. Class III antiarrhythmic agents have a lot of potential but a long way to go. Reduced effectiveness and dangers of reverse use dependence. *Circulation* 81, 686–690. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.81.2.686>
- Howden, S.E., McColl, B., Glaser, A., Vadolas, J., Petrou, S., Little, M.H., Elefanty, A.G., Stanley, E.G., 2016. A Cas9 Variant for Efficient Generation of Indel-Free Knockin or Gene-Corrected Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports* 7, 508–517. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.07.001>
- Howell, J.M., Fletcher, S., Kakulas, B.A., O'Hara, M., Lochmuller, H., Karpati, G., 1997. Use of the dog model for Duchenne muscular dystrophy in gene therapy trials. *Neuromuscul Disord* 7, 325–328. [https://doi.org/10.1016/s0960-8966\(97\)00057-6](https://doi.org/10.1016/s0960-8966(97)00057-6)
- Hsu, P.D., Lander, E.S., Zhang, F., 2014. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell* 157, 1262–1278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>
- Hsu, P.D., Scott, D.A., Weinstein, J.A., Ran, F.A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E.J., Wu, X., Shalem, O., Cradick, T.J., Marraffini, L.A., Bao, G., Zhang, F., 2013. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnology* 31, 827–832. <https://doi.org/10.1038/nbt.2647>
- Huang, C.-W., Kuo, C.-C., 2016. A synergistic blocking effect of Mg²⁺ and spermine on the inward rectifier K⁺ (Kir2.1) channel pore. *Scientific Reports* 6, 21493. <https://doi.org/10.1038/srep21493>
- Huang, C.Y., Peres Moreno Maia-Joca, R., Ong, C.S., Wilson, I., DiSilvestre, D., Tomaselli, G.F., Reich, D.H., 2020. Enhancement of human iPSC-derived cardiomyocyte maturation by chemical conditioning in a 3D environment. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 138, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2019.10.001>
- Huber, I., Itzhaki, I., Caspi, O., Arbel, G., Tzukerman, M., Gepstein, A., Habib, M., Yankelson, L., Kehat, I., Gepstein, L., 2007. Identification and selection of cardiomyocytes during human embryonic stem cell differentiation. *FASEB J.* 21, 2551–2563. <https://doi.org/10.1096/fj.05-5711.com>
- Hunkeler N M, Kullman J, Murphy A M, 1991. Troponin I isoform expression in human heart. *Circulation Research* 69, 1409–1414. <https://doi.org/10.1161/01.RES.69.5.1409>
- Huss Janice M., Kelly Daniel P., 2004. Nuclear Receptor Signaling and Cardiac Energetics. *Circulation Research* 95, 568–578. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000141774.29937.e3>
- Hwang, H.S., Kryshtal, D.O., Feaster, T.K., Sánchez-Freire, V., Zhang, J., Kamp, T.J., Hong, C.C., Wu, J.C., Knollmann, B.C., 2015. Comparable calcium handling of

- human iPSC-derived cardiomyocytes generated by multiple laboratories. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 85, 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.05.003>
- Ishida, M., Miyagawa, S., Saito, A., Fukushima, S., Harada, A., Ito, E., Ohashi, F., Watabe, T., Hatazawa, J., Matsuura, K., Sawa, Y., 2019. Transplantation of Human-induced Pluripotent Stem Cell-derived Cardiomyocytes Is Superior to Somatic Stem Cell Therapy for Restoring Cardiac Function and Oxygen Consumption in a Porcine Model of Myocardial Infarction. *Transplantation* 103, 291–298. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000002384>
- Itier, J.-M., Ret, G., Viale, S., Sweet, L., Bangari, D., Caron, A., Le-Gall, F., Bénichou, B., Leonard, J., Deleuze, J.-F., Orsini, C., 2014. Effective clearance of GL-3 in a human iPSC-derived cardiomyocyte model of Fabry disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* 37, 1013–1022. <https://doi.org/10.1007/s10545-014-9724-5>
- Itzhaki, I., Maizels, L., Huber, I., Zwi-Dantsis, L., Caspi, O., Winterstern, A., Feldman, O., Gepstein, A., Arbel, G., Hammerman, H., Boulos, M., Gepstein, L., 2011. Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells. *Nature* 471, 225–229. <https://doi.org/10.1038/nature09747>
- Iyer, D., Gambardella, L., Bernard, W.G., Serrano, F., Mascetti, V.L., Pedersen, R.A., Talasila, A., Sinha, S., 2015. Robust derivation of epicardium and its differentiated smooth muscle cell progeny from human pluripotent stem cells. *Development* 142, 1528–1541. <https://doi.org/10.1242/dev.119271>
- Jacot, J.G., Kita-Matsuo, H., Wei, K.A., Chen, H.S.V., Omens, J.H., Mercola, M., McCulloch, A.D., 2010. Cardiac myocyte force development during differentiation and maturation. *Ann N Y Acad Sci* 1188, 121–127. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05091.x>
- Jalife, J., Morley, G.E., Vaidya, D., 1999. Connexins and Impulse Propagation in the Mouse Heart. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 10, 1649–1663. <https://doi.org/10.1111/j.1540-8167.1999.tb00230.x>
- Jelinkova, S., Vilotic, A., Pribyl, J., Aimond, F., Salykin, A., Acimovic, I., Pesl, M., Caluori, G., Klimovic, S., Urban, T., Dobrovolna, H., Soska, V., Skladal, P., Lacampagne, A., Dvorak, P., Meli, A.C., Rotrekl, V., 2020. DMD Pluripotent Stem Cell Derived Cardiac Cells Recapitulate in vitro Human Cardiac Pathophysiology. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8, 535. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00535>
- Jiang, Y., Park, P., Hong, S.-M., Ban, and K., 2018. Maturation of Cardiomyocytes Derived from Human Pluripotent Stem Cells: *Current Strategies and Limitations*. *Molecules and Cells* 41, 613–621. <https://doi.org/10.14348/molcells.2018.0143>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., Charpentier, E., 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Johannesen, L., Vicente, J., Mason, J.W., Erato, C., Sanabria, C., Waite-Labott, K., Hong, M., Lin, J., Guo, P., Mutlib, A., Wang, J., Crumb, W.J., Blinova, K., Chan, D., Stohman, J., Florian, J., Ugander, M., Stockbridge, N., Strauss, D.G., 2016. Late sodium current block for drug-induced long QT syndrome: Results from a prospective clinical trial. *Clin Pharmacol Ther* 99, 214–223. <https://doi.org/10.1002/cpt.205>
- Jung, Y., Bauer, G., Nolte, J.A., 2012. Concise review: Induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem cells: progress toward safe clinical products. *Stem Cells* 30, 42–47. <https://doi.org/10.1002/stem.727>
- Kabadi, A.M., Ousterout, D.G., Hilton, I.B., Gersbach, C.A., 2014. Multiplex CRISPR/Cas9-based genome engineering from a single lentiviral vector. *Nucleic Acids Res* 42, e147–e147. <https://doi.org/10.1093/nar/gku749>

- Kaese, S., Verheule, S., 2012. Cardiac electrophysiology in mice: a matter of size. *Front. Physiol.* 3. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00345>
- Kanda, Y., Yamazaki, D., Osada, T., Yoshinaga, T., Sawada, K., 2018. Development of torsadogenic risk assessment using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: Japan iPS Cardiac Safety Assessment (JiCSA) update. *J. Pharmacol. Sci.* 138, 233–239. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2018.10.010>
- Karakikes, I., Ameen, M., Termglinchan, V., Wu, J.C., 2015a. Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: insights into molecular, cellular, and functional phenotypes. *Circ. Res.* 117, 80–88. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.305365>
- Karakikes, I., Stillitano, F., Nonnenmacher, M., Tzimas, C., Sanoudou, D., Termglinchan, V., Kong, C.-W., Rushing, S., Hansen, J., Ceholski, D., Kolokathis, F., Kremastinos, D., Katoulis, A., Ren, L., Cohen, N., Gho, J.M.I.H., Tsiapras, D., Vink, A., Wu, J.C., Asselbergs, F.W., Li, R.A., Hulot, J.-S., Kranias, E.G., Hajjar, R.J., 2015b. Correction of human phospholamban R14del mutation associated with cardiomyopathy using targeted nucleases and combination therapy. *Nature Communications* 6, 6955. <https://doi.org/10.1038/ncomms7955>
- Karanam, K., Kafri, R., Loewer, A., Lahav, G., 2012. Quantitative live cell imaging reveals a gradual shift between DNA repair mechanisms and a maximal use of HR in mid S phase. *Mol Cell* 47, 320–329. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.05.052>
- Karbassi, E., Fenix, A., Marchiano, S., Muraoka, N., Nakamura, K., Yang, X., Murry, C.E., 2020. Cardiomyocyte maturation: advances in knowledge and implications for regenerative medicine. *Nature Reviews Cardiology* 17, 341–359. <https://doi.org/10.1038/s41569-019-0331-x>
- Katz, T.C., Singh, M.K., Degenhardt, K., Rivera-Feliciano, J., Johnson, R.L., Epstein, J.A., Tabin, C.J., 2012. Distinct Compartments of the Proepicardial Organ Give Rise to Coronary Vascular Endothelial Cells. *Developmental Cell* 22, 639–650. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2012.01.012>
- Kawatou, M., Masumoto, H., Fukushima, H., Morinaga, G., Sakata, R., Ashihara, T., Yamashita, J.K., 2017. Modelling Torsade de Pointes arrhythmias in vitro in 3D human iPS cell-engineered heart tissue. *Nature Communications* 8, 1078. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01125-y>
- Kelly, R.G., 2012. The second heart field. *Curr Top Dev Biol* 100, 33–65. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387786-4.00002-6>
- Kim, C., Wong, J., Wen, J., Wang, S., Wang, C., Spiering, S., Kan, N.G., Forcales, S., Puri, P.L., Leone, T.C., Marine, J.E., Calkins, H., Kelly, D.P., Judge, D.P., Chen, H.-S.V., 2013. Studying arrhythmogenic right ventricular dysplasia with patient-specific iPSCs. *Nature* 494, 105–110. <https://doi.org/10.1038/nature11799>
- Kim, D., Kim, C.-H., Moon, J.-I., Chung, Y.-G., Chang, M.-Y., Han, B.-S., Ko, S., Yang, E., Cha, K.Y., Lanza, R., Kim, K.-S., 2009. Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells by Direct Delivery of Reprogramming Proteins. *Cell Stem Cell* 4, 472–476. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.005>
- Kim, Y.G., Cha, J., Chandrasegaran, S., 1996. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *PNAS* 93, 1156–1160. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.3.1156>
- Klein, I., Ojamaa, K., 2009. Thyroid Hormone and the Cardiovascular System [WWW Document]. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM200102153440707>. <https://doi.org/10.1056/NEJM200102153440707>
- Komor, A.C., Kim, Y.B., Packer, M.S., Zuris, J.A., Liu, D.R., 2016. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* 533, 420–424. <https://doi.org/10.1038/nature17946>

- Krüger, M., Linke, W.A., 2009. Titin-based mechanical signalling in normal and failing myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 46, 490–498. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.01.004>
- Kumar, A., D'Souza, S.S., Thakur, A.S., 2019. Understanding the Journey of Human Hematopoietic Stem Cell Development. *Stem Cells Int* 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/2141475>
- Kuppusamy, K.T., Jones, D.C., Sperber, H., Madan, A., Fischer, K.A., Rodriguez, M.L., Pabon, L., Zhu, W.-Z., Tulloch, N.L., Yang, X., Sniadecki, N.J., Laflamme, M.A., Ruzzo, W.L., Murry, C.E., Ruohola-Baker, H., 2015. Let-7 family of microRNA is required for maturation and adult-like metabolism in stem cell-derived cardiomyocytes. *PNAS* 112, E2785–E2794. <https://doi.org/10.1073/pnas.1424042112>
- Lan, F., Lee, A.S., Liang, P., Sanchez-Freire, V., Nguyen, P.K., Wang, L., Han, L., Yen, M., Wang, Y., Sun, N., Abilez, O.J., Hu, S., Ebert, A.D., Navarrete, E.G., Simmons, C.S., Wheeler, M., Pruitt, B., Lewis, R., Yamaguchi, Y., Ashley, E.A., Bers, D.M., Robbins, R.C., Longaker, M.T., Wu, J.C., 2013. Abnormal Calcium Handling Properties Underlie Familial Hypertrophic Cardiomyopathy Pathology in Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 12, 101–113. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.10.010>
- Lavery, H., Benson, C., Cartwright, E., Cross, M., Garland, C., Hammond, T., Holloway, C., McMahon, N., Milligan, J., Park, B., Pirmohamed, M., Pollard, C., Radford, J., Roome, N., Sager, P., Singh, S., Suter, T., Suter, W., Trafford, A., Volders, P., Wallis, R., Weaver, R., York, M., Valentin, J., 2011. How can we improve our understanding of cardiovascular safety liabilities to develop safer medicines? *Br J Pharmacol* 163, 675–693. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01255.x>
- Lawrence, C.L., Bridgland-Taylor, M.H., Pollard, C.E., Hammond, T.G., Valentin, J.-P., 2006. A Rabbit Langendorff Heart Proarrhythmia Model: Predictive Value for Clinical Identification of Torsades de Pointes. *Br J Pharmacol* 149, 845–860. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706894>
- Lázár, E., Sadek, H.A., Bergmann, O., 2017. Cardiomyocyte renewal in the human heart: insights from the fall-out. *Eur Heart J* 38, 2333–2342. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehx343>
- Lee, J.H., Protze, S.I., Laksman, Z., Backx, P.H., Keller, G.M., 2017. Human Pluripotent Stem Cell-Derived Atrial and Ventricular Cardiomyocytes Develop from Distinct Mesoderm Populations. *Cell Stem Cell* 21, 179-194.e4. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.07.003>
- Lee Peter, Klos Matt, Bollensdorff Christian, Hou Luqia, Ewart Paul, Kamp Timothy J., Zhang Jianhua, Bizy Alexandra, Guerrero-Serna Guadalupe, Kohl Peter, Jalife José, Herron Todd J., 2012. Simultaneous Voltage and Calcium Mapping of Genetically Purified Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Myocyte Monolayers. *Circulation Research* 110, 1556–1563. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.262535>
- Lee, Y.-K., Ng, K.-M., Lai, W.-H., Chan, Y.-C., Lau, Y.-M., Lian, Q., Tse, H.-F., Siu, C.-W., 2011. Calcium homeostasis in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cell Rev Rep* 7, 976–986. <https://doi.org/10.1007/s12015-011-9273-3>
- Leenhardt Antoine, Lucet Vincent, Denjoy Isabelle, Grau Francis, Ngoc Dien Do, Coumel Philippe, 1995. Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia in Children. *Circulation* 91, 1512–1519. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.91.5.1512>
- Lemme, M., Braren, I., Prondzynski, M., Aksehirlioglu, B., Ulmer, B.M., Schulze, M.L., Ismaili, D., Meyer, C., Hansen, A., Christ, T., Lemoine, M.D., Eschenhagen, T., 2019. Chronic intermittent tachypacing by an optogenetic approach induces

- arrhythmia vulnerability in human engineered heart tissue. *Cardiovasc. Res.* <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz245>
- Li, M., Kanda, Y., Ashihara, T., Sasano, T., Nakai, Y., Kodama, M., Hayashi, E., Sekino, Y., Furukawa, T., Kurokawa, J., 2017. Overexpression of KCNJ2 in induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes for the assessment of QT-prolonging drugs. *J. Pharmacol. Sci.* 134, 75–85. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2017.05.004>
- Li, Q., Ni, R. (Ruby), Hong, H., Goh, K.Y., Rossi, M., Fast, V.G., Zhou, L., 2017. Electrophysiological Properties and Viability of Neonatal Rat Ventricular Myocyte Cultures with Inducible ChR2 Expression. *Scientific Reports* 7, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01723-2>
- Lian, X., Zhang, J., Azarin, S.M., Zhu, K., Hazeltine, L.B., Bao, X., Hsiao, C., Kamp, T.J., Palecek, S.P., 2013. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ β -catenin signaling under fully defined conditions. *Nat Protoc* 8, 162–175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.150>
- Liang, P., Sallam, K., Wu, H., Li, Y., Itzhaki, I., Garg, P., Zhang, Y., Termglichan, V., Lan, F., Gu, M., Gong, T., Zhuge, Y., He, C., Ebert, A.D., Sanchez-Freire, V., Churko, J., Hu, S., Sharma, A., Lam, C.K., Scheinman, M.M., Bers, D.M., Wu, J.C., 2016. Patient-Specific and Genome-Edited Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Elucidate Single-Cell Phenotype of Brugada Syndrome. *Journal of the American College of Cardiology* 68, 2086–2096. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2016.07.779>
- Lieu Deborah K., Fu Ji-Dong, Chiamvimonvat Nipavan, Tung Kelvin Chan, McNerney Gregory P., Huser Thomas, Keller Gordon, Kong Chi-Wing, Li Ronald A., 2013. Mechanism-Based Facilitated Maturation of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 6, 191–201. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.111.973420>
- Lie-Venema, H., van den Akker, N.M.S., Bax, N.A.M., Winter, E.M., Maas, S., Kekarainen, T., Hoeben, R.C., deRuiter, M.C., Poelmann, R.E., Gittenberger-de Groot, A.C., 2007. Origin, Fate, and Function of Epicardium-Derived Cells (EPDCs) in Normal and Abnormal Cardiac Development [WWW Document]. *TheScientificWorldJOURNAL*. <https://doi.org/10.1100/tsw.2007.294>
- Lints, T.J., Parsons, L.M., Hartley, L., Lyons, I., Harvey, R.P., 1993. Nkx-2.5: a novel murine homeobox gene expressed in early heart progenitor cells and their myogenic descendants. *Development* 119, 419–431.
- Liu, J., Lieu, D.K., Siu, C.W., Fu, J.-D., Tse, H.-F., Li, R.A., 2009. Facilitated maturation of Ca²⁺ handling properties of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes by calsequestrin expression. *Am. J. Physiol., Cell Physiol.* 297, C152-159. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00060.2009>
- Liu, Y.-W., Chen, B., Yang, X., Fugate, J.A., Kalucki, F.A., Futakuchi-Tsuchida, A., Couture, L., Vogel, K.W., Astley, C.A., Baldessari, A., Ogle, J., Don, C.W., Steinberg, Z.L., Seslar, S.P., Tuck, S.A., Tsuchida, H., Naumova, A.V., Dupras, S.K., Lyu, M.S., Lee, J., Hailey, D.W., Reinecke, H., Pabon, L., Fryer, B.H., MacLellan, W.R., Thies, R.S., Murry, C.E., 2018. Human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes restore function in infarcted hearts of non-human primates. *Nature Biotechnology* 36, 597–605. <https://doi.org/10.1038/nbt.4162>
- Lodola, F., Morone, D., Denegri, M., Bongianino, R., Nakahama, H., Rutigliano, L., Gosetti, R., Rizzo, G., Vollero, A., Buonocore, M., Napolitano, C., Condorelli, G., Priori, S.G., Di Pasquale, E., 2016. Adeno-associated virus-mediated CASQ2 delivery rescues phenotypic alterations in a patient-specific model of recessive catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Cell Death & Disease* 7, e2393–e2393. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.304>

- Lopaschuk, G.D., Ussher, J.R., Folmes, C.D.L., Jaswal, J.S., Stanley, W.C., 2010. Myocardial fatty acid metabolism in health and disease. *Physiol Rev* 90, 207–258. <https://doi.org/10.1152/physrev.00015.2009>
- Lopatin, A.N., Nichols, C.G., 2001. Inward Rectifiers in the Heart: An Update on IK1. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 33, 625–638. <https://doi.org/10.1006/jmcc.2001.1344>
- Lundy, S.D., Zhu, W.-Z., Regnier, M., Laflamme, M.A., 2013. Structural and Functional Maturation of Cardiomyocytes Derived from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Dev* 22, 1991–2002. <https://doi.org/10.1089/scd.2012.0490>
- Luo, X., Pan, Z., Shan, H., Xiao, J., Sun, X., Wang, N., Lin, H., Xiao, L., Maguy, A., Qi, X.-Y., Li, Y., Gao, X., Dong, D., Zhang, Y., Bai, Y., Ai, J., Sun, L., Lu, H., Luo, X.-Y., Wang, Z., Lu, Y., Yang, B., Nattel, S., 2013. MicroRNA-26 governs profibrillatory inward-rectifier potassium current changes in atrial fibrillation. *J Clin Invest* 123, 1939–1951. <https://doi.org/10.1172/JCI62185>
- Ma, D.K., Bonaguidi, M.A., Ming, G., Song, H., 2009. Adult neural stem cells in the mammalian central nervous system. *Cell Res* 19, 672–682. <https://doi.org/10.1038/cr.2009.56>
- Ma, J., Guo, L., Fiene, S.J., Anson, B.D., Thomson, J.A., Kamp, T.J., Kolaja, K.L., Swanson, B.J., January, C.T., 2011. High purity human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: electrophysiological properties of action potentials and ionic currents. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 301, H2006–H2017. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00694.2011>
- Maeder, M.L., Linder, S.J., Cascio, V.M., Fu, Y., Ho, Q.H., Joung, J.K., 2013. CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nat Methods* 10, 977–979. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2598>
- Magyar, J., Iost, N., Körtvély, A., Bányász, T., Virág, L., Szigligeti, P., Varró, A., Opincariu, M., Szécsi, J., Papp, J.G., Nánási, P.P., 2000. Effects of endothelin-1 on calcium and potassium currents in undiseased human ventricular myocytes. *Pflugers Arch* 441, 144–149. <https://doi.org/10.1007/s004240000400>
- Maizels Leonid, Huber Irit, Arbel Gil, Tijssen Anke J., Gepstein Amira, Khoury Asaad, Gepstein Lior, 2017. Patient-Specific Drug Screening Using a Human Induced Pluripotent Stem Cell Model of Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia Type 2. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology* 10, e004725. <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.116.004725>
- Makarova, K.S., Wolf, Y.I., Alkhnbashi, O.S., Costa, F., Shah, S.A., Saunders, S.J., Barrangou, R., Brouns, S.J.J., Charpentier, E., Haft, D.H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F.J.M., Terns, R.M., Terns, M.P., White, M.F., Yakunin, A.F., Garrett, R.A., Oost, J. van der, Backofen, R., Koonin, E.V., 2015. An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 13, 722–736. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3569>
- Martin, T.G., Kirk, J.A., 2020. Under construction: The dynamic assembly, maintenance, and degradation of the cardiac sarcomere. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 148, 89–102. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2020.08.018>
- Maruyama, T., Dougan, S.K., Truttmann, M.C., Bilate, A.M., Ingram, J.R., Ploegh, H.L., 2015. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. *Nature Biotechnology* 33, 538–542. <https://doi.org/10.1038/nbt.3190>
- Mathur, A., Loskill, P., Shao, K., Huebsch, N., Hong, S., Marcus, S.G., Marks, N., Mandegar, M., Conklin, B.R., Lee, L.P., Healy, K.E., 2015. Human iPSC-based Cardiac Microphysiological System For Drug Screening Applications. *Scientific Reports* 5, 8883. <https://doi.org/10.1038/srep08883>
- Menasché, P., Vanneaux, V., Fabreguettes, J.-R., Bel, A., Tosca, L., Garcia, S., Bellamy, V., Farouz, Y., Pouly, J., Damour, O., Périer, M.-C., Desnos, M., Hagege, A.,

- Agbulut, O., Bruneval, P., Tachdjian, G., Trouvin, J.-H., Larghero, J., 2015. Towards a clinical use of human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors: a translational experience. *Eur Heart J* 36, 743–750. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehu192>
- Menasché, P., Vanneaux, V., Hagege, A., Bel, A., Cholley, B., Parouchev, A., Cacciapuoti, I., Al-Daccak, R., Benhamouda, N., Blons, H., Agbulut, O., Tosca, L., Trouvin, J.-H., Fabreguettes, J.-R., Bellamy, V., Charron, D., Tartour, E., Tachdjian, G., Desnos, M., Larghero, J., 2018. Transplantation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiovascular Progenitors for Severe Ischemic Left Ventricular Dysfunction. *J. Am. Coll. Cardiol.* 71, 429–438. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.11.047>
- Merki, E., Zamora, M., Raya, A., Kawakami, Y., Wang, J., Zhang, X., Burch, J., Kubalak, S.W., Kaliman, P., Izpisua Belmonte, J.C., Chien, K.R., Ruiz-Lozano, P., 2005. Epicardial retinoid X receptor alpha is required for myocardial growth and coronary artery formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18455–18460. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504343102>
- Meurs, K.M., Lahmers, S., Keene, B.W., White, S.N., Oyama, M.A., Mauceli, E., Lindblad-Toh, K., 2012. A splice site mutation in a gene encoding for PDK4, a mitochondrial protein, is associated with the development of dilated cardiomyopathy in the Doberman pinscher. *Hum Genet* 131, 1319–1325. <https://doi.org/10.1007/s00439-012-1158-2>
- Meyer, D.T., Leisgen, C., Gonser, B., Günther, E., 2004. QT-Screen: High-Throughput Cardiac Safety Pharmacology by Extracellular Electrophysiology on Primary Cardiac Myocytes [WWW Document]. <https://home.liebertpub.com/adt>. <https://doi.org/10.1089/adt.2004.2.507>
- Miake, J., Marbán, E., Nuss, H.B., 2003. Functional role of inward rectifier current in heart probed by Kir2.1 overexpression and dominant-negative suppression. *The Journal of Clinical Investigation* 111, 9.
- Miklas, J.W., Clark, E., Levy, S., Detraux, D., Leonard, A., Beussman, K., Showalter, M.R., Smith, A.T., Hofsteen, P., Yang, X., Macadangdang, J., Manninen, T., Raftery, D., Madan, A., Suomalainen, A., Kim, D.-H., Murry, C.E., Fiehn, O., Sniadecki, N.J., Wang, Y., Ruohola-Baker, H., 2019. TFPa/HADHA is required for fatty acid beta-oxidation and cardiolipin re-modeling in human cardiomyocytes. *Nature Communications* 10, 4671. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12482-1>
- Miller, J.C., Tan, S., Qiao, G., Barlow, K.A., Wang, J., Xia, D.F., Meng, X., Paschon, D.E., Leung, E., Hinkley, S.J., Dulay, G.P., Hua, K.L., Ankoudinova, I., Cost, G.J., Urnov, F.D., Zhang, H.S., Holmes, M.C., Zhang, L., Gregory, P.D., Rebar, E.J., 2011. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature Biotechnology* 29, 143–148. <https://doi.org/10.1038/nbt.1755>
- Mills, R.J., Parker, B.L., Quaife-Ryan, G.A., Voges, H.K., Needham, E.J., Bornot, A., Ding, M., Andersson, H., Polla, M., Elliott, D.A., Drowley, L., Clausen, M., Plowright, A.T., Barrett, I.P., Wang, Q.-D., James, D.E., Porrello, E.R., Hudson, J.E., 2019. Drug Screening in Human PSC-Cardiac Organoids Identifies Pro-proliferative Compounds Acting via the Mevalonate Pathway. *Cell Stem Cell* 24, 895-907.e6. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.03.009>
- Milstein, M.L., Musa, H., Balbuena, D.P., Anumonwo, J.M.B., Auerbach, D.S., Furspan, P.B., Hou, L., Hu, B., Schumacher, S.M., Vaidyanathan, R., Martens, J.R., Jalife, J., 2012. Dynamic reciprocity of sodium and potassium channel expression in a macromolecular complex controls cardiac excitability and arrhythmia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, E2134-2143. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109370109>
- Mohanraju, P., Makarova, K.S., Zetsche, B., Zhang, F., Koonin, E.V., Oost, J. van der, 2016. Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems. *Science* 353. <https://doi.org/10.1126/science.aad5147>

- Mohr, J.C., Zhang, J., Azarin, S.M., Soerens, A.G., de Pablo, J.J., Thomson, J.A., Lyons, G.E., Palecek, S.P., Kamp, T.J., 2010. The microwell control of embryoid body size in order to regulate cardiac differentiation of human embryonic stem cells. *Biomaterials* 31, 1885–1893. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.11.033>
- Mojica, F.J.M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J., Soria, E., 2005. Intervening Sequences of Regularly Spaced Prokaryotic Repeats Derive from Foreign Genetic Elements. *J Mol Evol* 60, 174–182. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>
- Mollova, M., Bersell, K., Walsh, S., Savla, J., Das, L.T., Park, S.-Y., Silberstein, L.E., Remedios, C.G. dos, Graham, D., Colan, S., Kühn, B., 2013. Cardiomyocyte proliferation contributes to heart growth in young humans. *PNAS* 110, 1446–1451. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214608110>
- Moretti, A., Bellin, M., Welling, A., Jung, C.B., Lam, J.T., Bott-Flügel, L., Dorn, T., Goedel, A., Höhnke, C., Hofmann, F., Seyfarth, M., Sinnecker, D., Schömig, A., Laugwitz, K.-L., 2010. Patient-Specific Induced Pluripotent Stem-Cell Models for Long-QT Syndrome. *New England Journal of Medicine* 363, 1397–1409. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0908679>
- Moss, A.J., Kass, R.S., 2005. Long QT syndrome: from channels to cardiac arrhythmias. *J Clin Invest* 115, 2018–2024. <https://doi.org/10.1172/JCI25537>
- Mummery, C.L., Ward, D., Passier, R., 2007. Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Cardiomyocytes by Coculture with Endoderm in Serum-Free Medium. *Current Protocols in Stem Cell Biology* 2, 1F.2.1-1F.2.14. <https://doi.org/10.1002/9780470151808.sc01f02s2>
- Mummery, C.L., Zhang, J., Ng, E.S., Elliott, D.A., Elefanty, A.G., Kamp, T.J., 2012. Differentiation of human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells to cardiomyocytes: a methods overview. *Circ. Res.* 111, 344–358. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.227512>
- Neri, T., Hiriart, E., van Vliet, P.P., Faure, E., Norris, R.A., Farhat, B., Jagla, B., Lefrancois, J., Sugi, Y., Moore-Morris, T., Zaffran, S., Faustino, R.S., Zambon, A.C., Desvignes, J.-P., Salgado, D., Levine, R.A., de la Pompa, J.L., Terzic, A., Evans, S.M., Markwald, R., Pucéat, M., 2019. Human pre-valvular endocardial cells derived from pluripotent stem cells recapitulate cardiac pathophysiological valvulogenesis. *Nature Communications* 10, 1929. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09459-5>
- Niu, Y., Shen, B., Cui, Y., Chen, Y., Wang, J., Wang, L., Kang, Y., Zhao, X., Si, W., Li, W., Xiang, A.P., Zhou, J., Guo, X., Bi, Y., Si, C., Hu, B., Dong, G., Wang, H., Zhou, Z., Li, T., Tan, T., Pu, X., Wang, F., Ji, S., Zhou, Q., Huang, X., Ji, W., Sha, J., 2014. Generation of Gene-Modified Cynomolgus Monkey via Cas9/RNA-Mediated Gene Targeting in One-Cell Embryos. *Cell* 156, 836–843. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.01.027>
- Noseda Michela, Peterkin Tessa, Simões Filipa C., Patient Roger, Schneider Michael D., 2011. Cardiopoietic Factors. *Circulation Research* 108, 129–152. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.223792>
- Novak, A., Barad, L., Lorber, A., Gherghiceanu, M., Reiter, I., Eisen, B., Eldor, L., Itskovitz-Eldor, J., Eldar, M., Arad, M., Binah, O., 2015. Functional abnormalities in iPSC-derived cardiomyocytes generated from CPVT1 and CPVT2 patients carrying ryanodine or calsequestrin mutations. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 19, 2006–2018. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12581>
- Nunes, S.S., Miklas, J.W., Liu, J., Aschar-Sobbi, R., Xiao, Y., Zhang, B., Jiang, J., Massé, S., Gagliardi, M., Hsieh, A., Thavandiran, N., Laflamme, M.A., Nanthakumar, K., Gross, G.J., Backx, P.H., Keller, G., Radisic, M., 2013. Biowire: a platform for maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Nat Methods* 10, 781–787. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2524>
- Paix, A., Folkmann, A., Goldman, D.H., Kulaga, H., Grzelak, M.J., Rasoloson, D., Paidemarry, S., Green, R., Reed, R.R., Seydoux, G., 2017. Precision genome

- editing using synthesis-dependent repair of Cas9-induced DNA breaks. *PNAS* 114, E10745–E10754. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711979114>
- Parikh, S.S., Blackwell, D.J., Gomez-Hurtado, N., Frisk, M., Wang, L., Kim, K., Dahl, C.P., Fiane, A., Tønnessen, T., Kryshtal, D.O., Louch, W.E., Knollmann, B.C., 2017. Thyroid and Glucocorticoid Hormones Promote Functional T-Tubule Development in Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Circ. Res.* 121, 1323–1330. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311920>
- Park, C.-Y., Kim, D.H., Son, J.S., Sung, J.J., Lee, J., Bae, S., Kim, J.-H., Kim, D.-W., Kim, J.-S., 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. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.07.001>
- Park, H., Park, I.Y., Kim, E., Youn, B., Fields, K., Dunker, A.K., Kang, C., 2004. Comparing Skeletal and Cardiac Calsequestrin Structures and Their Calcium Binding A PROPOSED MECHANISM FOR COUPLED CALCIUM BINDING AND PROTEIN POLYMERIZATION. *J. Biol. Chem.* 279, 18026–18033. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311553200>
- Park, I.-H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M.W., Cowan, C., Hochedlinger, K., Daley, G.Q., 2008. Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell* 134, 877–886. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.07.041>
- Parmacek, M.S., Solaro, R.J., 2004. Biology of the troponin complex in cardiac myocytes. *Progress in Cardiovascular Diseases, Troponins* 47, 159–176. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2004.07.003>
- Passier, R., Orlova, V., Mummery, C., 2016. Complex Tissue and Disease Modeling using hiPSCs. *Cell Stem Cell* 18, 309–321. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.02.011>
- Pérez-Bermejo, J.A., Kang, S., Rockwood, S.J., Simoneau, C.R., Joy, D.A., Ramadoss, G.N., Silva, A.C., Flanigan, W.R., Li, H., Nakamura, K., Whitman, J.D., Ott, M., Conklin, B.R., McDevitt, T.C., 2020. SARS-CoV-2 infection of human iPSC-derived cardiac cells predicts novel cytopathic features in hearts of COVID-19 patients. *bioRxiv* 2020.08.25.265561. <https://doi.org/10.1101/2020.08.25.265561>
- Plaster, N.M., Tawil, R., Tristani-Firouzi, M., Canún, S., Bendahhou, S., Tsunoda, A., Donaldson, M.R., Iannaccone, S.T., Brunt, E., Barohn, R., Clark, J., Deymeer, F., George, A.L., Fish, F.A., Hahn, A., Nitu, A., Ozdemir, C., Serdaroglu, P., Subramony, S.H., Wolfe, G., Fu, Y.-H., Ptáček, L.J., 2001. Mutations in Kir2.1 Cause the Developmental and Episodic Electrical Phenotypes of Andersen's Syndrome. *Cell* 105, 511–519. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00342-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00342-7)
- Ponce-Balbuena Daniela, Guerrero-Serna Guadalupe, Valdivia Carmen R., Caballero Ricardo, Diez-Guerra F. Javier, Jiménez-Vázquez Eric N., Ramírez Rafael J., Monteiro da Rocha André, Herron Todd J., Campbell Katherine F., Willis B. Cicero, Alvarado Francisco J., Zarzoso Manuel, Kaur Kuljeet, Pérez-Hernández Marta, Matamoros Marcos, Valdivia Héctor H., Delpón Eva, Jalife José, 2018. Cardiac Kir2.1 and NaV1.5 Channels Traffic Together to the Sarcolemma to Control Excitability. *Circulation Research* 122, 1501–1516. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.117.311872>
- Poon, E., Keung, W., Liang, Y., Ramalingam, R., Yan, B., Zhang, S., Chopra, A., Moore, J., Herren, A., Lieu, D.K., Wong, H.S., Weng, Z., Wong, O.T., Lam, Y.W., Tomaselli, G.F., Chen, C., Boheler, K.R., Li, R.A., 2015. Proteomic Analysis of Human Pluripotent Stem Cell-Derived, Fetal, and Adult Ventricular Cardiomyocytes Reveals Pathways Crucial for Cardiac Metabolism and Maturation. *Circ Cardiovasc Genet* 8, 427–436. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.114.000918>
- Postma, A.V., Denjoy, I., Hoorntje, T.M., Lupoglazoff, J.-M., Da Costa, A., Sebillon, P., Mannens, M.M.A.M., Wilde, A.A.M., Guicheney, P., 2002. Absence of calsequestrin

- 2 causes severe forms of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circ. Res.* 91, e21-26. <https://doi.org/10.1161/01.res.0000038886.18992.6b>
- Preininger, M.K., Jha, R., Maxwell, J.T., Wu, Q., Singh, M., Wang, B., Dalal, A., Mceachin, Z.T., Rossoll, W., Hales, C.M., Fischbach, P.S., Wagner, M.B., Xu, C., 2016. A human pluripotent stem cell model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia recapitulates patient-specific drug responses. *Disease Models & Mechanisms* 9, 927–939. <https://doi.org/10.1242/dmm.026823>
- Priori, S.G., Pandit, S.V., Rivolta, I., Berenfeld, O., Ronchetti, E., Dhamoon, A., Napolitano, C., Anumonwo, J., di Barletta, M.R., Gudapakkam, S., Bosi, G., Stramba-Badiale, M., Jalife, J., 2005. A novel form of short QT syndrome (SQT3) is caused by a mutation in the KCNJ2 gene. *Circ Res* 96, 800–807. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000162101.76263.8c>
- Prondzynski, M., Krämer, E., Laufer, S.D., Shibamiya, A., Pless, O., Flenner, F., Müller, O.J., Münch, J., Redwood, C., Hansen, A., Patten, M., Eschenhagen, T., Mearini, G., Carrier, L., 2017. Evaluation of MYBPC3 trans-Splicing and Gene Replacement as Therapeutic Options in Human iPSC-Derived Cardiomyocytes. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 7, 475–486. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2017.05.008>
- Protze, S.I., Lee, J.H., Keller, G.M., 2019. Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiovascular Cells: From Developmental Biology to Therapeutic Applications. *Cell Stem Cell* 25, 311–327. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.07.010>
- Protze, S.I., Liu, J., Nussinovitch, U., Ohana, L., Backx, P.H., Gepstein, L., Keller, G.M., 2017. Sinoatrial node cardiomyocytes derived from human pluripotent cells function as a biological pacemaker. *Nature Biotechnology* 35, 56–68. <https://doi.org/10.1038/nbt.3745>
- Qu, Y., Vargas, H.M., 2015. Proarrhythmia Risk Assessment in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Using the Maestro MEA Platform. *Toxicol. Sci.* 147, 286–295. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfv128>
- Ray, U., Raghavan, S.C., 2020. Modulation of DNA double-strand break repair as a strategy to improve precise genome editing. *Oncogene* 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-01445-2>
- Redell, J.B., Tempel, B.L., 1998. Multiple Promoter Elements Interact to Control the Transcription of the Potassium Channel Gene, KCNJ2. *J. Biol. Chem.* 273, 22807–22818. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.35.22807>
- Reifers, F., Walsh, E.C., Leger, S., Stainier, D.Y., Brand, M., 2000. Induction and differentiation of the zebrafish heart requires fibroblast growth factor 8 (*fgf8/acerebellar*). *Development* 127, 225–235.
- Reiser, P.J., Portman, M.A., Ning, X.H., Schomisch Moravec, C., 2001. Human cardiac myosin heavy chain isoforms in fetal and failing adult atria and ventricles. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280, H1814-1820. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.280.4.H1814>
- Ren, Y., Lee, M.Y., Schliffke, S., Paavola, J., Amos, P.J., Ge, X., Ye, M., Zhu, S., Senyei, G., Lum, L., Ehrlich, B.E., Qyang, Y., 2011. Small molecule Wnt inhibitors enhance the efficiency of BMP-4-directed cardiac differentiation of human pluripotent stem cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 51, 280–287. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.04.012>
- Renaud, J.-B., Boix, C., Charpentier, M., De Cian, A., Cochenne, J., Duvernois-Berthet, E., Perrouault, L., Tesson, L., Edouard, J., Thinard, R., Cherifi, Y., Menoret, S., Fontanière, S., de Crozé, N., Fraichard, A., Sohm, F., Anegon, I., Concordet, J.-P., Giovannangeli, C., 2016. Improved Genome Editing Efficiency and Flexibility Using Modified Oligonucleotides with TALEN and CRISPR-Cas9 Nucleases. *Cell Reports* 14, 2263–2272. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.02.018>
- Reyes-Juárez, J.L., Juárez-Rubí, R., Rodríguez, G., Zarain-Herzberg, A., 2007. Transcriptional Analysis of the Human Cardiac Calsequestrin Gene in Cardiac and

- Skeletal Myocytes. *J. Biol. Chem.* 282, 35554–35563.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M707788200>
- Ribeiro Alexandre J.S., Schwab Olivier, Mandegar Mohammad A., Ang Yen-Sin, Conklin Bruce R., Srivastava Deepak, Pruitt Beth L., 2017. Multi-Imaging Method to Assay the Contractile Mechanical Output of Micropatterned Human iPSC-Derived Cardiac Myocytes. *Circulation Research* 120, 1572–1583.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.310363>
- Ribeiro, M.C., Tertoolen, L.G., Guadix, J.A., Bellin, M., Kosmidis, G., D’Aniello, C., Monshouwer-Kloots, J., Goumans, M.-J., Wang, Y., Feinberg, A.W., Mummery, C.L., Passier, R., 2015. Functional maturation of human pluripotent stem cell derived cardiomyocytes in vitro – Correlation between contraction force and electrophysiology. *Biomaterials* 51, 138–150.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.01.067>
- Riesenberg, S., Chintalapati, M., Macak, D., Kanis, P., Maricic, T., Pääbo, S., 2019. Simultaneous precise editing of multiple genes in human cells. *Nucleic Acids Res* 47, e116–e116. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz669>
- Ritner, C., Wong, S.S.Y., King, F.W., Mihardja, S.S., Liszewski, W., Erle, D.J., Lee, R.J., Bernstein, H.S., 2011. An engineered cardiac reporter cell line identifies human embryonic stem cell-derived myocardial precursors. *PLoS One* 6, e16004.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016004>
- Robert, F., Barbeau, M., Éthier, S., Dostie, J., Pelletier, J., 2015. Pharmacological inhibition of DNA-PK stimulates Cas9-mediated genome editing. *Genome Medicine* 7, 93. <https://doi.org/10.1186/s13073-015-0215-6>
- Ronaldson-Bouchard, K., Ma, S.P., Yeager, K., Chen, T., Song, L., Sirabella, D., Morikawa, K., Teles, D., Yazawa, M., Vunjak-Novakovic, G., 2018. Advanced maturation of human cardiac tissue grown from pluripotent stem cells. *Nature* 556, 239–243. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0016-3>
- Rowe, R.G., Daley, G.Q., 2019. Induced pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nature Reviews Genetics* 20, 377–388.
<https://doi.org/10.1038/s41576-019-0100-z>
- Sadek, H., Olson, E.N., 2020. Toward the Goal of Human Heart Regeneration. *Cell Stem Cell* 26, 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.12.004>
- Sager, P.T., Gintant, G., Turner, J.R., Pettit, S., Stockbridge, N., 2014. Rechanneling the cardiac proarrhythmia safety paradigm: A meeting report from the Cardiac Safety Research Consortium. *American Heart Journal* 167, 292–300.
<https://doi.org/10.1016/j.ahj.2013.11.004>
- Salama, G., London, B., 2007. Mouse models of long QT syndrome. *The Journal of Physiology* 578, 43–53. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.118745>
- Schaaf, S., Shibamiya, A., Mewe, M., Eder, A., Stöhr, A., Hirt, M.N., Rau, T., Zimmermann, W.-H., Conradi, L., Eschenhagen, T., Hansen, A., 2011. Human engineered heart tissue as a versatile tool in basic research and preclinical toxicology. *PLoS One* 6, e26397. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026397>
- Schram, G., Pourrier, M., Wang, Z., White, M., Nattel, S., 2003. Barium block of Kir2 and human cardiac inward rectifier currents: evidence for subunit-heteromeric contribution to native currents. *Cardiovasc Res* 59, 328–338.
[https://doi.org/10.1016/S0008-6363\(03\)00366-3](https://doi.org/10.1016/S0008-6363(03)00366-3)
- Schram Gernot, Pourrier Marc, Melnyk Peter, Nattel Stanley, 2002. Differential Distribution of Cardiac Ion Channel Expression as a Basis for Regional Specialization in Electrical Function. *Circulation Research* 90, 939–950.
<https://doi.org/10.1161/01.RES.0000018627.89528.6F>
- Schultheiss, T.M., Burch, J.B., Lassar, A.B., 1997. A role for bone morphogenetic proteins in the induction of cardiac myogenesis. *Genes Dev* 11, 451–462.
<https://doi.org/10.1101/gad.11.4.451>

- Schwan, J., Campbell, S.G., 2015. Article Commentary: Prospects for In Vitro Myofilament Maturation in Stem Cell-Derived Cardiac Myocytes: Supplementary Issue: Stem Cell Biology. *Biomark. Insights* 10s1, BMI.S23912. <https://doi.org/10.4137/BMI.S23912>
- Scuderi, G.J., Butcher, J., 2017. Naturally Engineered Maturation of Cardiomyocytes. *Front Cell Dev Biol* 5. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00050>
- Shamblott, M.J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E.M., Littlefield, J.W., Donovan, P.J., Blumenthal, P.D., Huggins, G.R., Gearhart, J.D., 1998. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *PNAS* 95, 13726–13731. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.23.13726>
- Shao, S., Ren, C., Liu, Z., Bai, Y., Chen, Z., Wei, Z., Wang, X., Zhang, Z., Xu, K., 2017. Enhancing CRISPR/Cas9-mediated homology-directed repair in mammalian cells by expressing *Saccharomyces cerevisiae* Rad52. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 92, 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.09.012>
- Shiba, Y., Gomibuchi, T., Seto, T., Wada, Y., Ichimura, H., Tanaka, Y., Ogasawara, T., Okada, K., Shiba, N., Sakamoto, K., Ido, D., Shiina, T., Ohkura, M., Nakai, J., Uno, N., Kazuki, Y., Oshimura, M., Minami, I., Ikeda, U., 2016. Allogeneic transplantation of iPSC cell-derived cardiomyocytes regenerates primate hearts. *Nature* 538, 388–391. <https://doi.org/10.1038/nature19815>
- Shinnawi, R., Shaheen, N., Huber, I., Shiti, A., Arbel, G., Gepstein, A., Ballan, N., Setter, N., Tijssen, A.J., Borggrefe, M., Gepstein, L., 2019. Modeling Reentry in the Short QT Syndrome With Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Cell Sheets. *Journal of the American College of Cardiology* 73, 2310–2324. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2019.02.055>
- Silbernagel, N., Körner, A., Balitzki, J., Jaggy, M., Bertels, S., Richter, B., Hippler, M., Hellwig, A., Hecker, M., Bastmeyer, M., Ullrich, N.D., 2020. Shaping the heart: Structural and functional maturation of iPSC-cardiomyocytes in 3D-micro-scaffolds. *Biomaterials* 227, 119551. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119551>
- Sintra Grilo, L., Carrupt, P.-A., Abriel, H., 2010. Stereoselective Inhibition of the hERG1 Potassium Channel. *Front. Pharmacol.* 1. <https://doi.org/10.3389/fphar.2010.00137>
- Sleiman, Y., Souidi, M., Kumar, R., Yang, E., Jaffré, F., Zhou, T., Bernardin, A., Reiken, S., Cazorla, O., Kajava, A.V., Moreau, A., Pasquié, J.-L., Marks, A.R., Lerman, B.B., Chen, S., Cheung, J.W., Evans, T., Lacampagne, A., Meli, A.C., 2020. Modeling polymorphic ventricular tachycardia at rest using patient-specific induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *EBioMedicine* 60, 103024. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.103024>
- Smith, C., Gore, A., Yan, W., Abalde-Atristain, L., Li, Z., He, C., Wang, Y., Brodsky, R.A., Zhang, K., Cheng, L., Ye, Z., 2014. Whole-Genome Sequencing Analysis Reveals High Specificity of CRISPR/Cas9 and TALEN-Based Genome Editing in Human iPSCs. *Cell Stem Cell* 15, 12–13. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.06.011>
- Soldner, F., Laganière, J., Cheng, A.W., Hockemeyer, D., Gao, Q., Alagappan, R., Khurana, V., Golbe, L.I., Myers, R.H., Lindquist, S., Zhang, L., Guschin, D., Fong, L.K., Vu, B.J., Meng, X., Urnov, F.D., Rebar, E.J., Gregory, P.D., Zhang, H.S., Jaenisch, R., 2011. Generation of Isogenic Pluripotent Stem Cells Differing Exclusively at Two Early Onset Parkinson Point Mutations. *Cell* 146, 318–331. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.06.019>
- Song, J., Yang, D., Xu, J., Zhu, T., Chen, Y.E., Zhang, J., 2016. RS-1 enhances CRISPR/Cas9- and TALEN-mediated knock-in efficiency. *Nature Communications* 7, 10548. <https://doi.org/10.1038/ncomms10548>
- Sternberg, S.H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E.C., Doudna, J.A., 2014. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature* 507, 62–67. <https://doi.org/10.1038/nature13011>

- Sun, N., Yazawa, M., Liu, J., Han, L., Sanchez-Freire, V., Abilez, O.J., Navarrete, E.G., Hu, S., Wang, L., Lee, A., Pavlovic, A., Lin, S., Chen, R., Hajjar, R.J., Snyder, M.P., Dolmetsch, R.E., Butte, M.J., Ashley, E.A., Longaker, M.T., Robbins, R.C., Wu, J.C., 2012. Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cells as a Model for Familial Dilated Cardiomyopathy. *Science Translational Medicine* 4, 130ra47-130ra47. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003552>
- Sung, P., Klein, H., 2006. Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 739–750. <https://doi.org/10.1038/nrm2008>
- Sürün, D., Schneider, A., Mircetic, J., Neumann, K., Lansing, F., Paszkowski-Rogacz, M., Hänchen, V., Lee-Kirsch, M.A., Buchholz, F., 2020. Efficient Generation and Correction of Mutations in Human iPS Cells Utilizing mRNAs of CRISPR Base Editors and Prime Editors. *Genes (Basel)* 11. <https://doi.org/10.3390/genes11050511>
- Symington, L.S., 2014. End resection at double-strand breaks: mechanism and regulation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016436>
- Synnergren, J., Améen, C., Jansson, A., Sartipy, P., 2011. Global transcriptional profiling reveals similarities and differences between human stem cell-derived cardiomyocyte clusters and heart tissue. *Physiological Genomics* 44, 245–258. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00118.2011>
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S., 2007. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 131, 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
- Takahashi, K., Yamanaka, S., 2006. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126, 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Tapscott, S.J., Davis, R.L., Thayer, M.J., Cheng, P.F., Weintraub, H., Lassar, A.B., 1988. MyoD1: a nuclear phosphoprotein requiring a Myc homology region to convert fibroblasts to myoblasts. *Science* 242, 405–411. <https://doi.org/10.1126/science.3175662>
- Terentyev, D., Viatchenko-Karpinski, S., Vedamoorthyrao, S., Oduru, S., Györke, I., Williams, S.C., Györke, S., 2007. Protein–protein interactions between triadin and calsequestrin are involved in modulation of sarcoplasmic reticulum calcium release in cardiac myocytes. *The Journal of Physiology* 583, 71–80. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2007.136879>
- Thompson, R.P., Fitzharris, T.P., Denslow, S., LeRoy, E.C., 1979. Collagen synthesis in the developing chick heart. *Tex Rep Biol Med* 39, 305–319.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M., 1998. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* 282, 1145–1147. <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>
- Tilgner, K., Neganova, I., Moreno-Gimeno, I., AL-Aama, J.Y., Burks, D., Yung, S., Singhapol, C., Saretzki, G., Evans, J., Gorbunova, V., Gennery, A., Przyborski, S., Stojkovic, M., Armstrong, L., Jeggo, P., Lako, M., 2013. A human iPSC model of Ligase IV deficiency reveals an important role for NHEJ-mediated-DSB repair in the survival and genomic stability of induced pluripotent stem cells and emerging haematopoietic progenitors. *Cell Death Differ* 20, 1089–1100. <https://doi.org/10.1038/cdd.2013.44>
- Tirziu, D., Giordano, F.J., Simons, M., 2010. Cell Communications in the Heart. *Circulation* 122, 928–937. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.847731>
- Tohyama, S., Hattori, F., Sano, M., Hishiki, T., Nagahata, Y., Matsuura, T., Hashimoto, H., Suzuki, T., Yamashita, H., Satoh, Y., Egashira, T., Seki, T., Muraoka, N.,

- Yamakawa, H., Ohgino, Y., Tanaka, T., Yoichi, M., Yuasa, S., Murata, M., Suematsu, M., Fukuda, K., 2013. Distinct Metabolic Flow Enables Large-Scale Purification of Mouse and Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Cell Stem Cell* 12, 127–137. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.09.013>
- Truskey, G.A., 2018. Human Microphysiological Systems and Organoids as in Vitro Models for Toxicological Studies. *Front. Public Health* 6. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2018.00185>
- Uosaki, H., Cahan, P., Lee, D.I., Wang, S., Miyamoto, M., Fernandez, L., Kass, D.A., Kwon, C., 2015. Transcriptional Landscape of Cardiomyocyte Maturation. *Cell Reports* 13, 1705–1716. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.10.032>
- Uosaki, H., Fukushima, H., Takeuchi, A., Matsuoka, S., Nakatsuji, N., Yamanaka, S., Yamashita, J.K., 2011. Efficient and scalable purification of cardiomyocytes from human embryonic and induced pluripotent stem cells by VCAM1 surface expression. *PLoS One* 6, e23657. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023657>
- Vaidyanathan, R., Markandeya, Y.S., Kamp, T.J., Makielski, J.C., January, C.T., Eckhardt, L.L., 2016. IK1-enhanced human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: an improved cardiomyocyte model to investigate inherited arrhythmia syndromes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 310, H1611-1621. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00481.2015>
- Valerie, K., Povirk, L.F., 2003. Regulation and mechanisms of mammalian double-strand break repair. *Oncogene* 22, 5792–5812. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206679>
- Valls-Margarit, M., Iglesias-García, O., Di Guglielmo, C., Sarlabous, L., Tadevosyan, K., Paoli, R., Comelles, J., Blanco-Almazán, D., Jiménez-Delgado, S., Castillo-Fernández, O., Samitier, J., Jané, R., Martínez, E., Raya, Á., 2019. Engineered Macroscale Cardiac Constructs Elicit Human Myocardial Tissue-like Functionality. *Stem Cell Reports* 13, 207–220. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.05.024>
- van den Heuvel, N.H.L., van Veen, T.A.B., Lim, B., Jonsson, M.K.B., 2014. Lessons from the heart: Mirroring electrophysiological characteristics during cardiac development to in vitro differentiation of stem cell derived cardiomyocytes. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 67, 12–25. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.12.011>
- Varghese, A., 2016. Reciprocal Modulation of IK1-INa Extends Excitability in Cardiac Ventricular Cells. *Front Physiol* 7, 542. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00542>
- Veerman, C.C., Kosmidis, G., Mummery, C.L., Casini, S., Verkerk, A.O., Bellin, M., 2015. Immaturity of human stem-cell-derived cardiomyocytes in culture: fatal flaw or soluble problem? *Stem Cells Dev* 24, 1035–1052. <https://doi.org/10.1089/scd.2014.0533>
- Vincent, S.D., Buckingham, M.E., 2010. Chapter One - How to Make a Heart: The Origin and Regulation of Cardiac Progenitor Cells, in: Koopman, P. (Ed.), *Current Topics in Developmental Biology, Organogenesis in Development*. Academic Press, pp. 1–41. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(10\)90001-X](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(10)90001-X)
- Wainger, B.J., Kiskinis, E., Mellin, C., Wiskow, O., Han, S.S.W., Sandoe, J., Perez, N.P., Williams, L.A., Lee, S., Boulting, G., Berry, J.D., Brown, R.H., Cudkovicz, M.E., Bean, B.P., Eggan, K., Woolf, C.J., 2014. Intrinsic Membrane Hyperexcitability of Amyotrophic Lateral Sclerosis Patient-Derived Motor Neurons. *Cell Reports* 7, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.019>
- Walker, J.R., Corpina, R.A., Goldberg, J., 2001. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature* 412, 607–614. <https://doi.org/10.1038/35088000>
- Wang, G., McCain, M.L., Yang, L., He, A., Pasqualini, F.S., Agarwal, A., Yuan, H., Jiang, D., Zhang, D., Zangi, L., Geva, J., Roberts, A.E., Ma, Q., Ding, J., Chen, J., Wang, D.-Z., Li, K., Wang, J., Wanders, R.J.A., Kulik, W., Vaz, F.M., Laflamme, M.A., Murry, C.E., Chien, K.R., Kelley, R.I., Church, G.M., Parker, K.K., Pu, W.T., 2014. Modeling the mitochondrial cardiomyopathy of Barth syndrome with induced

- pluripotent stem cell and heart-on-chip technologies. *Nat Med* 20, 616–623. <https://doi.org/10.1038/nm.3545>
- Wang, H., Yang, H., Shivalila, C.S., Dawlaty, M.M., Cheng, A.W., Zhang, F., Jaenisch, R., 2013. One-Step Generation of Mice Carrying Mutations in Multiple Genes by CRISPR/Cas-Mediated Genome Engineering. *Cell* 153, 910–918. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.025>
- Wang, Q., Michalak, M., 2020. Calsequestrin. Structure, function, and evolution. *Cell Calcium* 90, 102242. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2020.102242>
- Wang, S., Trumble, W.R., Liao, H., Wesson, C.R., Dunker, A.K., Kang, C., 1998. Crystal structure of calsequestrin from rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Nature Structural Biology* 5, 476–483. <https://doi.org/10.1038/nsb0698-476>
- Wang, Y., Liang, P., Lan, F., Wu, H., Lisowski, L., Gu, M., Hu, S., Kay, M.A., Urnov, F.D., Shinnawi, R., Gold, J.D., Gepstein, L., Wu, J.C., 2014. Genome Editing of Isogenic Human Induced Pluripotent Stem Cells Recapitulates Long QT Phenotype for Drug Testing. *Journal of the American College of Cardiology* 64, 451–459. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.04.057>
- Wang Zhiguo, Yue Lixia, White Michel, Pelletier Guy, Nattel Stanley, 1998. Differential Distribution of Inward Rectifier Potassium Channel Transcripts in Human Atrium Versus Ventricle. *Circulation* 98, 2422–2428. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.98.22.2422>
- Warren, L., Manos, P.D., Ahfeldt, T., Loh, Y.-H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P.K., Smith, Z.D., Meissner, A., Daley, G.Q., Brack, A.S., Collins, J.J., Cowan, C., Schlaeger, T.M., Rossi, D.J., 2010. Highly Efficient Reprogramming to Pluripotency and Directed Differentiation of Human Cells with Synthetic Modified mRNA. *Cell Stem Cell* 7, 618–630. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.08.012>
- Watanabe, K., Ueno, M., Kamiya, D., Nishiyama, A., Matsumura, M., Wataya, T., Takahashi, J.B., Nishikawa, Satomi, Nishikawa, Shin-ichi, Muguruma, K., Sasai, Y., 2007. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* 25, 681–686. <https://doi.org/10.1038/nbt1310>
- Wheelwright, M., Mikkila, J., Bedada, F.B., Mandegar, M.A., Thompson, B.R., Metzger, J.M., 2020. Advancing physiological maturation in human induced pluripotent stem cell-derived cardiac muscle by gene editing an inducible adult troponin isoform switch. *STEM CELLS* 38, 1254–1266. <https://doi.org/10.1002/stem.3235>
- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., Campbell, K.H.S., 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810–813. <https://doi.org/10.1038/385810a0>
- Witty, A.D., Mihic, A., Tam, R.Y., Fisher, S.A., Mikryukov, A., Shoichet, M.S., Li, R.-K., Kattman, S.J., Keller, G., 2014. Generation of the epicardial lineage from human pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology* 32, 1026–1035. <https://doi.org/10.1038/nbt.3002>
- Wu, H., Lee, J., Vincent, L.G., Wang, Q., Gu, M., Lan, F., Churko, J.M., Sallam, K.I., Matsa, E., Sharma, A., Gold, J.D., Engler, A.J., Xiang, Y.K., Bers, D.M., Wu, J.C., 2015. Epigenetic Regulation of Phosphodiesterases 2A and 3A Underlies Compromised β -Adrenergic Signaling in an iPSC Model of Dilated Cardiomyopathy. *Cell Stem Cell* 17, 89–100. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.04.020>
- Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R.C., Spiegelman, B.M., 1999. Mechanisms Controlling Mitochondrial Biogenesis and Respiration through the Thermogenic Coactivator PGC-1. *Cell* 98, 115–124. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80611-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80611-X)
- Yamauchi, K., Li, J., Morikawa, K., Liu, L., Shirayoshi, Y., Nakatsuji, N., Elliott, D.A., Hisatome, I., Suemori, H., 2018. Isolation and characterization of ventricular-like cells derived from NKX2-5eGFP/w and MLC2vmCherry/w double knock-in human

- pluripotent stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 495, 1278–1284. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.133>
- Yang, B., Lin, H., Xiao, J., Lu, Y., Luo, X., Li, B., Zhang, Y., Xu, C., Bai, Y., Wang, H., Chen, G., Wang, Z., 2007. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2. *Nature Medicine* 13, 486–491. <https://doi.org/10.1038/nm1569>
- Yang, L., Soonpaa, M.H., Adler, E.D., Roepke, T.K., Kattman, S.J., Kennedy, M., Henckaerts, E., Bonham, K., Abbott, G.W., Linden, R.M., Field, L.J., Keller, G.M., 2008. Human cardiovascular progenitor cells develop from a KDR+ embryonic-stem-cell-derived population. *Nature* 453, 524–528. <https://doi.org/10.1038/nature06894>
- Yang, X., Pabon, L., Murry, C.E., 2014. Engineering adolescence: maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Circ Res* 114, 511–523. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.114.300558>
- Yang, X., Rodriguez, M.L., Leonard, A., Sun, L., Fischer, K.A., Wang, Y., Ritterhoff, J., Zhao, L., Kolwicz, S.C., Pabon, L., Reinecke, H., Sniadecki, N.J., Tian, R., Ruohola-Baker, H., Xu, H., Murry, C.E., 2019. Fatty Acids Enhance the Maturation of Cardiomyocytes Derived from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports* 13, 657–668. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.08.013>
- Yano, K., Morotomi-Yano, K., Akiyama, H., 2009. Cernunnos/XLF: a new player in DNA double-strand break repair. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 1237–1240. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.10.005>
- Yazawa, M., Hsueh, B., Jia, X., Pasca, A.M., Bernstein, J.A., Hallmayer, J., Dolmetsch, R.E., 2011. Using induced pluripotent stem cells to investigate cardiac phenotypes in Timothy syndrome. *Nature* 471, 230–234. <https://doi.org/10.1038/nature09855>
- Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I.I., Thomson, J.A., 2009. Human Induced Pluripotent Stem Cells Free of Vector and Transgene Sequences. *Science* 324, 797–801. <https://doi.org/10.1126/science.1172482>
- Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I.I., Thomson, J.A., 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917–1920. <https://doi.org/10.1126/science.1151526>
- Yusa, K., Rashid, S.T., Strick-Marchand, H., Varela, I., Liu, P.-Q., Paschon, D.E., Miranda, E., Ordóñez, A., Hannan, N.R.F., Rouhani, F.J., Darce, S., Alexander, G., Marciniak, S.J., Fusaki, N., Hasegawa, M., Holmes, M.C., Di Santo, J.P., Lomas, D.A., Bradley, A., Vallier, L., 2011. Targeted gene correction of $\alpha 1$ -antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells. *Nature* 478, 391–394. <https://doi.org/10.1038/nature10424>
- Zeisberg, E.M., Ma, Q., Juraszek, A.L., Moses, K., Schwartz, R.J., Izumo, S., Pu, W.T., 2005. Morphogenesis of the right ventricle requires myocardial expression of Gata4. *J Clin Invest* 115, 1522–1531. <https://doi.org/10.1172/JCI23769>
- Zhang, D., Shadrin, I., Lam, J., Xian, H.-Q., Snodgrass, R., Bursac, N., 2013. Tissue-engineered Cardiac Patch for Advanced Functional Maturation of Human ESC-derived Cardiomyocytes. *Biomaterials* 34, 5813–5820. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.04.026>
- Zhang, J.-P., Li, X.-L., Li, G.-H., Chen, W., Arakaki, C., Botimer, G.D., Baylink, D., Zhang, L., Wen, W., Fu, Y.-W., Xu, J., Chun, N., Yuan, W., Cheng, T., Zhang, X.-B., 2017. Efficient precise knockin with a double cut HDR donor after CRISPR/Cas9-mediated double-stranded DNA cleavage. *Genome Biology* 18, 35. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1164-8>
- Zhang, J.Z., Termglinchan, V., Shao, N.-Y., Itzhaki, I., Liu, C., Ma, N., Tian, L., Wang, V.Y., Chang, A.C.Y., Guo, H., Kitani, T., Wu, H., Lam, C.K., Kodo, K., Sayed, N., Blau, H.M., Wu, J.C., 2019. A Human iPSC Double-Reporter System Enables

- Purification of Cardiac Lineage Subpopulations with Distinct Function and Drug Response Profiles. *Cell Stem Cell* 24, 802-811.e5.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.02.015>
- Zhang, L., Kelley, J., Schmeisser, G., Kobayashi, Y.M., Jones, L.R., 1997. Complex Formation between Junctin, Triadin, Calsequestrin, and the Ryanodine Receptor PROTEINS OF THE CARDIAC JUNCTIONAL SARCOPLASMIC RETICULUM MEMBRANE. *J. Biol. Chem.* 272, 23389–23397.
<https://doi.org/10.1074/jbc.272.37.23389>
- Zhang, Q., Jiang, J., Han, P., Yuan, Q., Zhang, J., Zhang, X., Xu, Y., Cao, H., Meng, Q., Chen, L., Tian, T., Wang, X., Li, P., Hescheler, J., Ji, G., Ma, Y., 2011. Direct differentiation of atrial and ventricular myocytes from human embryonic stem cells by alternating retinoid signals. *Cell Research* 21, 579–587.
<https://doi.org/10.1038/cr.2010.163>
- Zhao, J., Cao, H., Tian, L., Huo, W., Zhai, K., Wang, P., Ji, G., Ma, Y., 2016. Efficient Differentiation of TBX18+/WT1+ Epicardial-Like Cells from Human Pluripotent Stem Cells Using Small Molecular Compounds. *Stem Cells and Development* 26, 528–540. <https://doi.org/10.1089/scd.2016.0208>
- Zhao, Y., Rafatian, N., Feric, N.T., Cox, B.J., Aschar-Sobbi, R., Wang, E.Y., Aggarwal, P., Zhang, B., Conant, G., Ronaldson-Bouchard, K., Pahnke, A., Protze, S., Lee, J.H., Davenport Huyer, L., Jekic, D., Wickeler, A., Naguib, H.E., Keller, G.M., Vunjak-Novakovic, G., Broeckel, U., Backx, P.H., Radisic, M., 2019. A Platform for Generation of Chamber-Specific Cardiac Tissues and Disease Modeling. *Cell* 176, 913-927.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.11.042>
- Zwaka, T.P., Thomson, J.A., 2009. Chapter 46 - Homologous Recombination in Human Embryonic Stem Cells, in: Lanza, R., Gearhart, J., Hogan, B., Melton, D., Pedersen, R., Thomas, E.D., Thomson, J., Wilmut, I. (Eds.), *Essentials of Stem Cell Biology* (Second Edition). Academic Press, San Diego, pp. 417–422.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374729-7.00046-9>

Remerciements

Tout d'abord, je remercie la Pr Patricia Lemarchand et le Dr Albano Meli de m'avoir fait l'honneur de juger mon travail de thèse en qualité de rapporteurs. J'associe ces remerciements au Pr Onnik Agbulut, au Dre Nathalie Gaborit et au Dre Ana-Maria Gomez pour avoir accepté d'examiner mon travail.

Un infini merci à Jean-Michel & Jean-Paul, cela a été un immense privilège d'apprendre à vos côtés. Je ne pense pas que j'aurais pu trouver de meilleurs encadrants pour ma thèse. Je vous remercie d'avoir toujours cru en moi et d'avoir mis en œuvre tous moyens possibles pour maintenir le projet malgré les embuches et les difficultés rencontrées. Pour tout ce que vous m'avez apporté au cours de ces années de thèse, Je vous en serai reconnaissant jusqu'à la fin de ma vie

Carine, je te remercie du fond du cœur pour ta bienveillance tout au long de cette thèse et tes mots réconfortants lorsque les expériences ne fonctionnaient pas. De même, je t'exprime toute ma gratitude pour ton aide lors de la finalisation du manuscrit et pour la préparation de la soutenance.

Bruno, cela a été un honneur de s'instruire et de collaborer avec toi. Je tiens à exprimer ma gratitude pour ton soutien, pour le partage de tes connaissances et pour t'être toujours montré disponible pour mon projet ainsi que pour répondre à mes questions. Pour tout cela, Je t'en suis infiniment reconnaissant.

Je tiens à remercier l'équipe de choc d'électrophysiologie de Chilly et particulièrement Galadriel, Camille, Valérie et Nicolas R. qui ont fait un travail monumental pour la caractérisation de nos différentes lignées d'hiPSC-CMs. Cela a été un plaisir de travailler avec vous. Je remercie également Céline Chantoiseau qui m'a révélé les secrets du MEA et qui s'est montré très patiente malgré mes nombreuses questions.

Je remercie mes super collègues du labo, Gwenaëlle et Sandra, pour leur gentillesse et leur longanimité ainsi que pour leurs aides et leurs conseils techniques précieux tout au long de la thèse.

Merci à Litchy pour son formidable travail qui a permis de mettre au point l'approche CRISPRa et je m'excuse de ne pas avoir su trouver le temps pour développer davantage cette approche dans les hiPSC-CMs. Cela a été très plaisant et amusant de travailler avec toi.

Dorine, Nicole, Sophie, Céline, Karine, Nicolas B., Sabrina, Victoire, Matthew... Vous avez contribué à rendre ces longues années de thèse vivantes et enrichissantes. Je vous remercie pour votre aide (notamment les astreintes !) et votre soutien tout au long de cette thèse.

Je remercie également George, Annick, Christophe L. et Christophe M. pour les conseils et les discussions intéressantes à propos du système CRISPR/Cas9.

Merci à Khadija, Alice, Sylvain, Marwan, Anne, Loic, Charlotte, Michel, Laureline, Jean Baptiste R., Marine, Gabriel, Loic, Sheldon, Jean, Astrid, Alexandra et Jean-Baptiste B. pour l'ambiance joviale qui règne au sein de nos différentes équipes au Muséum. Cela a été très agréable de vous côtoyer et de partager des instants de paillasses avec vous.

Je remercie Cécile Orsini, Marie-Christine Multon et Vincent Mikol pour leur soutien tout le long de cette thèse ainsi que tous les membres de l'UST de Sanofi et ceux de l'unité StrInG au Muséum.

Enfin, je remercie mon frère & ma belle-sœur, mes grands-parents, mes oncles, mes tantes, mes cousins et mes cousines ainsi que mes amis pour leur soutien et leurs encouragements tout au long de cette aventure. Cette thèse n'aurait pu être réalisée sans l'aide de Malikul Muluk et je Le remercie et je Le loue pour cela. Pour finir, je dédie cette thèse à mes parents, à qui je dois tout, et sans qui je n'aurais pu aller jusqu'au bout de ce doctorat...

Baba, Mama, you are the real PhDs.

Genome editing to generate efficiently mature human induced pluripotent stem cell-derived ventricular cardiomyocytes

Keywords: genome editing, human induced pluripotent stem cells, cardiomyocytes, maturation, *KCNJ2*, *CASQ2*

Abstract : Human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (hiPSC-CMs) are a very promising model for several scientific and therapeutic applications ranging from disease modeling to drug discovery, and from predictive toxicology to regenerative medicine. Despite numerous efforts, current protocols do not yet lead to a maturation phenotype equivalent to adult human myocardium. Indeed, key features of hiPSC-CMs remaining closer to fetal stages of development, such as gene expression, electrophysiology and function. Transcriptome analysis performed at Sanofi have confirmed these findings at the genome-wide level. Indeed, *KCNJ2* and *CASQ2* which are implicated in the two major physiological characteristics of cardiac cells, their electrophysiological behavior and calcium handling, respectively, were expressed at very low levels in hiPSC-CMs in comparison with adult cardiomyocytes. This thesis aimed to improve the maturation of hiPSC-CMs by using genome editing technologies. We generated stable hiPSC-CMs with inducible expression of *KCNJ2*, or *CASQ2* or both genes (*KCNJ2*-*CASQ2* hiPSC-CMs) and studied their functional and electrophysiological phenotype by several complementary methods. Upon doxycycline induction of *KCNJ2* and *CASQ2*, *KCNJ2*-*CASQ2* hiPSC-CMs displayed phenotypic benefits expected from previous studies of each maturation gene, including a drastic reduction of spontaneous beating, hyperpolarized resting membrane potential, shortened action potential duration and enhanced calcium transients. In addition, co-expression of the two genes enhanced Na^+ spike slope of extracellular field potential and Ca^{2+} handling. We tested four reference drugs and observed signatures of known cardiac effects in *KCNJ2*-*CASQ2* hiPSC-CMs, including arrhythmias induced by QT prolonging drug (E-4031), which were more easily detected than in control hiPSC-CMs. Therefore, *KCNJ2*-*CASQ2* hiPSC-CMs exhibited a more mature phenotype than hiPSC-CMs and such genetically engineered hiPSC-CMs could be useful for testing cardiac toxicity of novel candidate drugs.

Utilisation de technologies d'édition du génome afin de générer des cardiomyocytes matures à partir de cellules souches pluripotentes humaines induites

Mots clés : édition du génome, cellules souches pluripotentes humaines induites, cardiomyocytes, maturation, *KCNJ2*, *CASQ2*

Résumé : Les cardiomyocytes dérivés des cellules souches pluripotentes humaines induites (hiPSC-CMs) représentent des modèles *in vitro* prometteurs pour plusieurs applications scientifiques et thérapeutiques allant de la modélisation de pathologies à la découverte de médicaments et de la toxicologie prédictive à la médecine régénérative. Malgré les nombreux progrès dans ce domaine, les protocoles de différenciation actuels ne permettent pas d'atteindre le stade de maturité que l'on retrouve chez le myocarde adulte de l'Homme. En effet, certaines caractéristiques majeures des hiPSC-CMs demeurent similaires à celles de cardiomyocytes fœtaux telles que l'expression de plusieurs gènes cardiaques, l'électrophysiologie ou leur fonction contractile. En effet, des analyses transcriptomiques réalisés au sein de notre laboratoire à Sanofi ont révélé que les gènes *KCNJ2* et *CASQ2*, impliqués respectivement dans l'électrophysiologie et la gestion du calcium, étaient sous-exprimés dans les hiPSC-CMs en comparaison aux cardiomyocytes adultes. Cette thèse avait pour objectif d'améliorer la maturation des hiPSC-CMs en utilisant des technologies d'édition du génome. Ainsi, nous avons généré des lignées stables de hiPSC-CMs qui expriment de manière inducible *KCNJ2* ou *CASQ2* ou les deux gènes simultanément puis nous avons examiné leurs phénotypes fonctionnels et électrophysiologiques par le biais de méthodes d'analyses complémentaires. A la suite à l'induction de l'expression de *KCNJ2* et *CASQ2* par la doxycycline, les hiPSC-CMs montraient des bénéfices phénotypiques tels que la diminution drastique de la fréquence des battements spontanés, une hyperpolarisation du potentiel de repos membranaire, la diminution de la durée du potentiel d'action et l'amélioration du flux de calcium transitoire. En plus de ces bénéfices attendus, l'expression concomitante de ces deux gènes a amélioré la pente de la pointe du potentiel de champ extracellulaire associée au courant sodique ainsi que la gestion du calcium. Nous avons ensuite évalué le bénéfice de l'expression de ces transgènes sur la toxicologie prédictive en testant des molécules agonistes ou antagonistes de canaux ioniques utilisées classiquement dans le cadre des essais précliniques de toxicité cardiaque. Nous avons notamment observé plus d'arythmies induites par l'E4031 avec les hiPSC-CMs exprimant conjointement *KCNJ2* et *CASQ2* par rapport aux cardiomyocytes contrôles. Ainsi, les hiPSC-CMs exprimant simultanément *KCNJ2* et *CASQ2* présentent un phénotype plus mature que les hiPSC-CMs natifs et de tels cardiomyocytes édités génétiquement peuvent être utiles pour l'évaluation de la toxicité cardiaque de nouveaux candidats médicaments.