

Intérêt des cellules iPS pour l'étude de pathologies cardiaques

N. Gaborit

L'institut du thorax

Plan du cours

□ Introduction générale

- Modèles d'étude classiques de pathologies cardiaques
- Cellules souches
- Technologie des cellules iPS

□ Aspects technologiques

- Comment générer des cellules iPS
- Comment caractériser des cellules iPS
- Comment générer des iPS-CMs
- Comment caractériser des iPS-CMs

□ Exemples de modélisation de pathologies du rythme cardiaque à l'aide d'iPS-CMs

Plan du cours

□ Introduction générale

- Modèles d'étude classiques de pathologies cardiaques
- Cellules souches
- Technologie des cellules iPS

□ Aspects technologiques

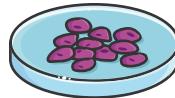
- Comment générer des cellules iPS
- Comment caractériser des cellules iPS
- Comment générer des iPS-CMs
- Comment caractériser des iPS-CMs

□ Exemples de modélisation de pathologies du rythme cardiaque à l'aide d'iPS-CMs

Modèles physiopathologiques de pathologies humaines

Modèles *in vitro*

Lignées cellulaires immortalisées (Cos-7, HEK293)



Origine animale
Origine humaine

Cultures primaires de cardiomyocytes



Origine animale

Evaluation de l'effet d'une mutation d'un canal ionique sur sa fonction.

- Surexpression de la forme mutée ou sauvage d'un canal ionique
- Analyse :
 - du transport du canal à la membrane
 - du courant ionique résultant

Bellocq C, et al. Circulation. 2004
Gouas L, et al. Cardiovasc Res. 2004

Modèle cardiaque de culture cellulaire pour analyses morphologiques, biochimiques et électrophysiologiques

Caractérisation du couplage excitation-contraction dans les myocytes ventriculaires néonataux de rat.

Korhonen T, et al. Biophys J. 2009

Modèles physiopathologiques de pathologies humaines

Modèles *in vivo*

Animaux transgéniques



Souris
Rat

Meilleure connaissance de la physiologie cardiaque et des pathologies

- Expression d'une mutation humaine / délétion d'un gène
- Analyse de l'effet de la mutation à l'échelle de l'organe

Modèle de souris du syndrome de Lenègre: ralentissement de la conduction cardiaque héréditaire

- Chez l'homme: Mutation perte de fonction d'un canal ionique (SCN5A) et défauts de conduction
- Chez la souris: Invalidation du gène SCN5A pour modéliser la pathologie

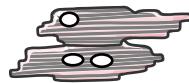
Résultats:

- fibrose dans le myocarde ventriculaire
- expression hétérogène de la Connexine 43 (protéine de la conduction)

Limites des modèles de pathologies

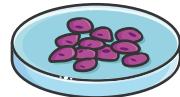
Modèles *in vitro*

Cultures primaires



Origine animale

Lignées cellulaires immortalisées



Pas de patrimoine génétique

Modèles *in vivo*

Animaux transgéniques



Patrimoine génétique et fonction biologiques différentes

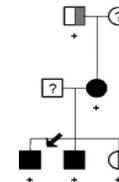
Hétérogénéité



Clinique



Génétique



Phénotypique

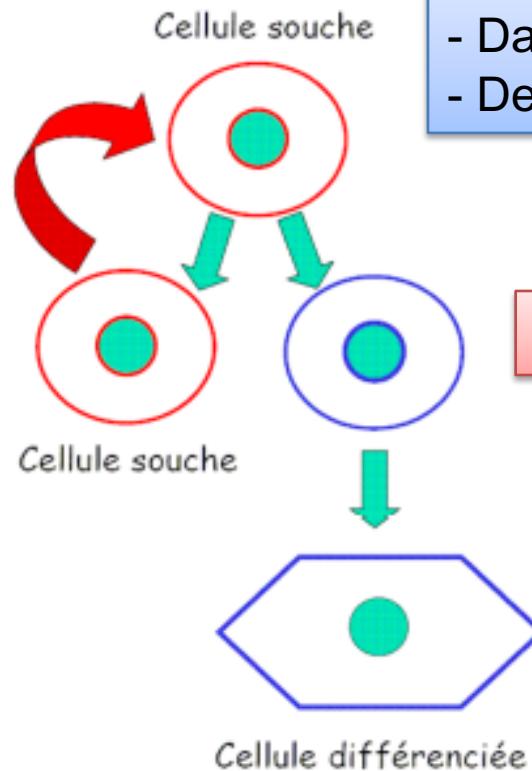
Nécessité de disposer de nouveaux outils pour comprendre les mécanismes cellulaires à l'origine des pathologies

Les cellules souches pluripotentes induites: étude des pathologies humaines

Cellule souche: définition

Cellule indifférenciée ayant la capacité de se diviser à l'identique de manière indéfinie et de produire des cellules différenciées

Auto-renouvellement



- Rares ($1/10^6$)
- Dans tous les organismes vivants
- De l'embryon au tissu adulte

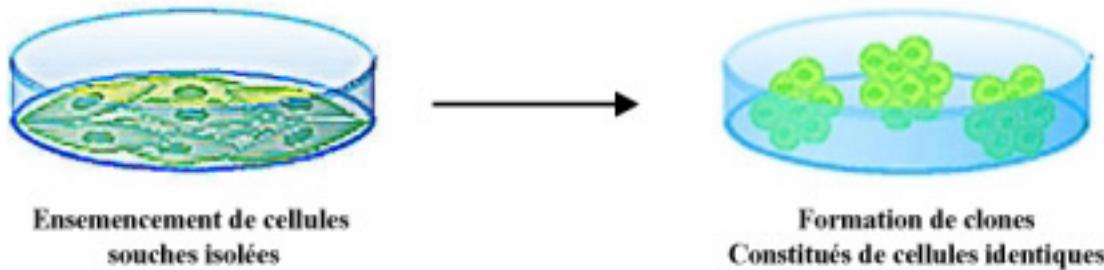
Différenciation

Auto-renouvellement

Capacité d'une cellule à se diviser à l'identique pendant une période indéfinie

→ Conduit à la formation d'un clone cellulaire

La multiplication des cellules souches sans différenciation permet d'entretenir un pool de cellules souches primitives



Différenciation

Capacité d'une cellule à donner, dans un environnement défini, différents types cellulaires fonctionnels

- ❑ Engagement irréversible d'une cellule souche vers une lignée
- ❑ Influence de facteurs intrinsèques et/ou environnementaux
- ❑ La cellule perd sa capacité d'auto-renouvellement

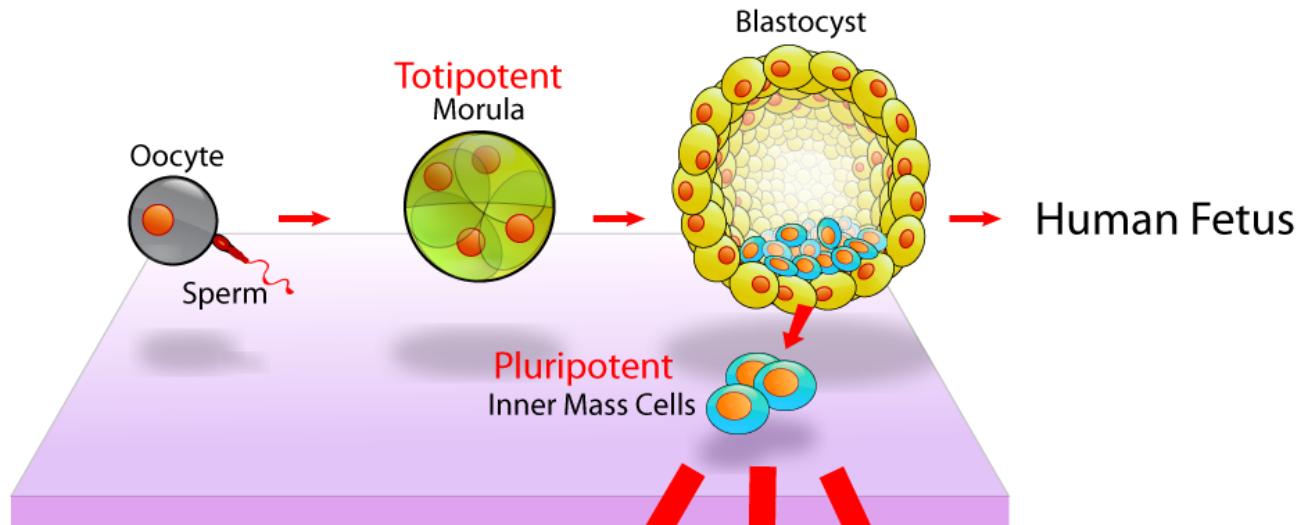


programme d'expression génique spécifique

Potentiel de différenciation

- Les cellules souches sont caractérisées par des stades de maturation différents qui déterminent leur potentiel de différenciation
 - Ces stades de maturation sont liés au stade de développement
 - On identifie des cellules:
 - Totipotentes
 - **Pluripotentes**
 - Multipotentes
 - Unipotentes
- 
- Cellules de la vie embryonnaire

Cellules souches embryonnaires



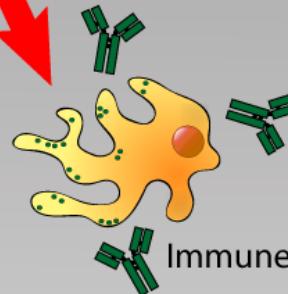
Examples:



Circulatory System



Nervous System



Immune System

Cell fate modifiers

Facteurs intrinsèques

= programme d'expression de gène

Facteurs de transcription

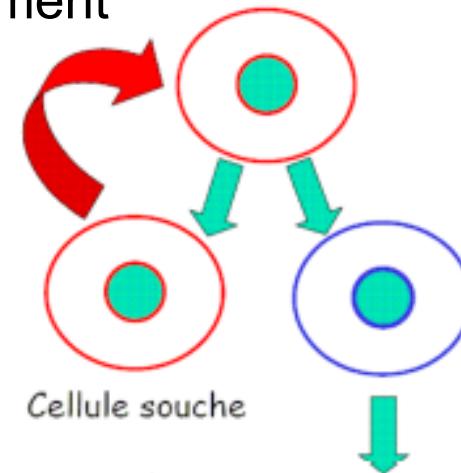
Facteurs extrinsèques

= Micro-environnement (niche)

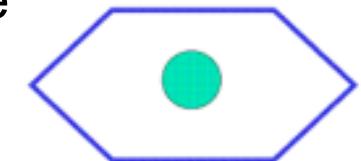
- Matrice extracellulaire
- Facteurs de croissance

Auto-renouvellement

Cellule souche



Division cellulaire asymmetrique



Cellule différenciée

Differentiation

« Forcer » le destin cellulaire

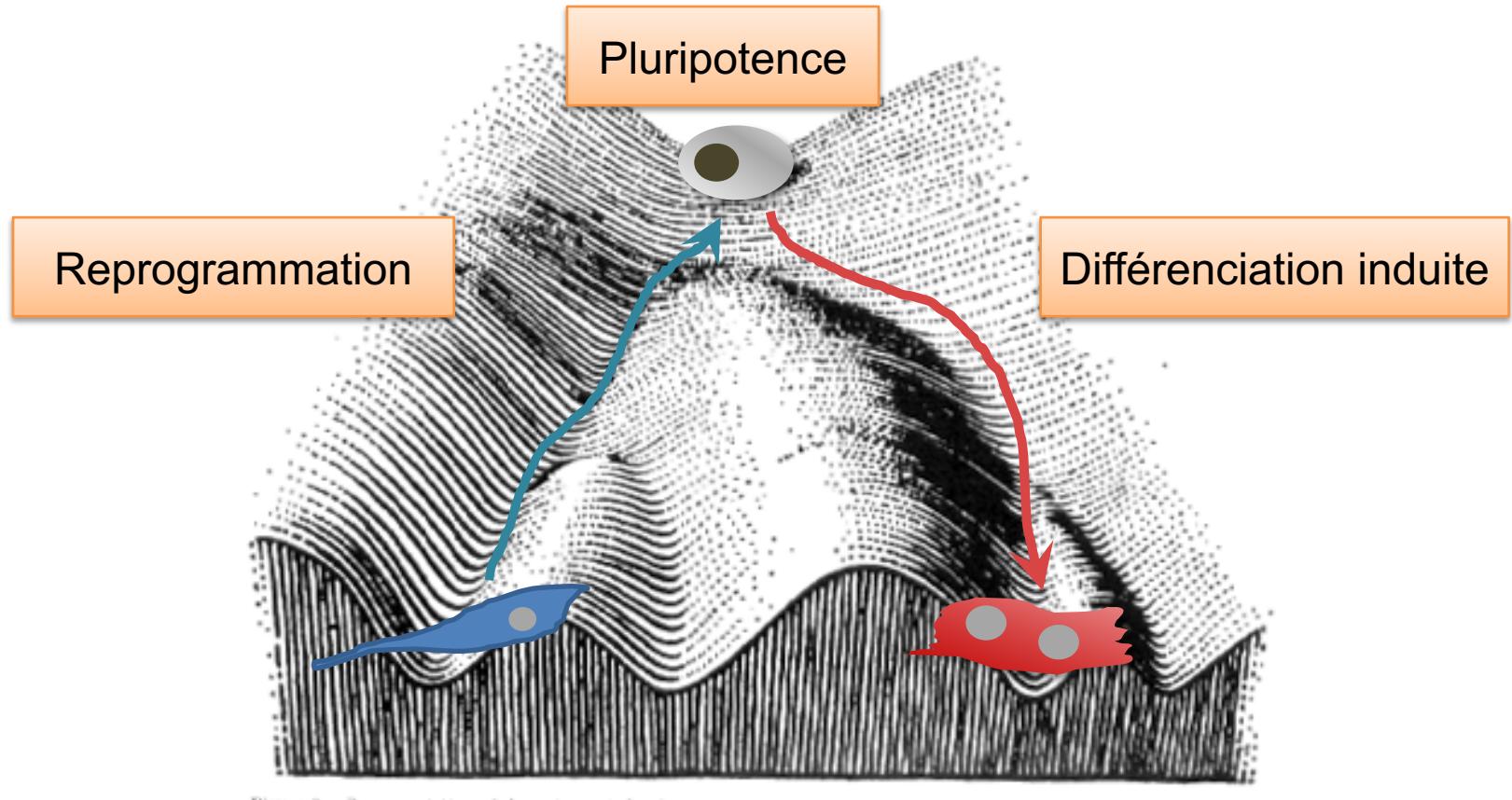
Si on utilisait ces connaissances pour modifier le devenir d'une cellule?

i.e.

Créer des cellules souches pluripotentes (PSC) à partir de cellules adultes

→ Reprogrammer des cellules adultes en PSC induites

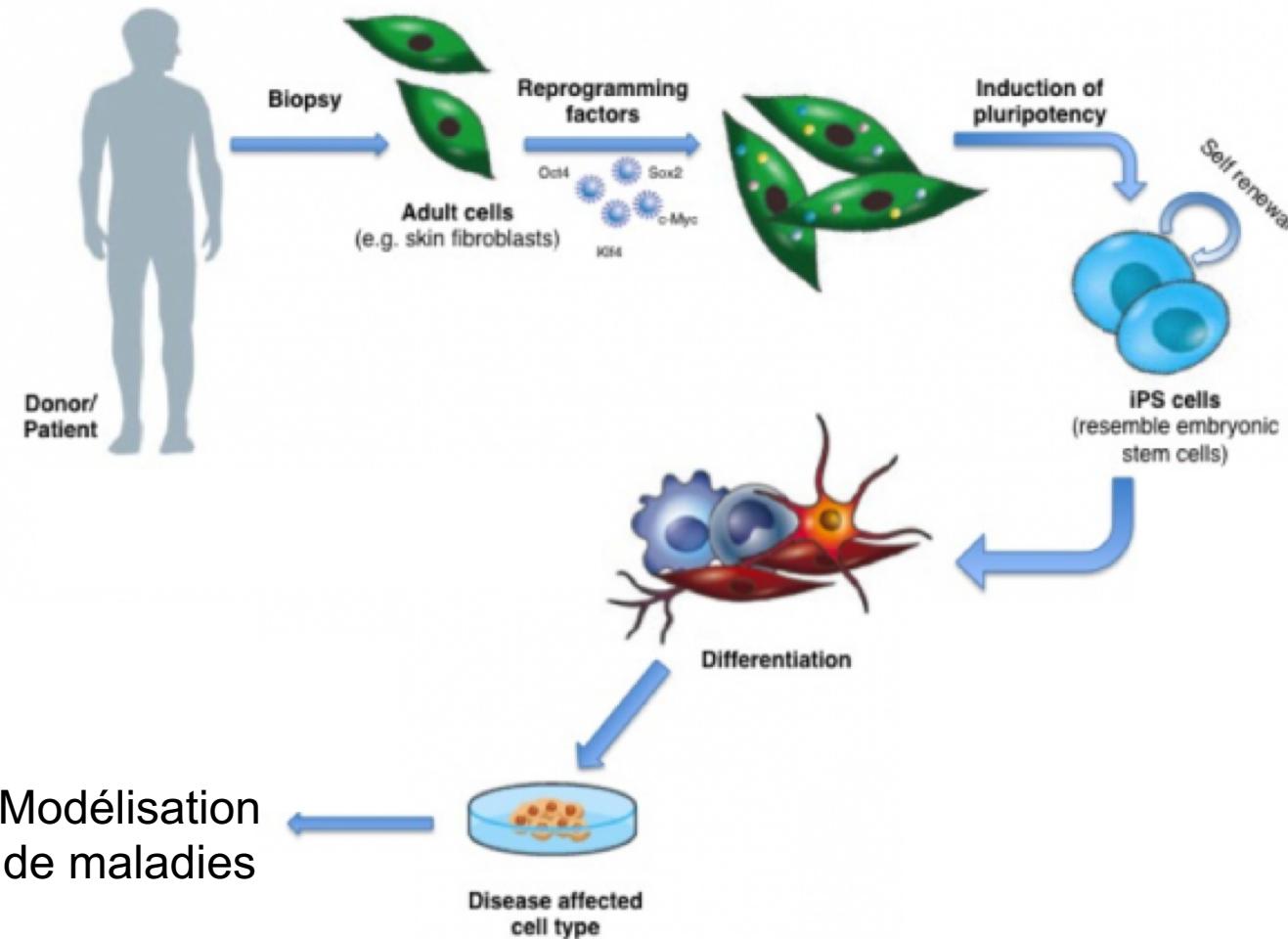
« Forcer » le destin cellulaire



Yamanaka S, Gurdon J: Prix nobel de médecine 2012
"for the discovery that mature cells can be reprogrammed to become pluripotent."

Cellules souches pluripotentes induites

Cellules souches pluripotentes générées *in vitro* à partir de cellules adultes spécialisées. Elles ont la capacité de se diviser à l'identique de manière indéfinie et de produire des cellules différenciées



Plan du cours

□ Introduction générale

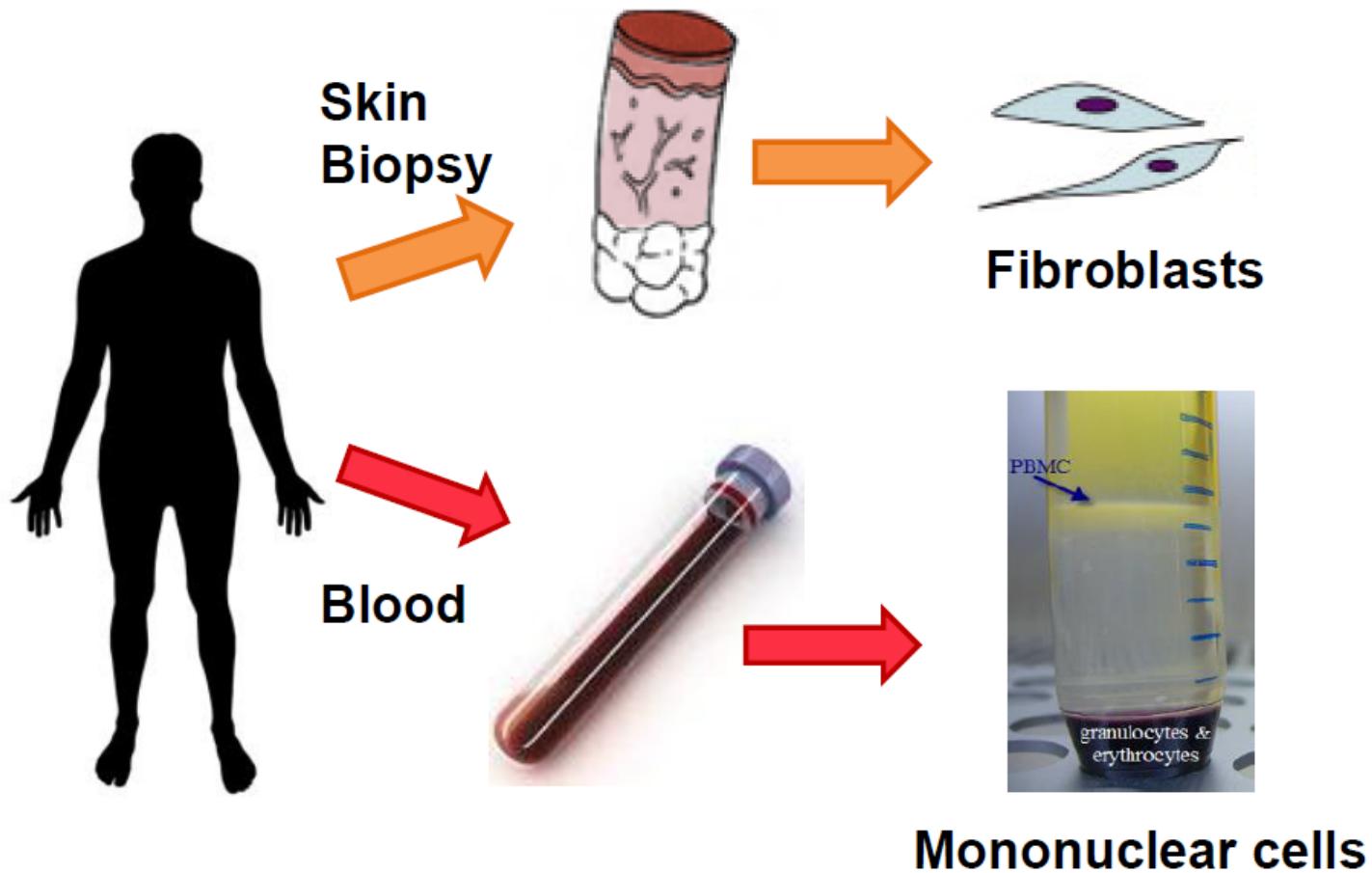
- Modèles d'étude classiques de pathologies cardiaques
- Cellules souches
- Technologie des cellules iPS

□ Aspects technologiques

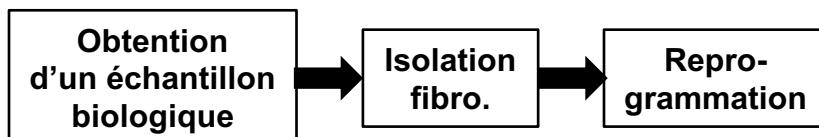
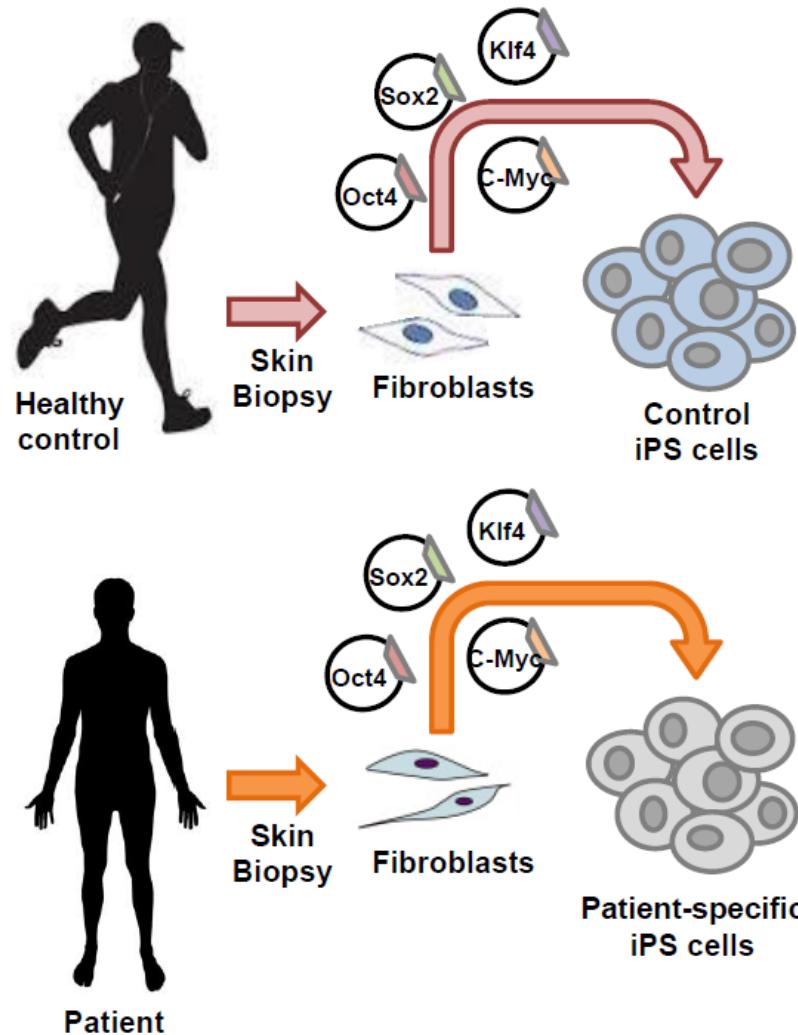
- Comment générer des cellules iPS
- Comment caractériser des cellules iPS
- Comment générer des iPS-CMs
- Comment caractériser des iPS-CMs

□ Exemples de modélisation de pathologies du rythme cardiaque à l'aide d'iPS-CMs

La reprogrammation

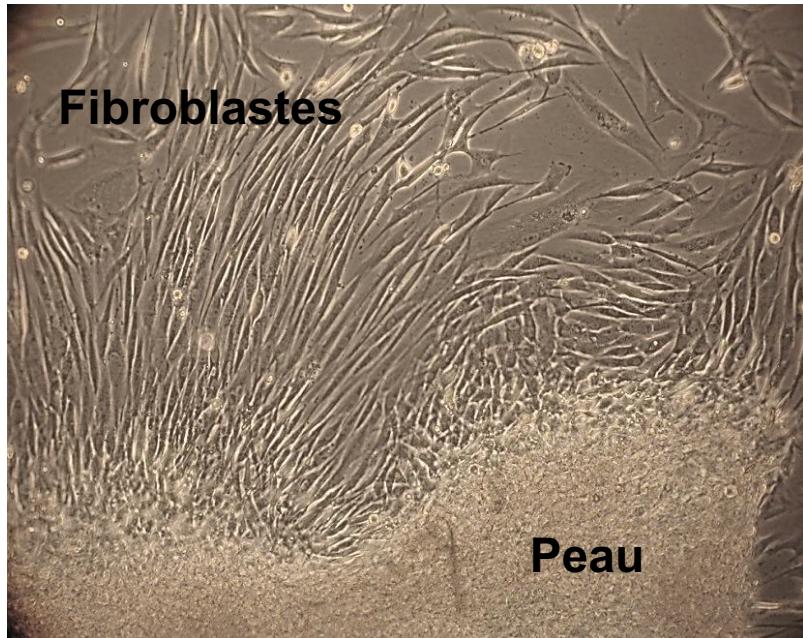


La reprogrammation

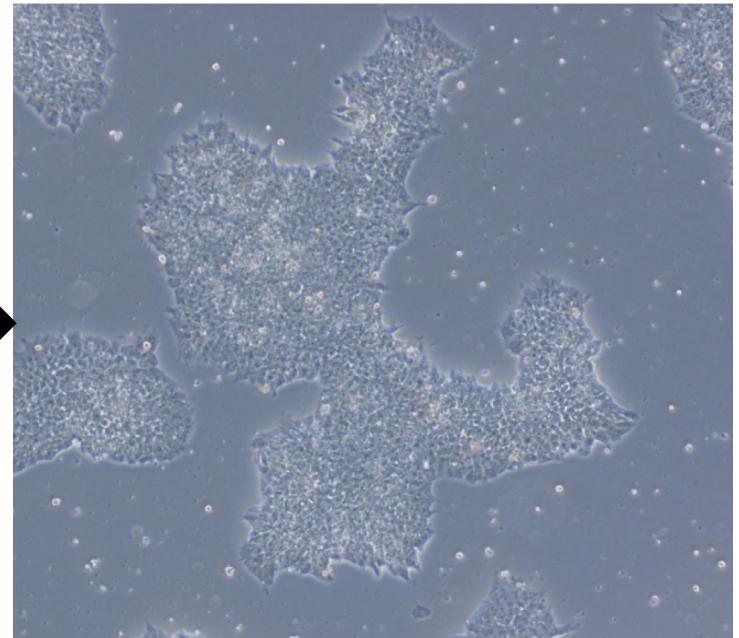


La reprogrammation

Reprogrammation



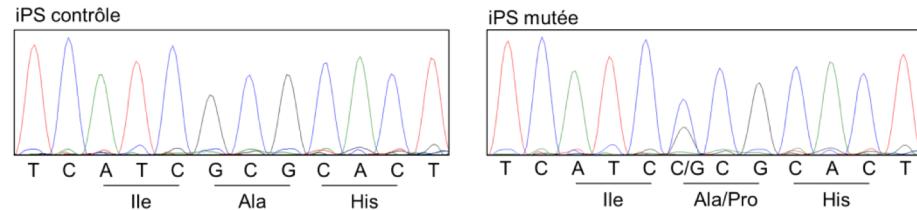
Fibroblastes de peau



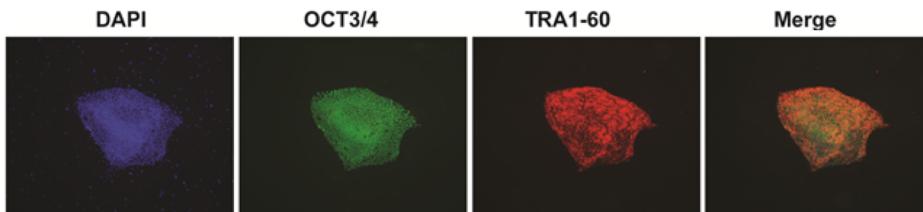
Colonies de cellules iPS

Comment caractériser des cellules iPS humaines

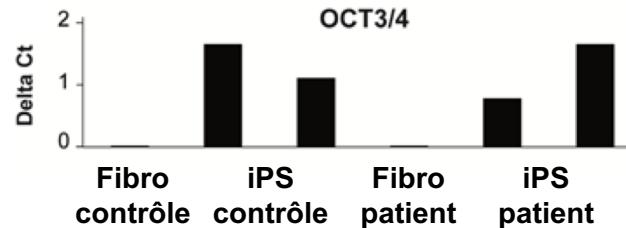
Séquençage de la mutation du patient.



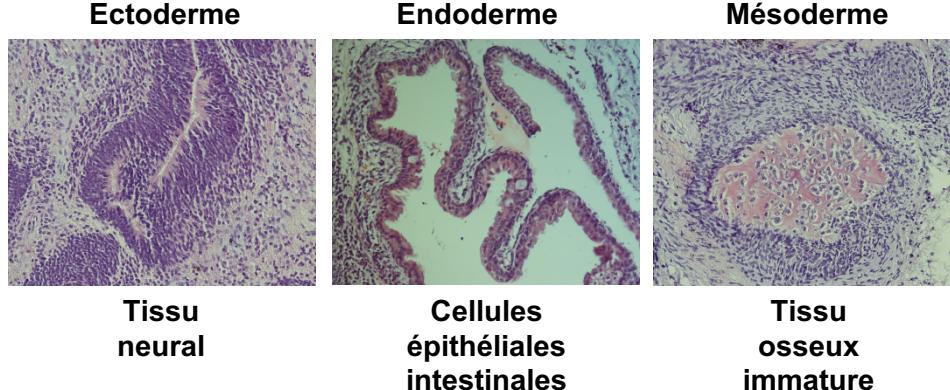
Expression de marqueurs protéiques de cellules souches: Oct3/4, TRA-1-60 (immunomarquage et FACS).



Expression de gènes spé. de cellules souches : Oct3/4, Nanog, Sox-2 (qRT-PCR).



Potentiel de différenciation en cellules des 3 feuillets embryonnaires (immunomarquage de tératome).



Plan du cours

□ Introduction générale

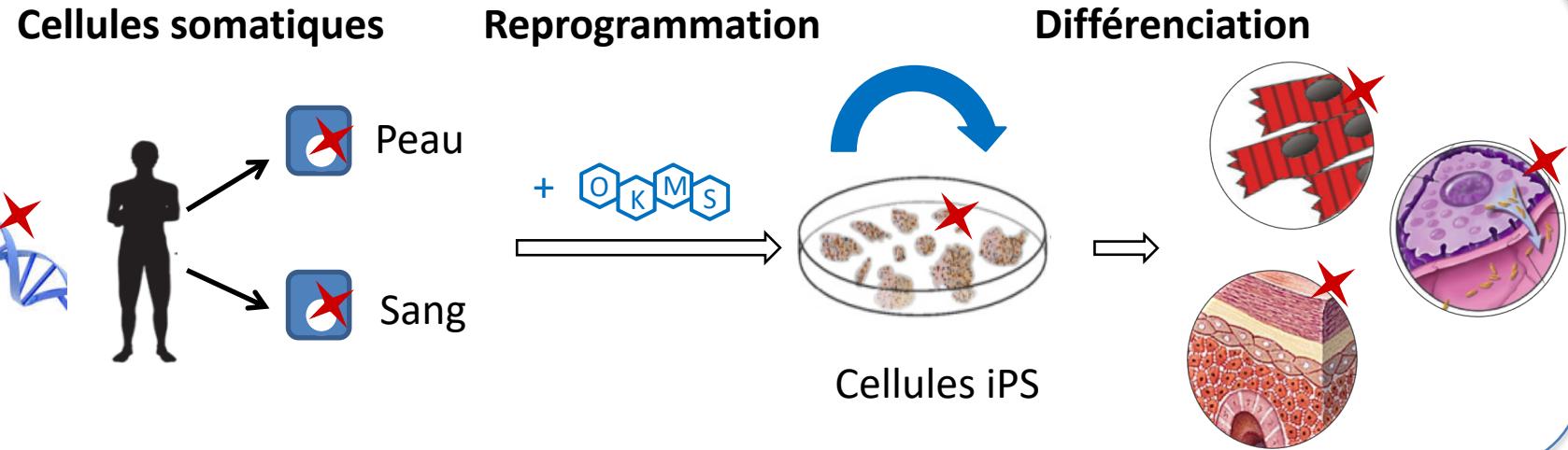
- Modèles d'étude classiques de pathologies cardiaques
- Cellules souches
- Technologie des cellules iPS

□ Aspects technologiques

- Comment générer des cellules iPS
- Comment caractériser des cellules iPS
- Comment générer des iPS-CMs
- Comment caractériser des iPS-CMs

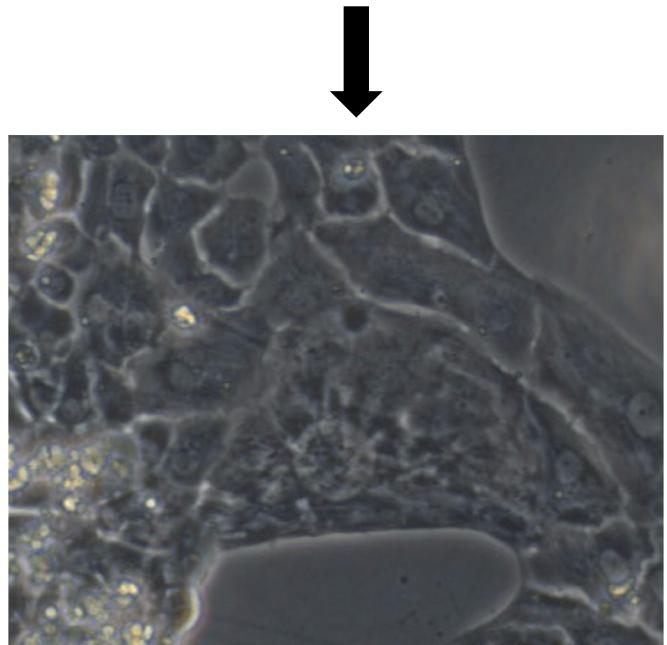
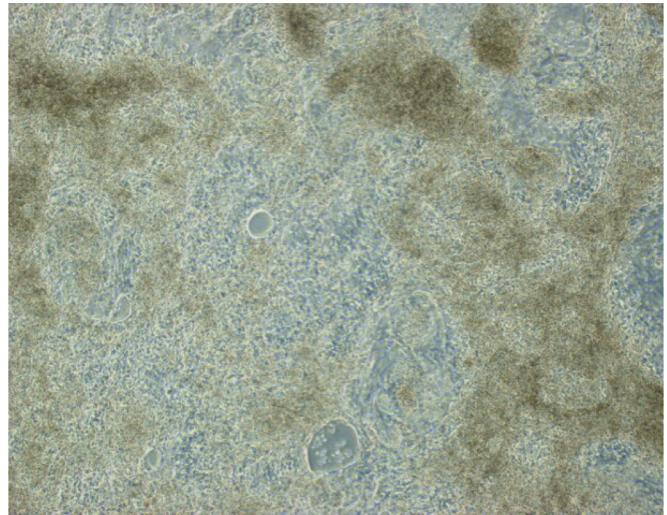
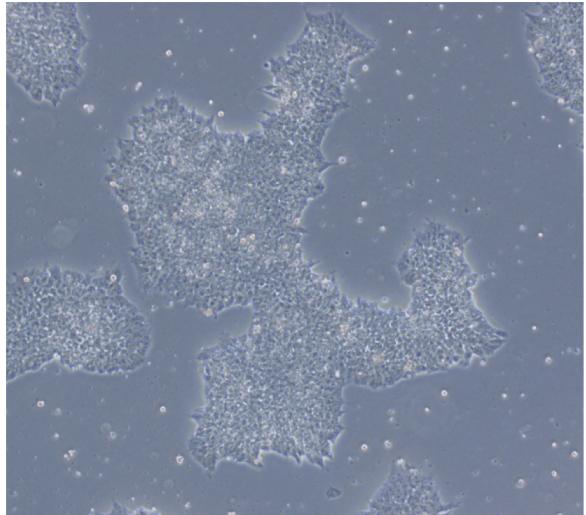
□ Exemples de modélisation de pathologies du rythme cardiaque à l'aide d'iPS-CMs

Cardiomyocytes humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites

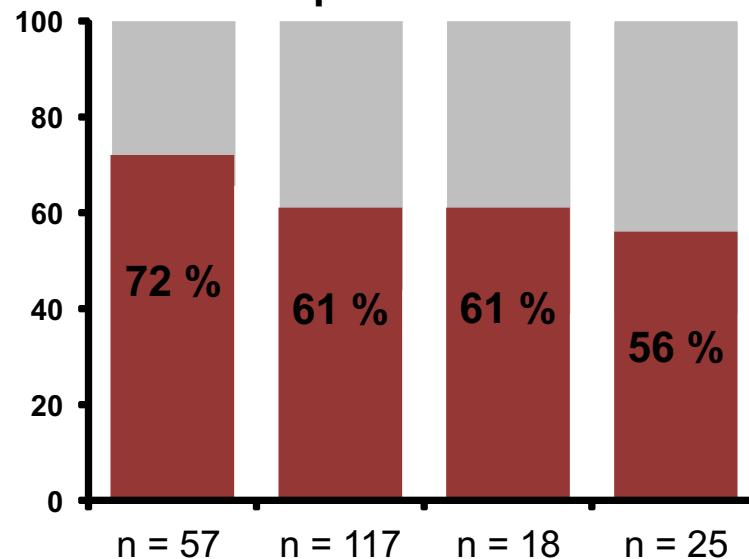


- Cardiomyocytes portent
 - le patrimoine génétique du patient
 - mutation / variant génétique rare
- Caractéristiques de la pathologie retrouvées dans les cardiomyocytes dérivés des cellules hiPS

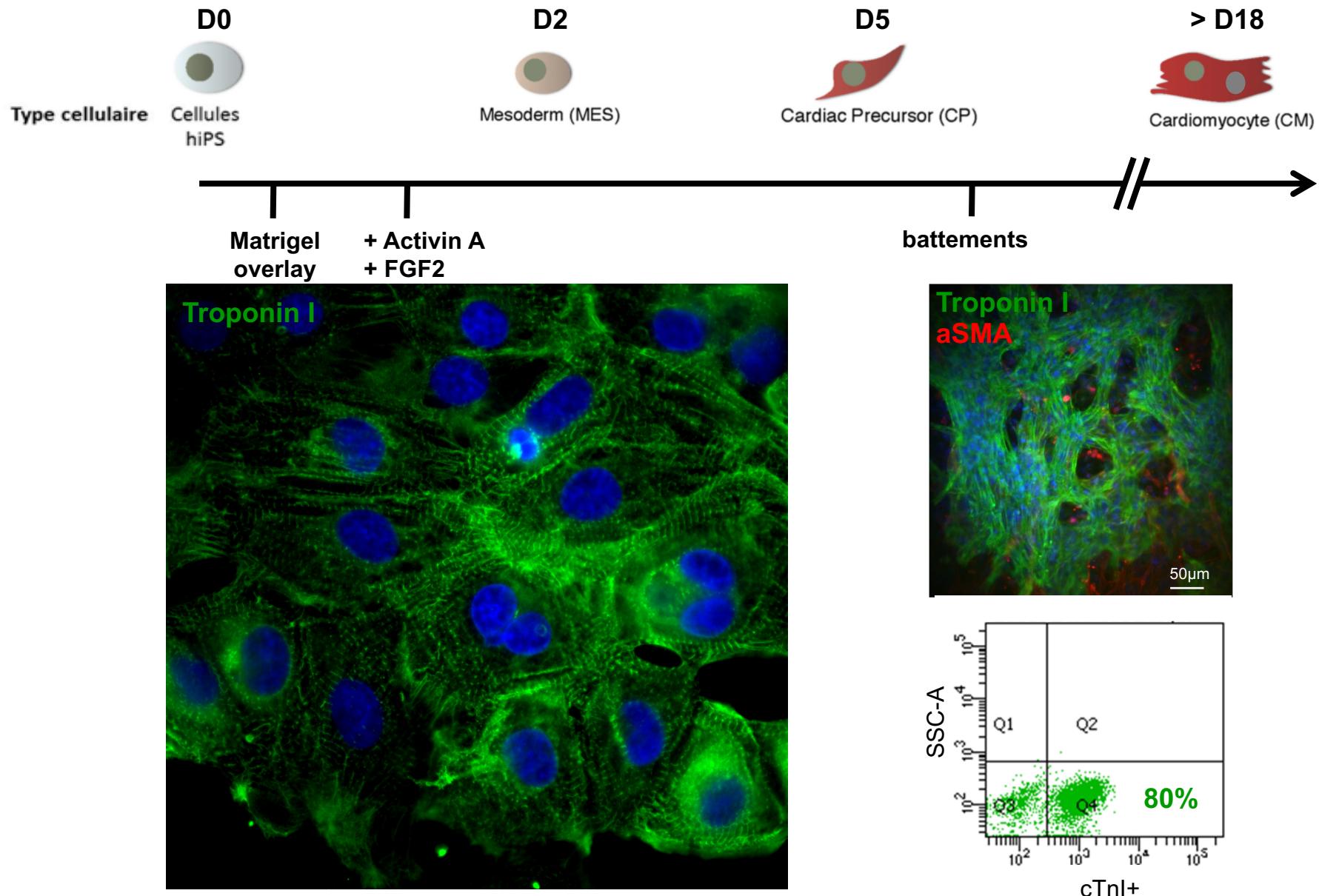
Cardiomyocytes dérivés d'hiPS



Fonction contractile:
% puits battants

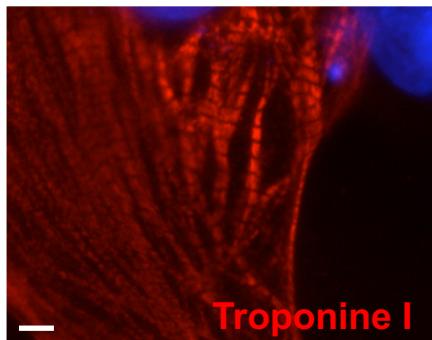
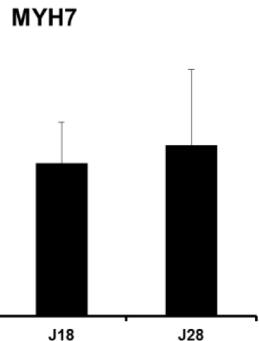


Différenciation cardiomycocytaire: caractérisation

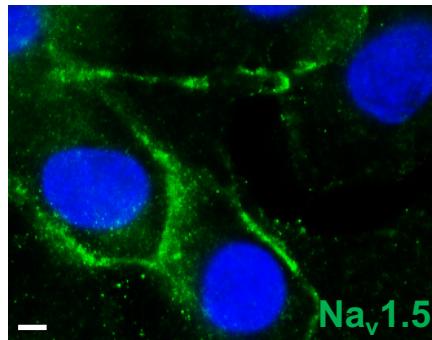
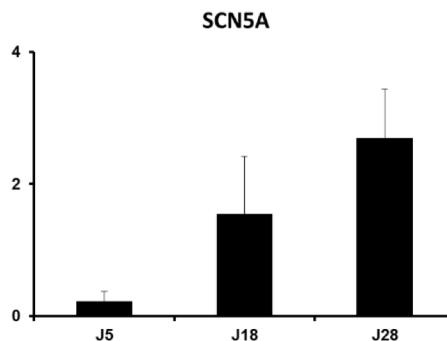


Cardiomyocytes dérivés d'hiPS

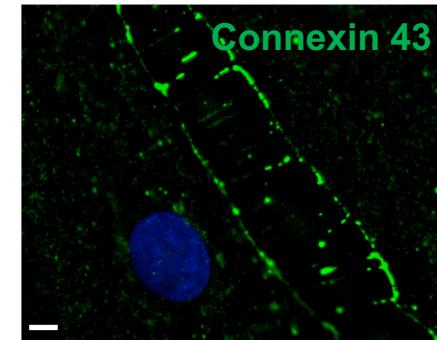
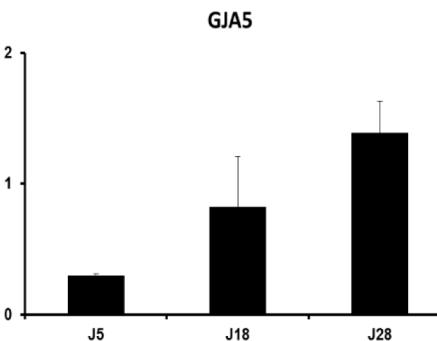
Organisation sarcomérique



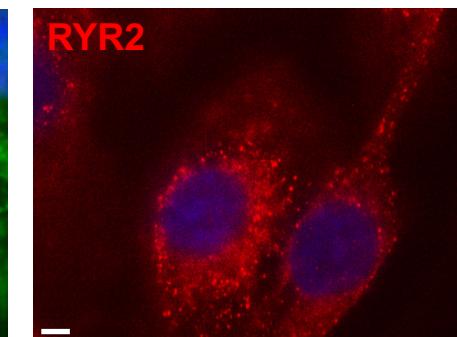
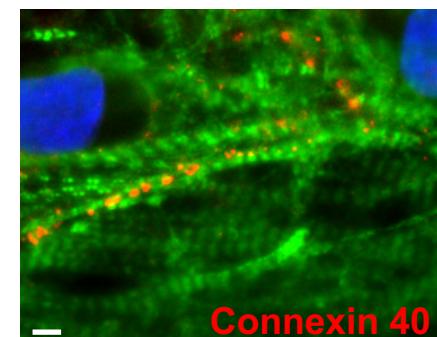
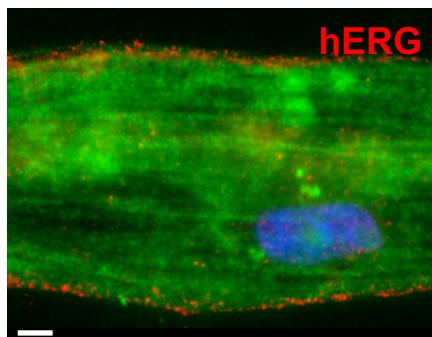
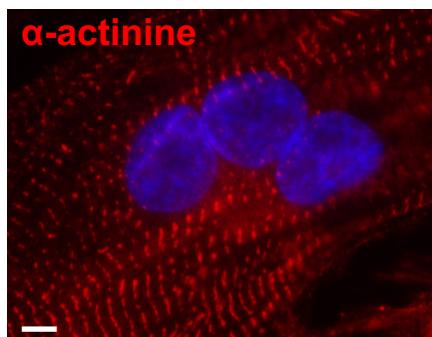
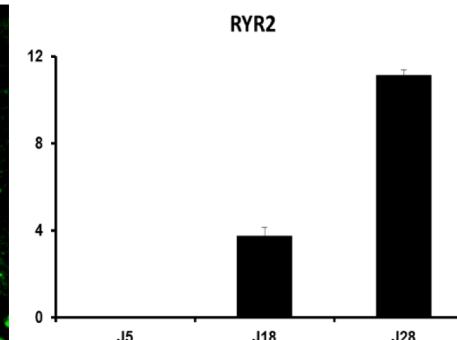
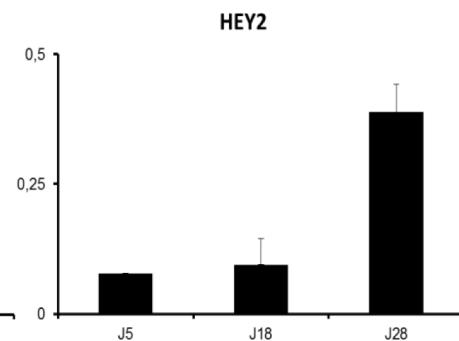
Canaux ioniques



Jonctions communicantes

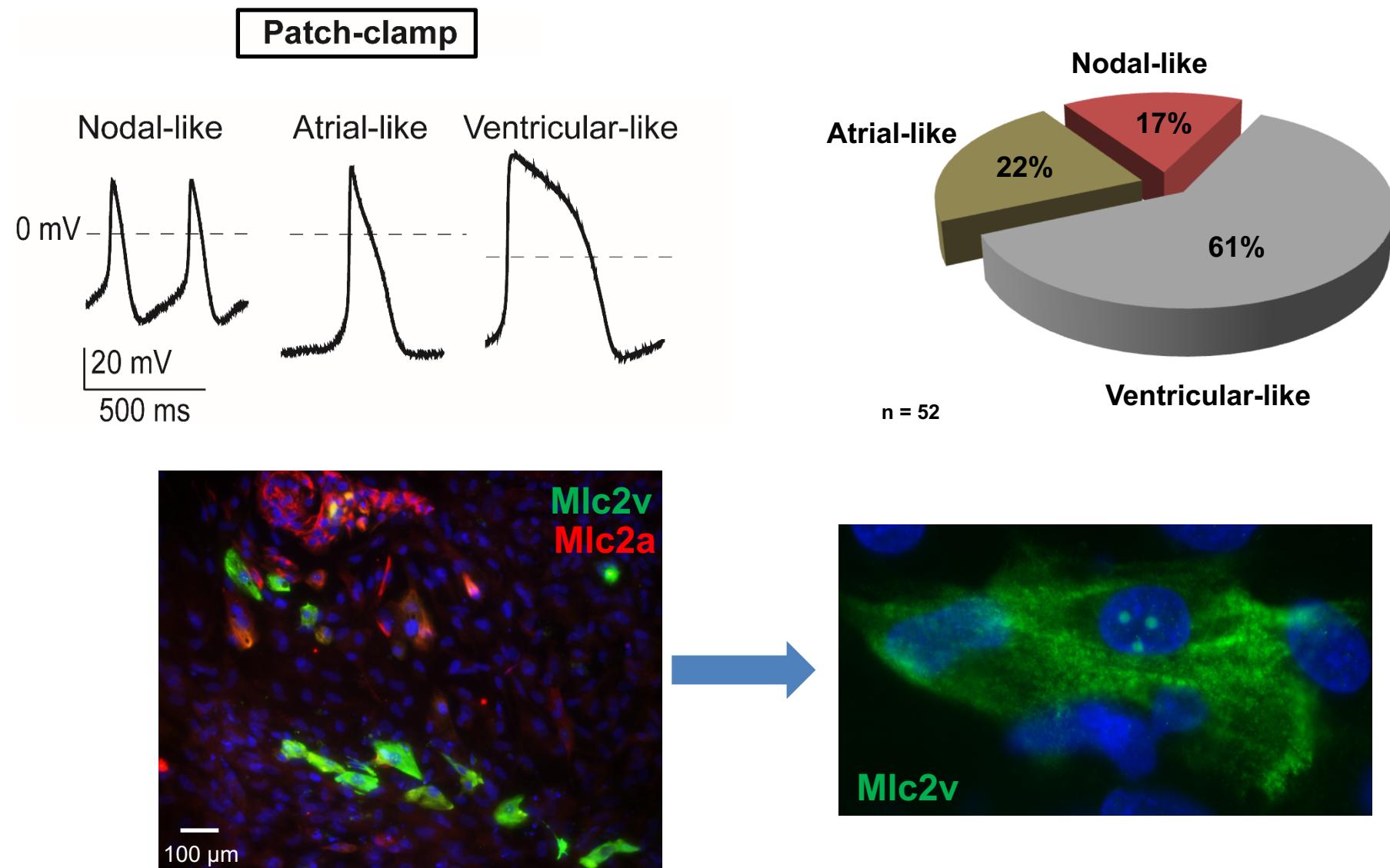


Homéostasie calcique et FTs



Echelle 5 μ m

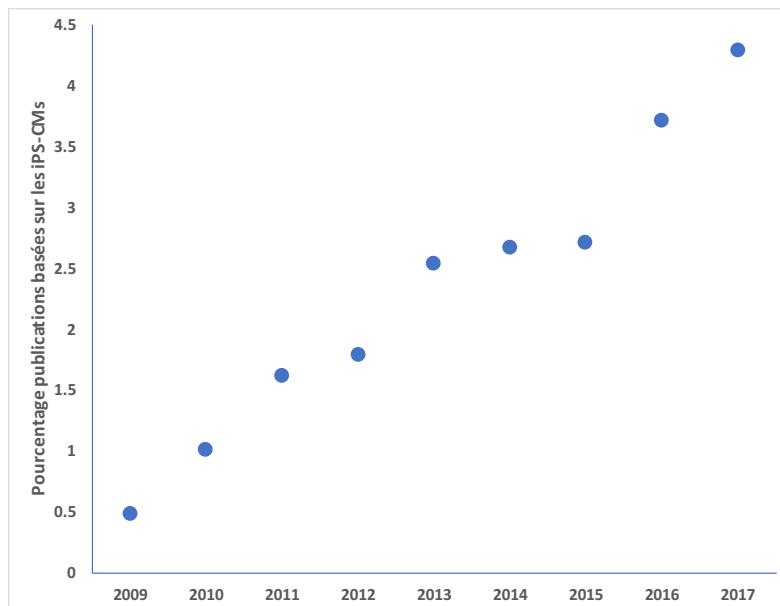
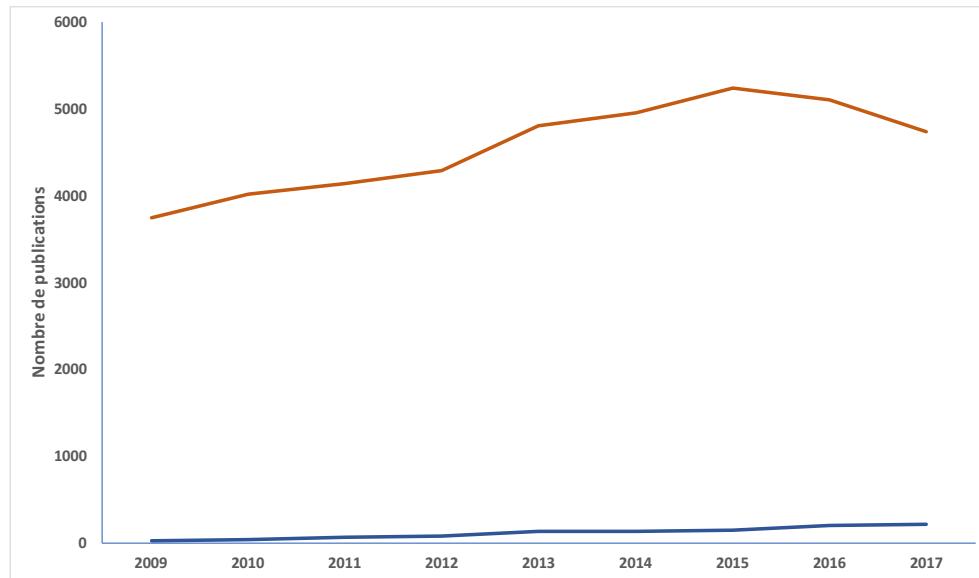
Cardiomyocytes dérivés d'hiPS: hétérogénéité cellulaire



Modèles cellulaires et cœur : Publications



Yamanaka S.
2007



■ Heterologous expression systems
■ Induced pluripotent stem cells (iPS)

En 2017
5% des articles utilisent des iPS

Plan du cours

□ Introduction générale

- Modèles d'étude classiques de pathologies cardiaques
- Cellules souches
- Technologie des cellules iPS

□ Aspects technologiques

- Comment générer des cellules iPS
- Comment caractériser des cellules iPS
- Comment générer des iPS-CMs
- Comment caractériser des iPS-CMs

□ Exemple de modélisation de pathologies du rythme cardiaque à l'aide d'iPS-CMs

Application aux arythmies cardiaques

Complexité variable suivant la nature de la pathologie

Pathologie monogénique – phénotype restreint

Syndrome du QT Long

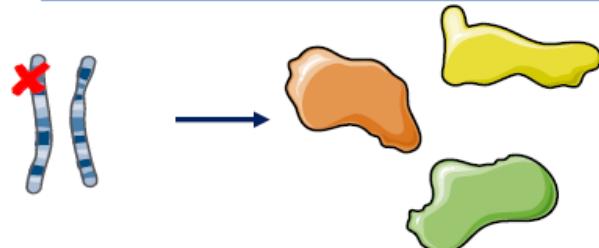
Mutation : Canal ionique



Pathologie monogénique – phénotype complexe

Syndrome d'Hamamy

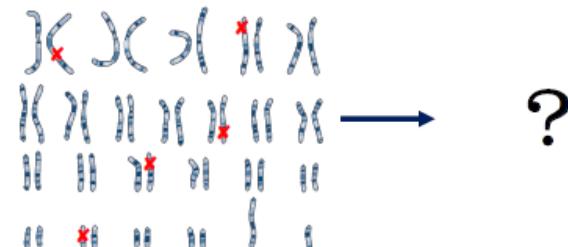
Mutation : Facteur de transcription



Pathologie oligogénique

Syndrome de Brugada

Mutation : variable ou non identifiée



Application aux arythmies cardiaques

Complexité variable suivant la nature de la pathologie

Pathologie monogénique – phénotype restreint

Syndrome du QT Long

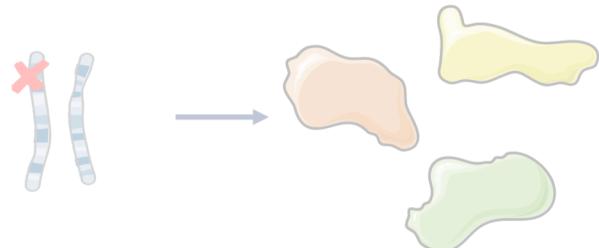
Mutation : Canal ionique



Pathologie monogénique – phénotype complexe

Syndrome d'Hamamy

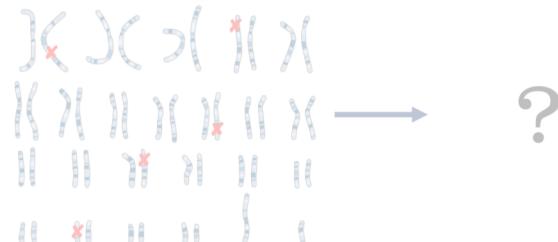
Mutation : Facteur de transcription



Pathologie oligogénique

Syndrome de Brugada

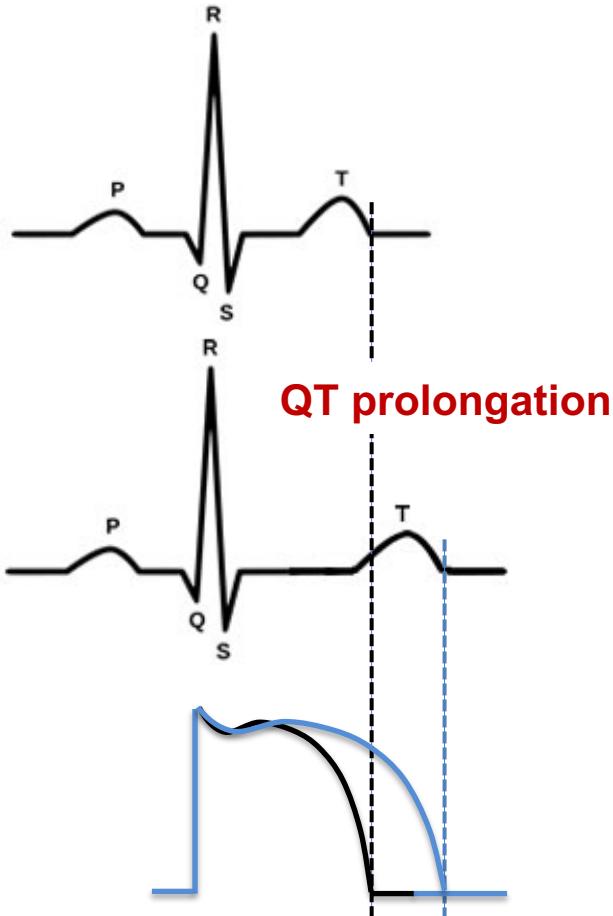
Mutation : variable ou non identifiée



Complexity level 1 : Long QT syndrome

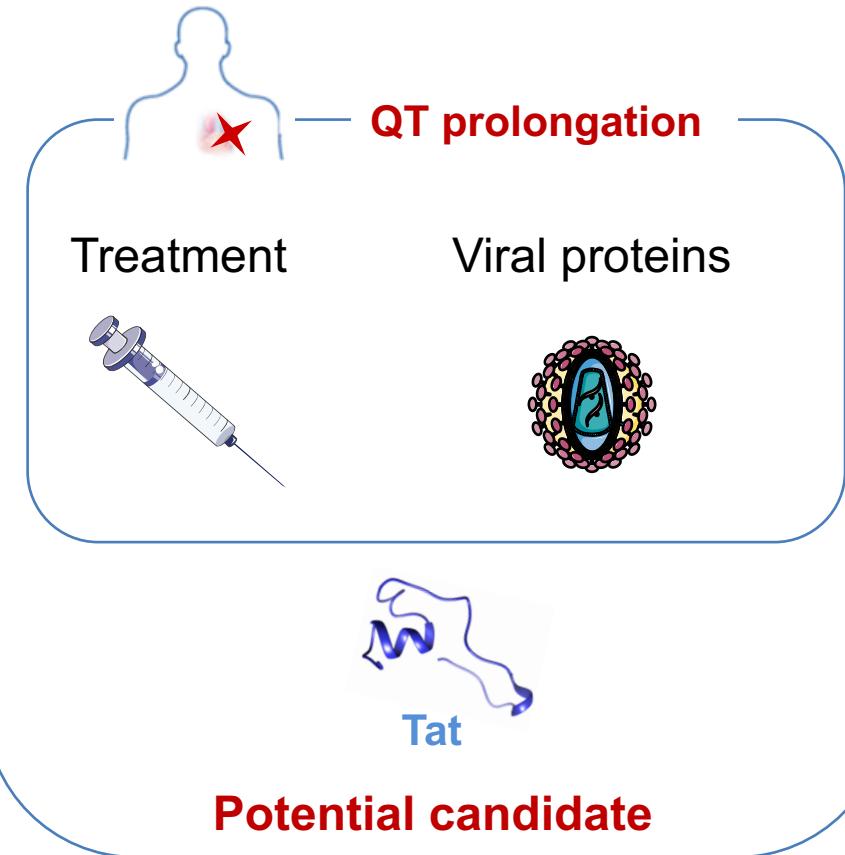
Congenital long QT syndrome

Ventricular arrhythmogenic syndrome



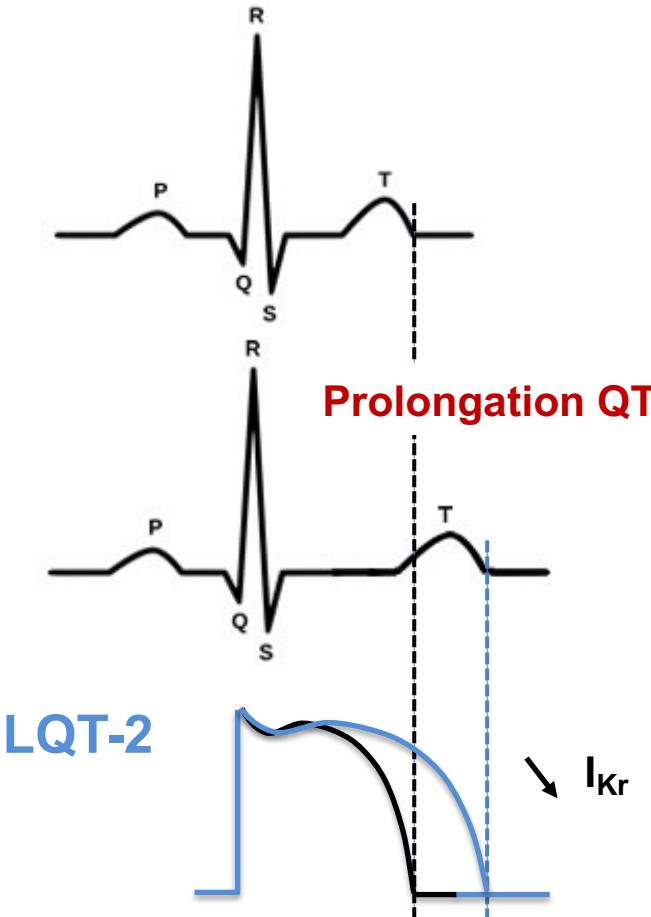
Acquired long QT syndrome

Increased cardiovascular events in HIV-infected patients



Niveau de complexité 1: Syndrome du QT Long congénital

Syndrome arythmogénique ventriculaire



Toward Personalized Medicine: Using Cardiomyocytes Differentiated From Urine-Derived Pluripotent Stem Cells to Recapitulate Electrophysiological Characteristics of Type 2 Long QT Syndrome

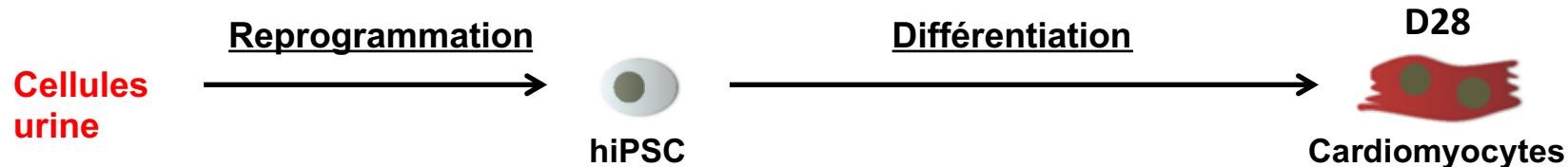
Mariam Jouni, MSc;* Karim Si-Tayeb, PhD;* Zeineb Es-Salah-Lamoureux, PhD; Xenia Latypova, MSc; Benoite Champon, BSc; Amandine Caillaud, PhD; Anais Rungoat, MSc; Flavien Charpentier, PhD; Gildas Loussouam, PhD; Isabelle Baró, PhD; Kazem Zibara, PhD; Patricia Lemarchand, MD, PhD; Nathalie Gaborit, PhD

J Am Heart Assoc. 2015;4:e002159

Modélisation du syndrome du QT long congénital

Objectif

Jouni M et al., JAHA, 2015

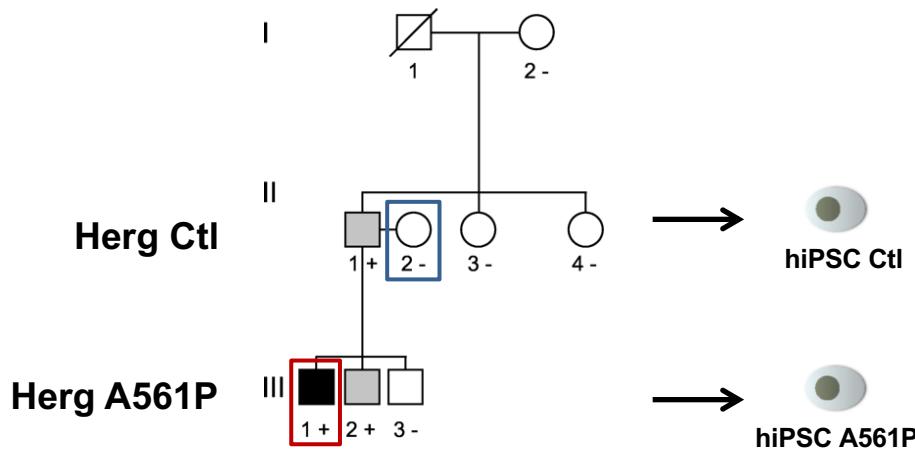


A Common Antitussive Drug, Clobutinol, Precipitates the Long QT Syndrome 2

Chloé Bellocq, Ronald Wilders, Jean-Jacques Schott, Bénédicte Louérat-Oriou, Pierre Boisseau, Hervé Le Marec, Denis Escande, and Isabelle Baró

Mol Pharmacol 66:1093–1102, 2004

hERG A561P mutation



Méthodologie

Centre national
de référence
*Maladies
rythmiques
cardiaques*



OKMS Reprogrammation

Activine A
BMP 4
FGF 2

Mutation hERG
(A561P)

Prélèvement
contrôle

Urine

iPS

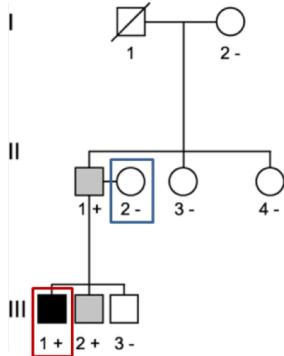
iPS-CM

Contrôle
qualité

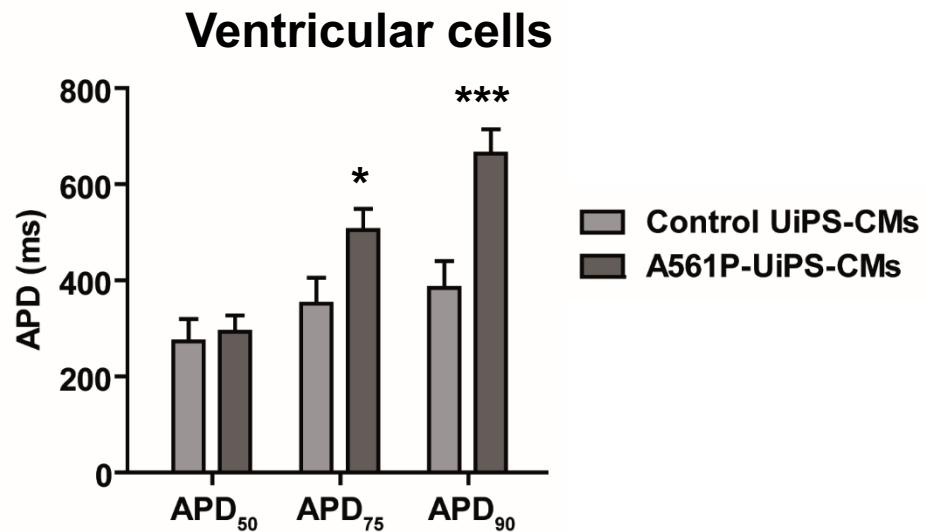
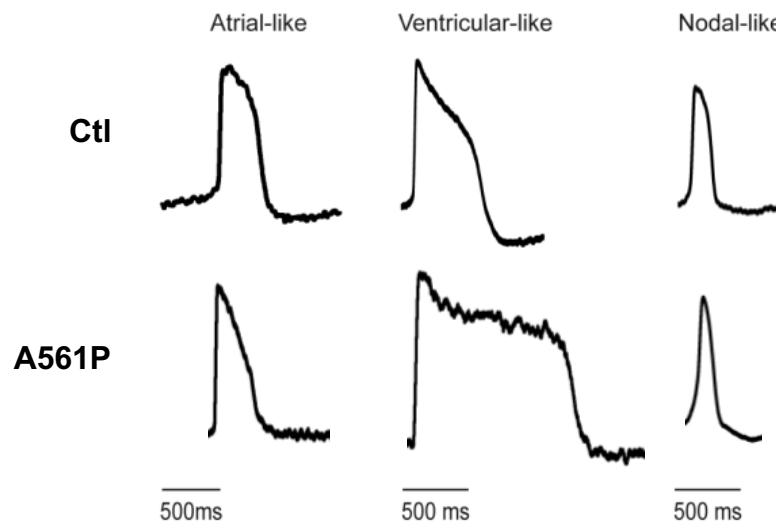
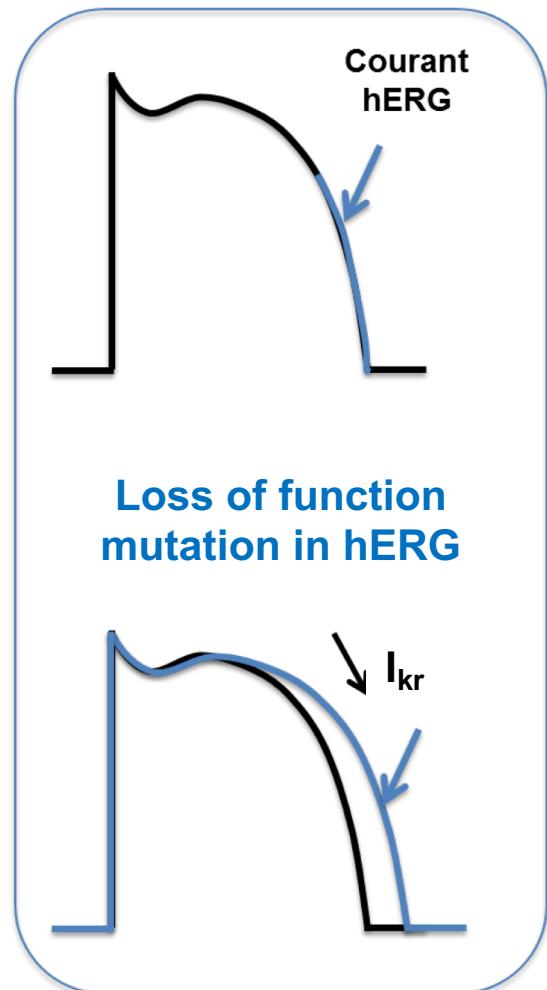
hERG
A561P

Contrôles

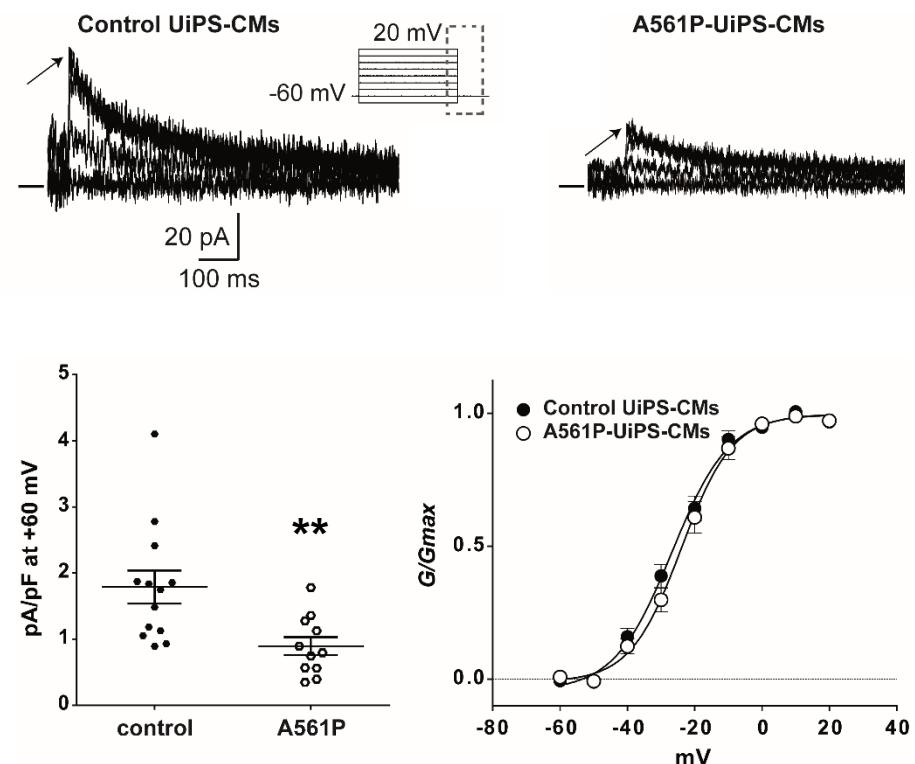
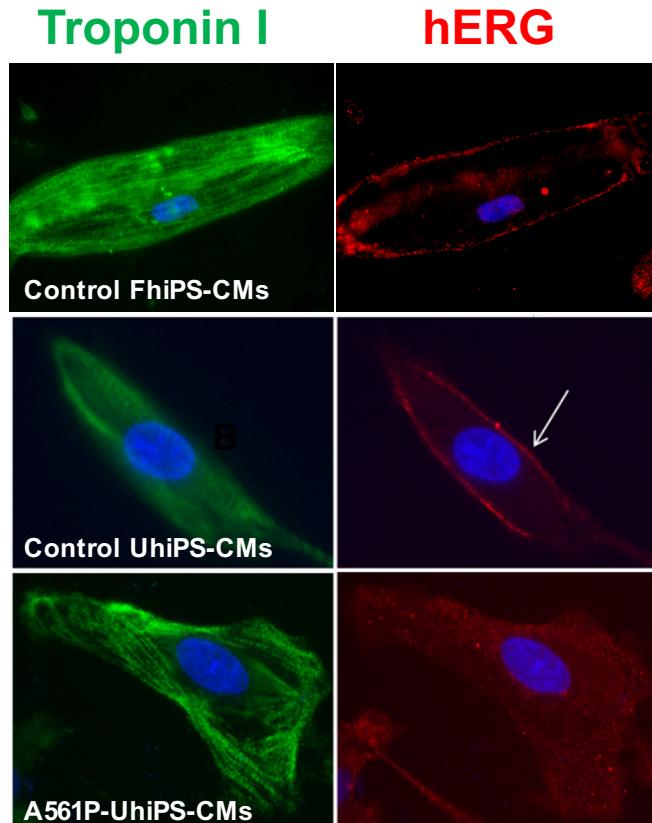
Analyse
fonctionnelle



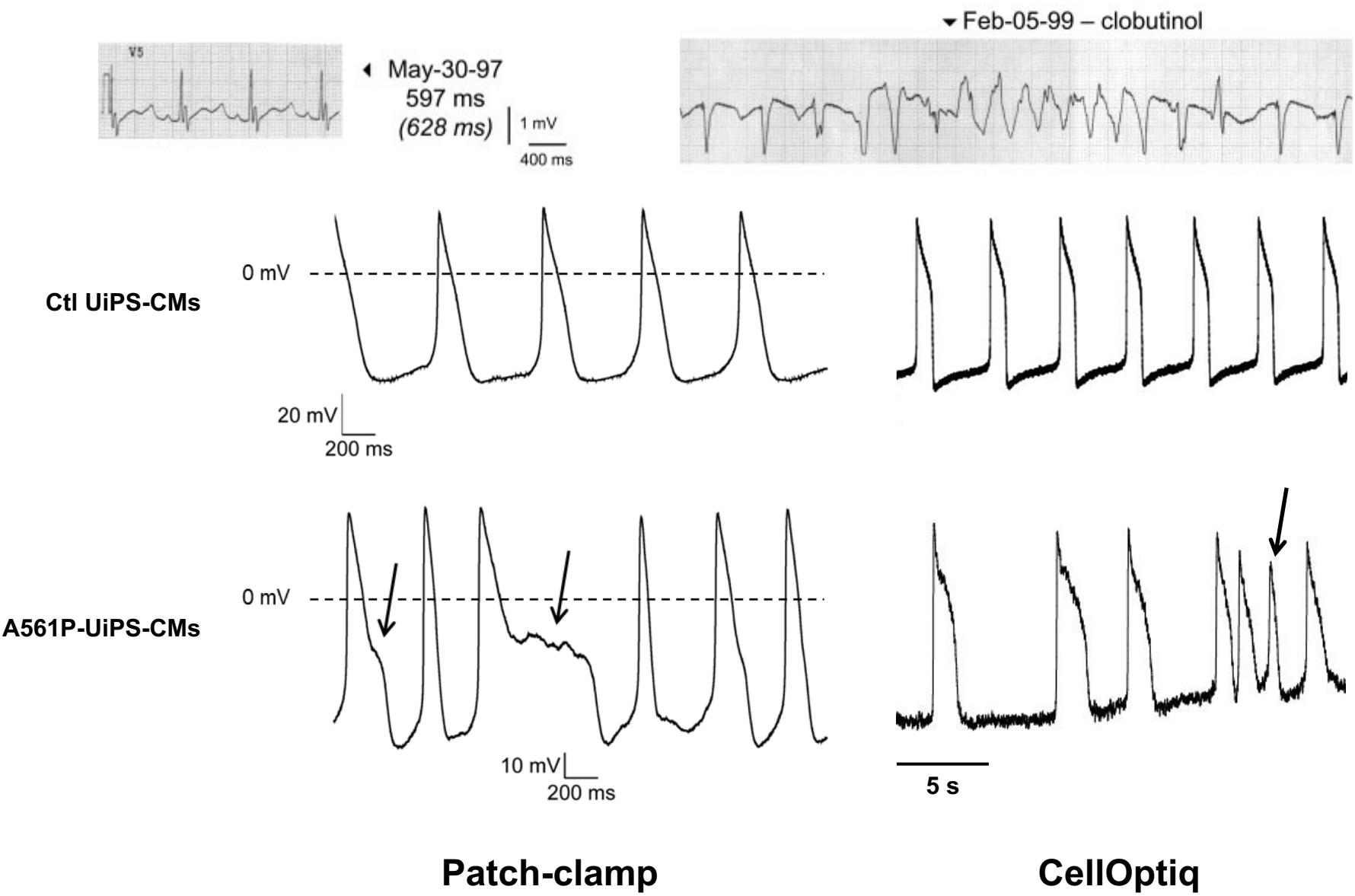
Les potentiels d'action d'UiPS-CMs hERG A561P modélisent le LQT2



Anomalie de transport de hERG et diminution de densité de courant



PotentIELS d'action A561P-UhiPS-CMs modÈlent les arythmies



Conclusions: modélisation du syndrome du QT long congénital

Cellules somatiques



Urine



hiPS



CMs fonctionnels



- ✓ Défaut de transport
- ✓ Réduction d' I_{Kr}
- ✓ Prolongation APD
- ✓ Evènements arythmiques

Jouni M et al., JAHA, 2015

Opportunités

Approche puissante permettant de réaliser des études fonctionnelles patient-spécifiques

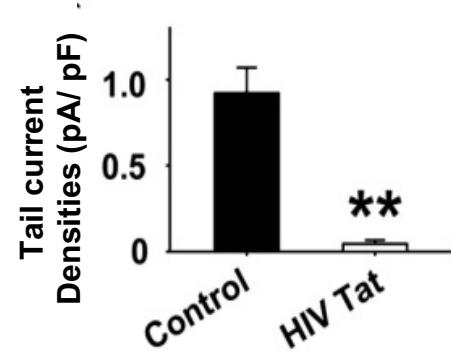
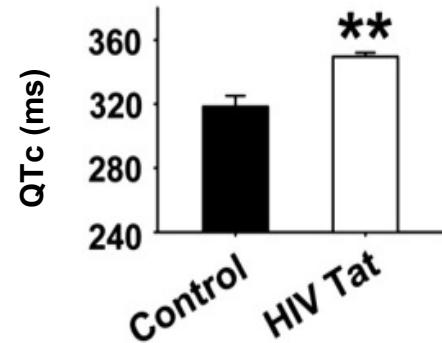
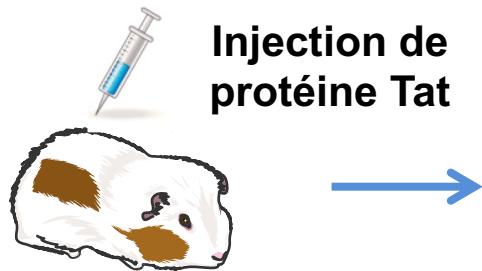


Compréhension des mécanismes sous-jacents

Mécanisme d'induction d'arythmies cardiaques chez les patients porteurs du VIH

Objectifs

1. Valider la capacité des hiPS-CMs à identifier le mécanisme d'une maladie non-génétique
2. Comprendre la physiopathologie de la prolongation du QT chez les patients infectés par le VIH à l'aide d'hiPS-CMs

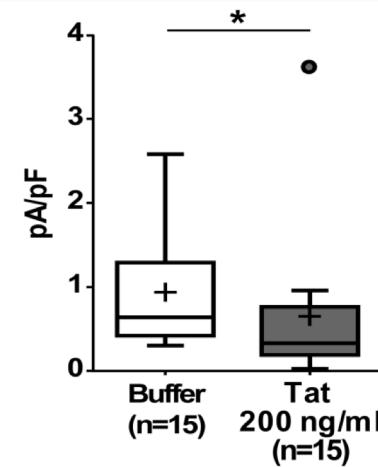
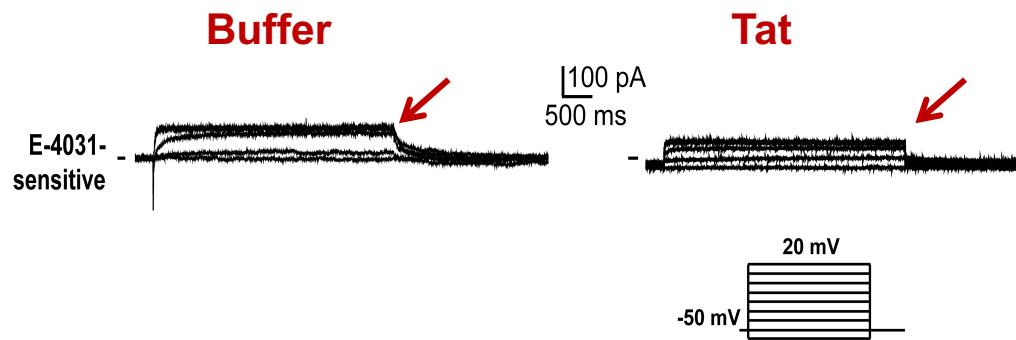


Bai et al., 2011

Tat contribuerait au délai de repolarisation via une réduction de I_{Kr}

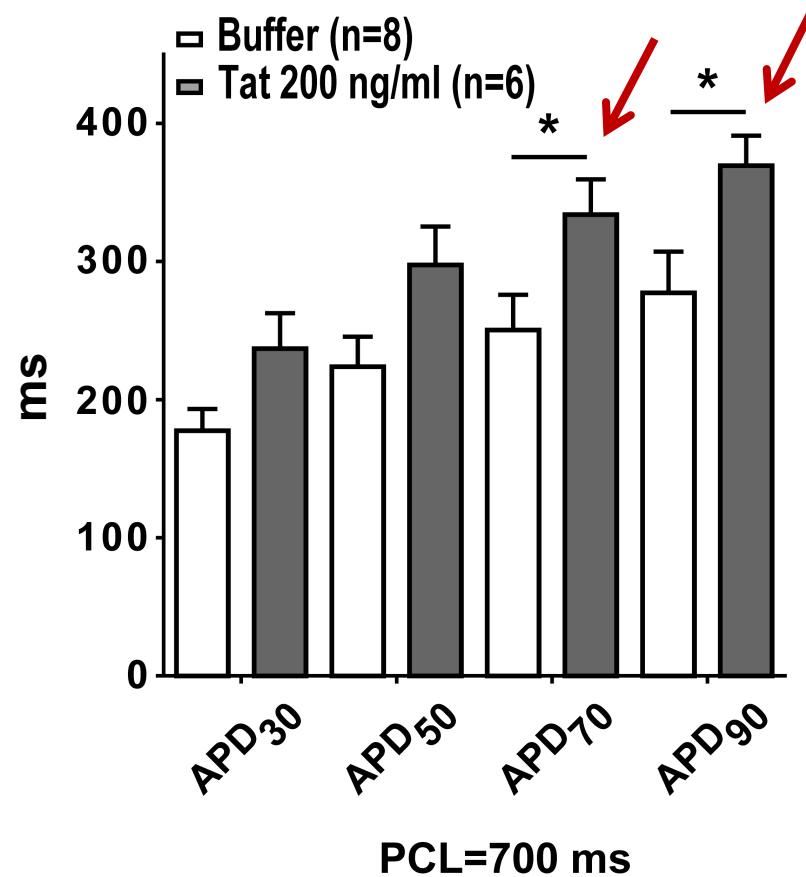
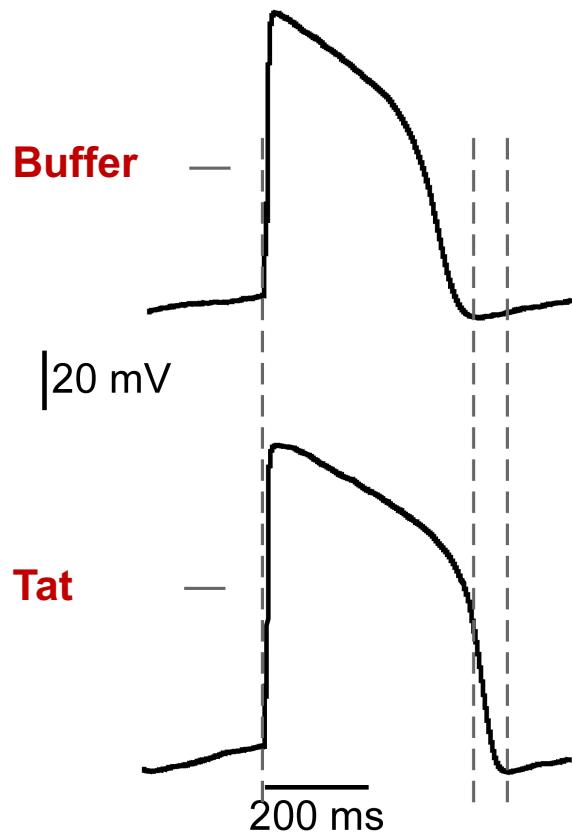
Effet de Tat sur le courant I_{Kr}

I_{Kr} in hiPS-CMs



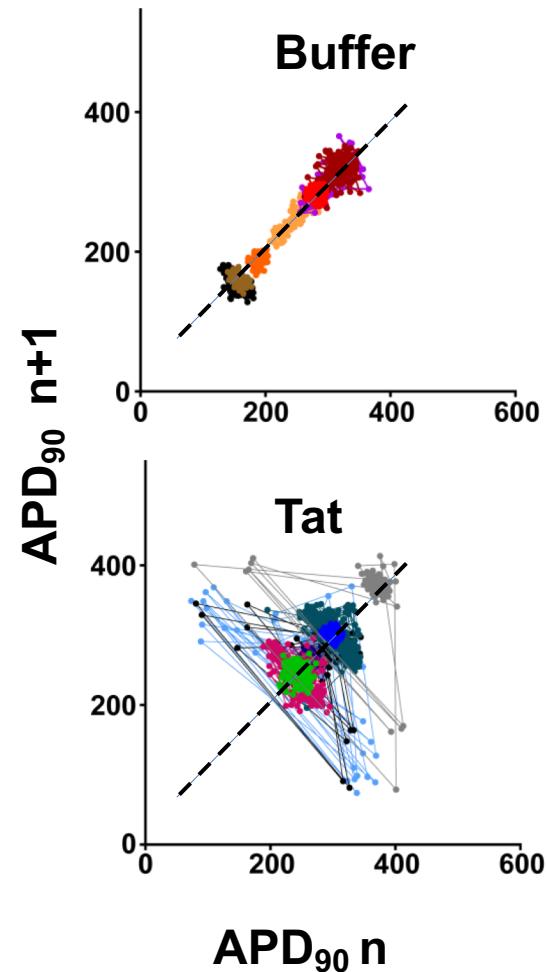
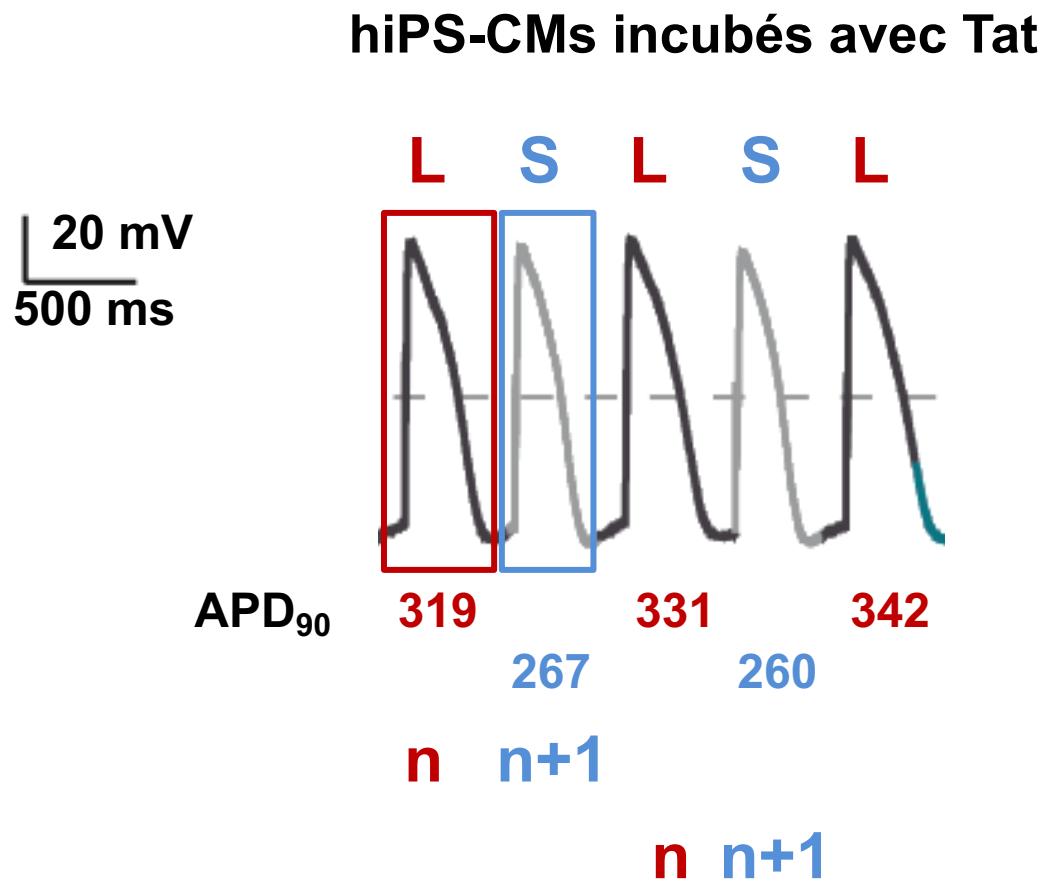
I_{Kr} est significativement réduit par Tat dans les hiPS-CMs

Effet de Tat sur le potentiel d'action: prolongation APD



La protéine **Tat** entraîne une prolongation des APD des hiPS-CMs ventriculaires

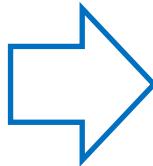
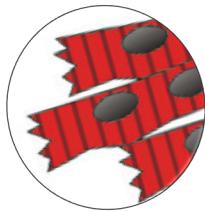
Effet de Tat sur le potentiel d'action: alternances



Tat entraîne des alternances des APD des hiPS-CMs ventriculaires

Conclusions: Mécanisme d'induction d'arythmies cardiaques chez les patients HIV

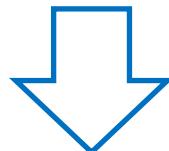
hiPS-CMs ont permis d'identifier le phénotype cardiaque arythmique associé à Tat



hiPS-CMs incubés avec Tat

- ✓ Réduction d' I_{Kr}
- ✓ Prolongation des APD
- ✓ Incidents arythmiques

Ces modifications pourraient représenter le substrat moléculaire et cellulaire des prolongations du QT chez les patients VIH



hiPS-CMs : outil d'investigation d'autres pathologies arythmiques non-génétiques

Conclusions 1

- ✓ **Modéliser une pathologie cardiaque à partir de cellules d'urine**
- ✓ **Flexibilité du modèle : contrôles intrafamiliaux, enfants...**
- ✓ **hiPS-CMs : outil d'investigation de pathologies arythmiques génétiques et non-génétiques.**
- ✓ **Modèle permet d'analyser finement les mécanismes moléculaires et fonctionnels dérégulés dans des situations pathologiques**

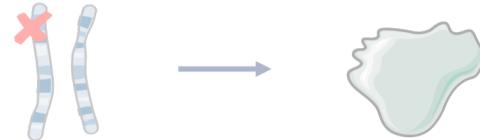
Application aux arythmies cardiaques

Complexité variable suivant la nature de la pathologie

Pathologie monogénique – phénotype restreint

Syndrome du QT Long

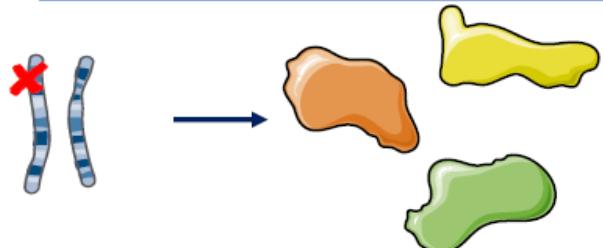
Mutation : Canal ionique



Pathologie monogénique – phénotype complexe

Syndrome d'Hamamy

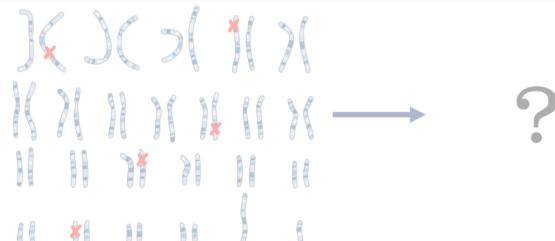
Mutation : Facteur de transcription



Pathologie oligogénique

Syndrome de Brugada

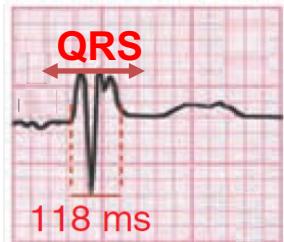
Mutation : variable ou non identifiée



Niveau de complexité 2: Syndrome d'Hamamy

Génotype - Phénotype

Délais de conduction ventriculaire



Hamamy syndrome



Bonnard et al. 2012

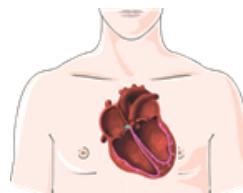
Iroquois homeobox TF

A150P N166K



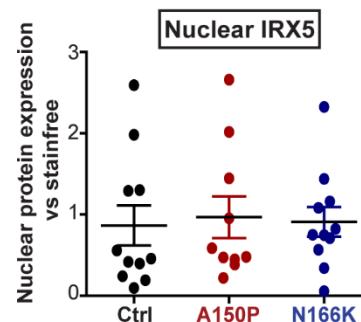
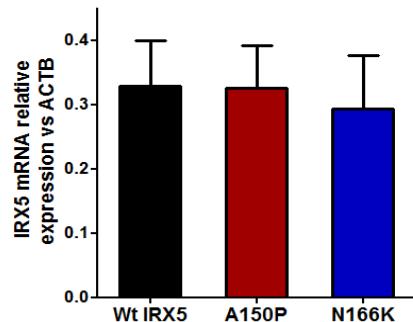
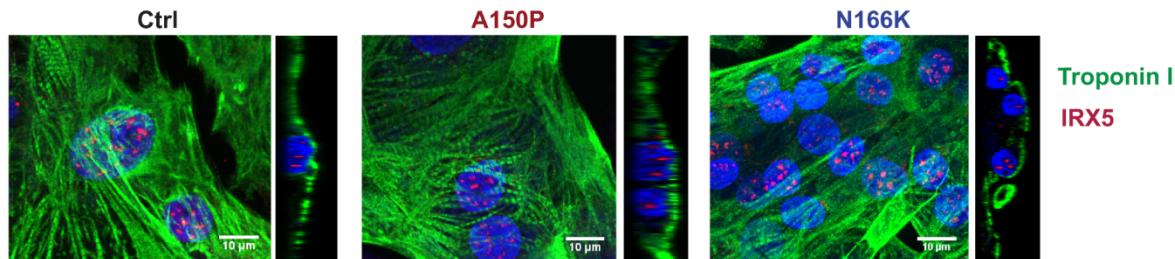
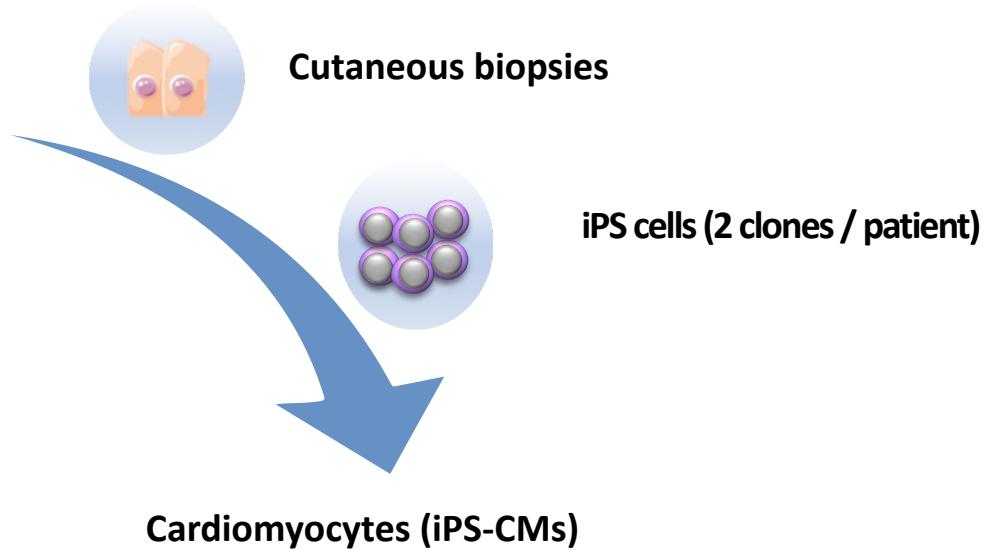
Ventricular repolarization defect

Costantini et al, 2005



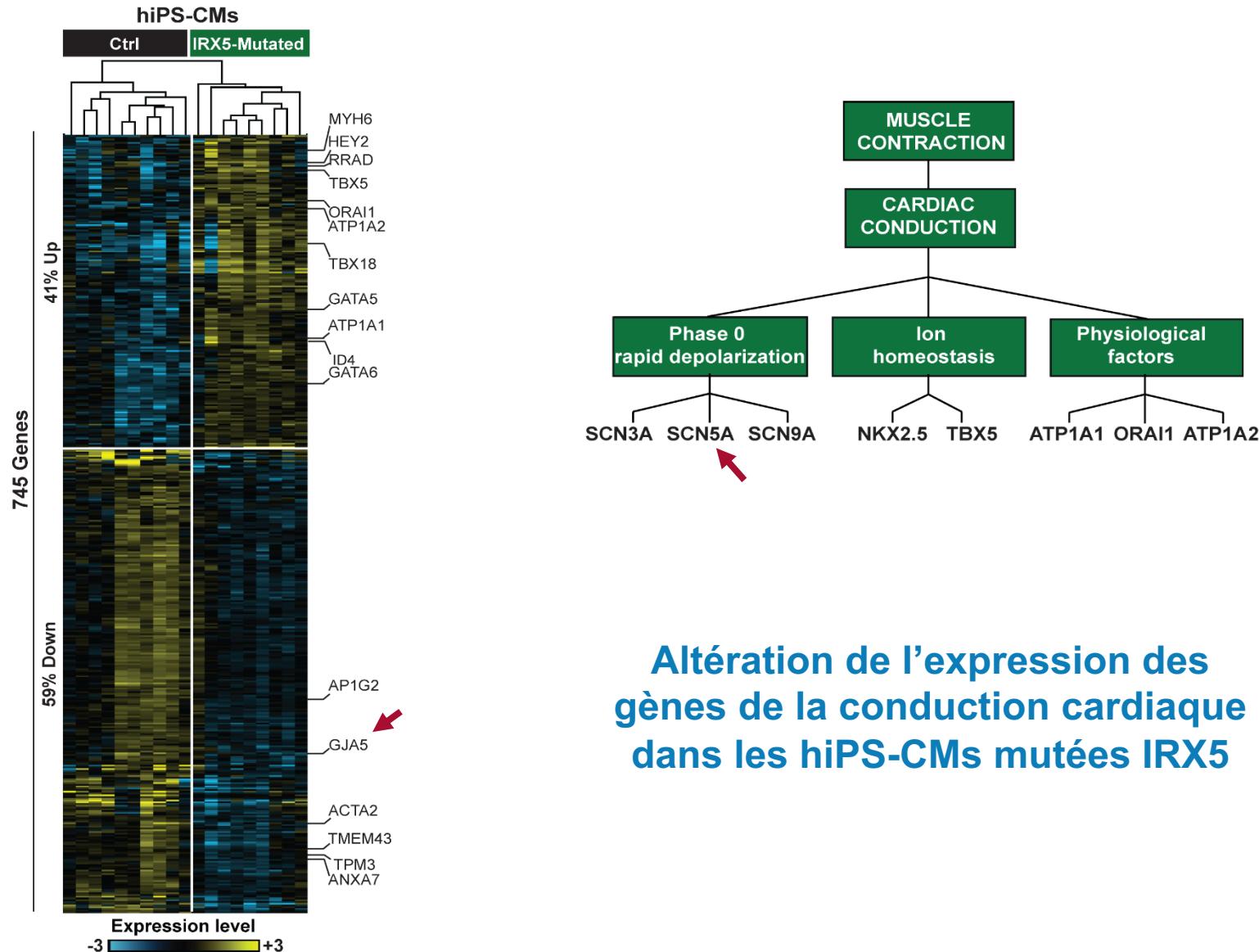
Function dans le
coeur humain:
?

Cellules iPS présentent des mutations IRX5

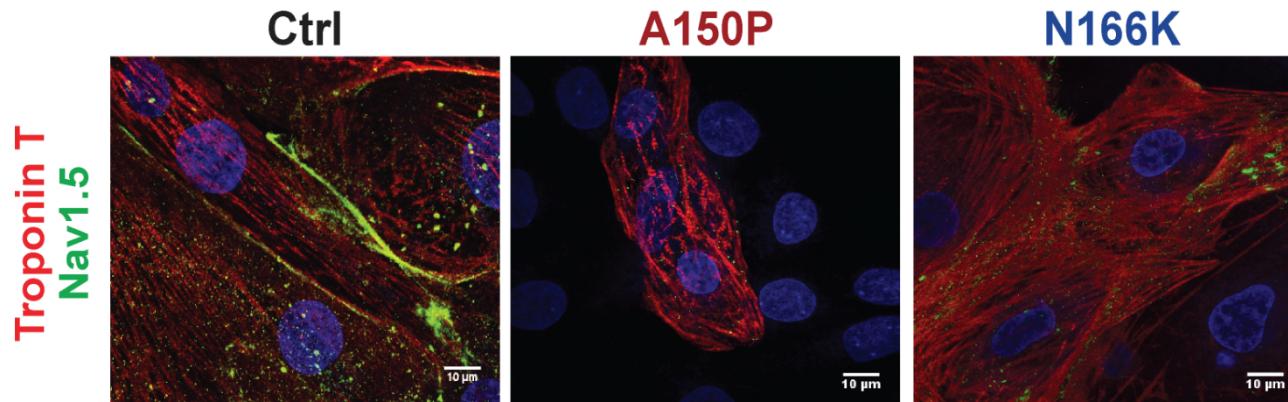
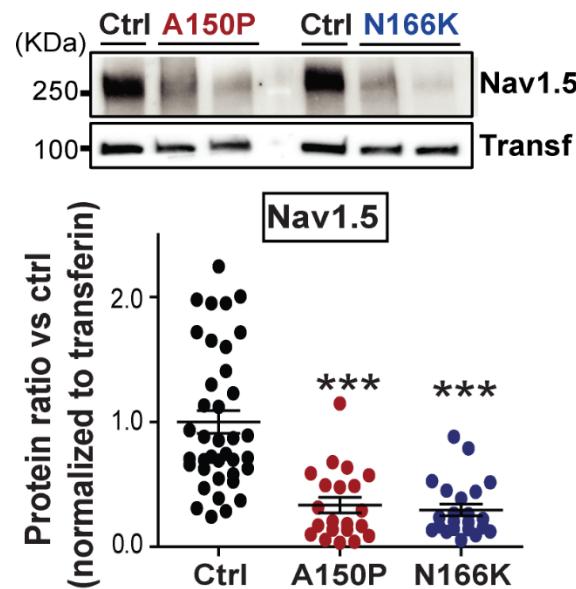
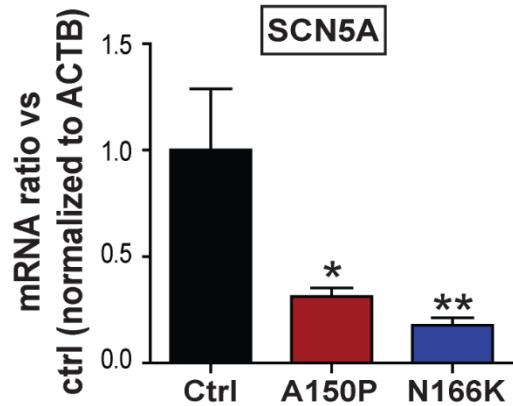


Mutations IRX5 altèrent l'expression des gènes cardiaques

Transcriptomic analysis (DGE sequencing)

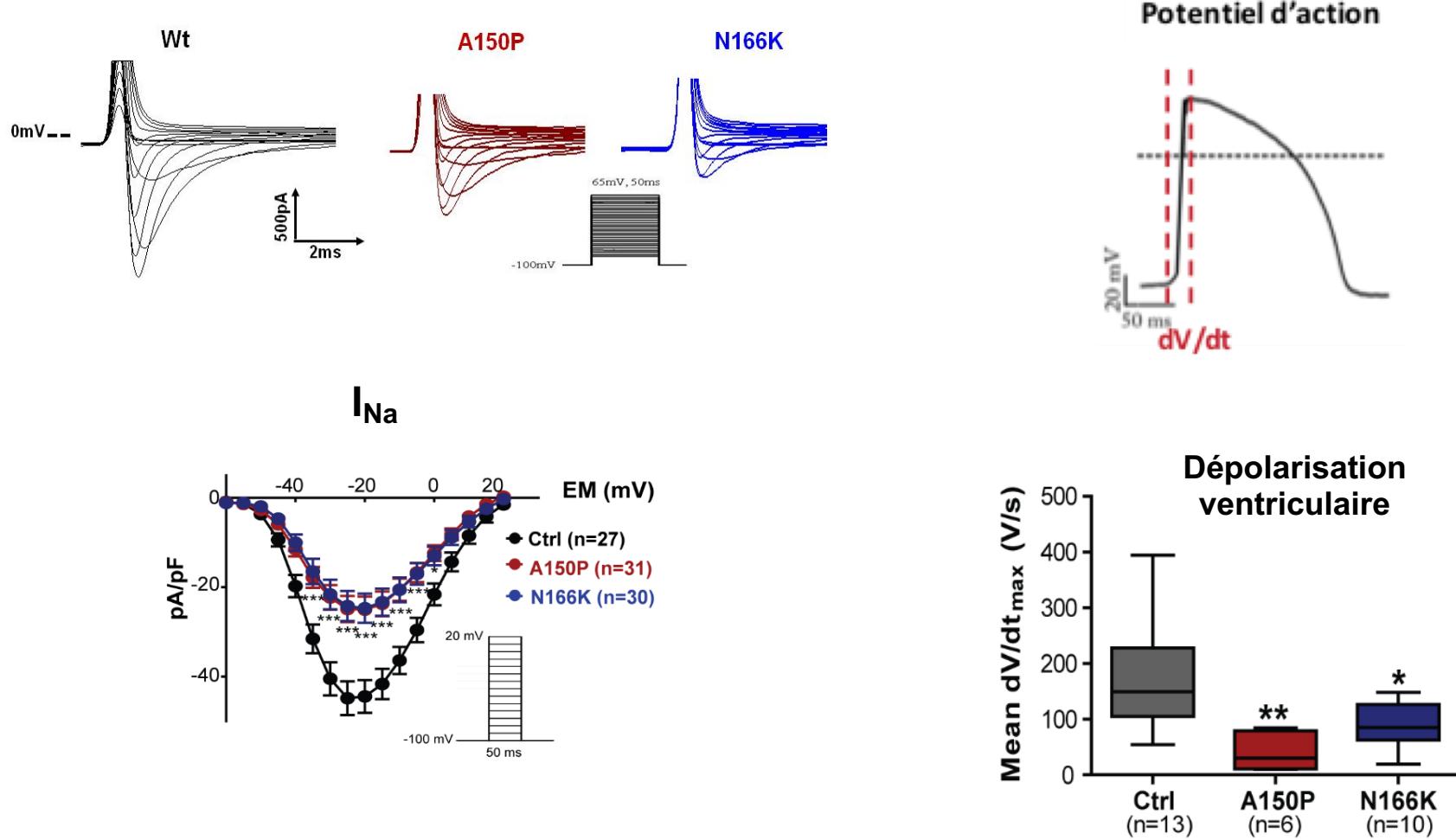


Mutations IRX5 altèrent l'expression des gènes cardiaques



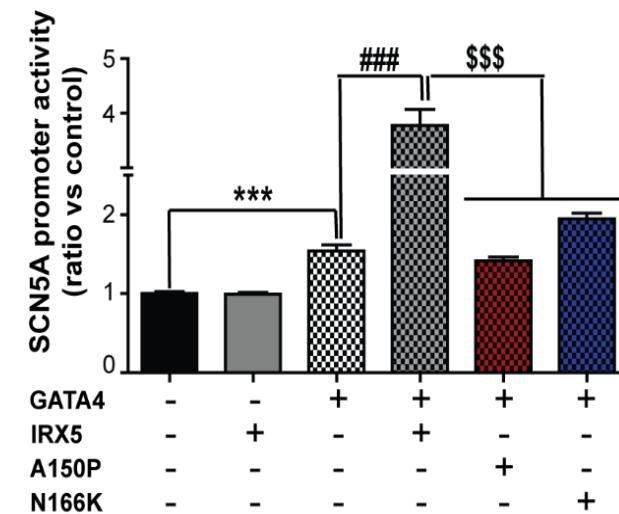
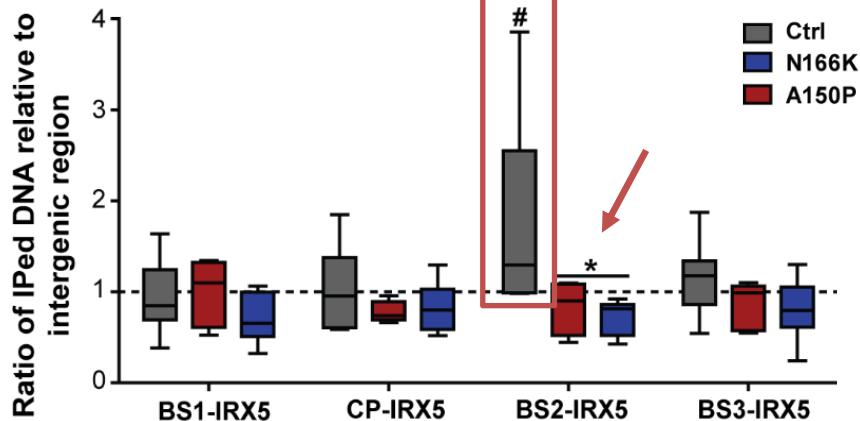
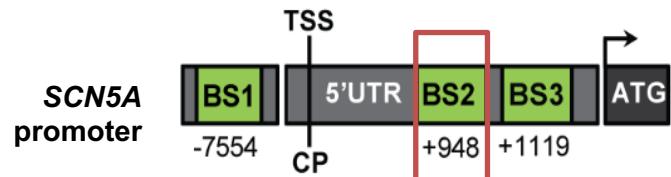
Réduction de l'expression de SCN5A dans les hiPS-CMs mutées IRX5

Altération de la fonction SCN5A



Altération de la fonction SCN5A dans les iPS-CMs mutées IRX5

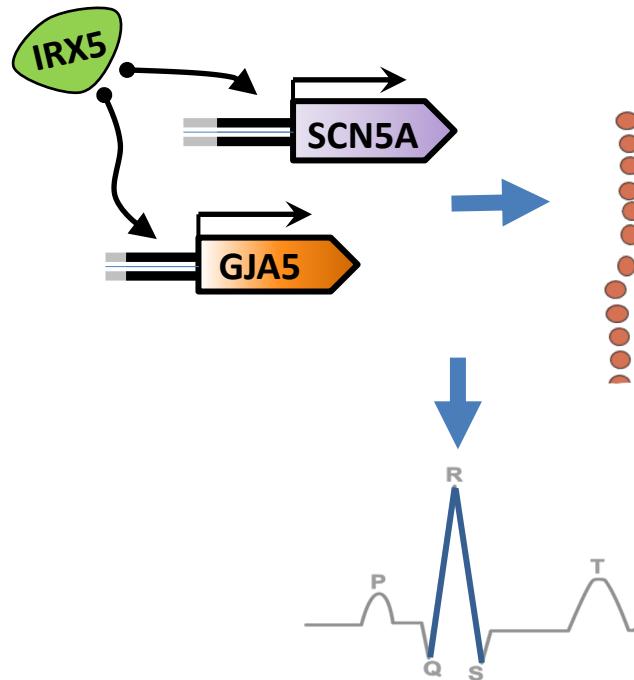
IRX5 interagit et active le promoteur de SCN5A



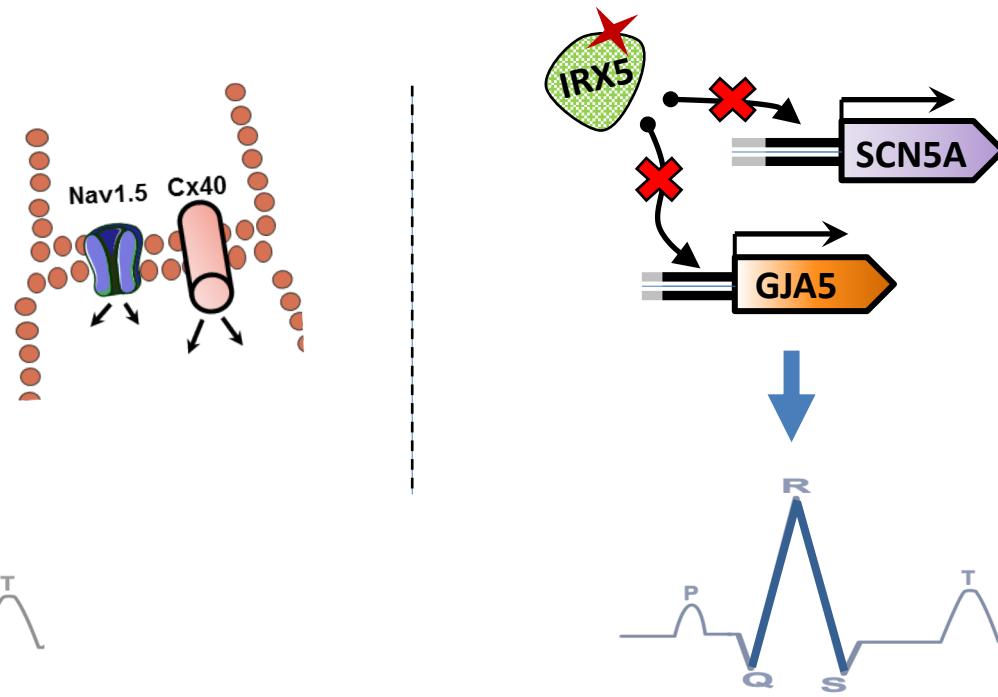
- IRX5 interagit directement avec le promoteur de SCN5A
- IRX5 potentialise les effets de GATA4 sur l'activation du promoteur de SCN5A

Working model

IRX5, avec GATA4, régule l'expression d'acteurs majeurs de la conduction électrique cardiaque chez l'homme.



conduction ventriculaire normale



Conduction ventriculaire ralentie chez les patients présentant un syndrome d'Hamamy.

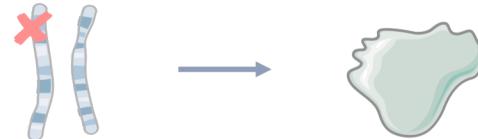
Application aux arythmies cardiaques

Complexité variable suivant la nature de la pathologie

Pathologie monogénique – phénotype restreint

Syndrome du QT Long

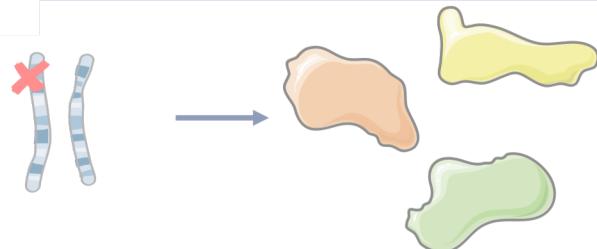
Mutation : Canal ionique



Pathologie monogénique – phénotype complexe

Syndrome d'Hamamy

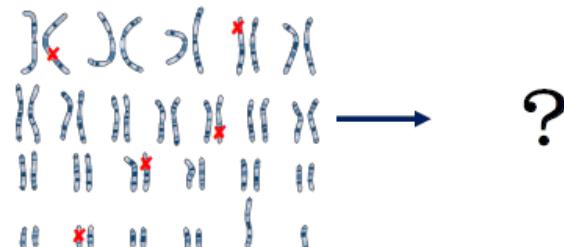
Mutation : Facteur de transcription



Pathologie oligogénique

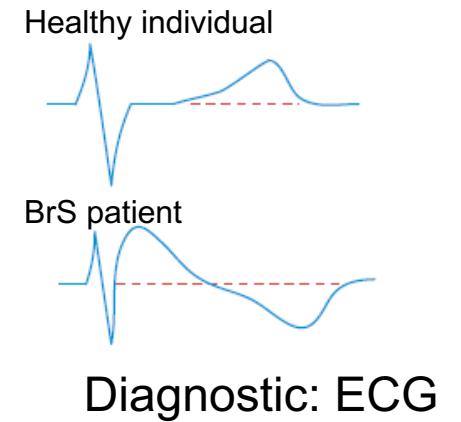
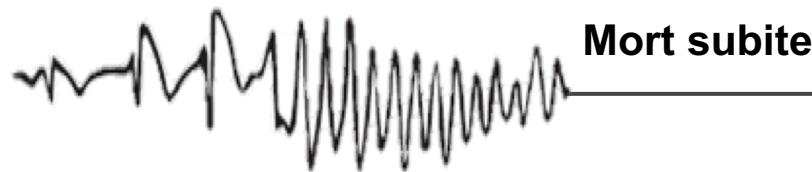
Syndrome de Brugada

Mutation : variable ou non identifiée

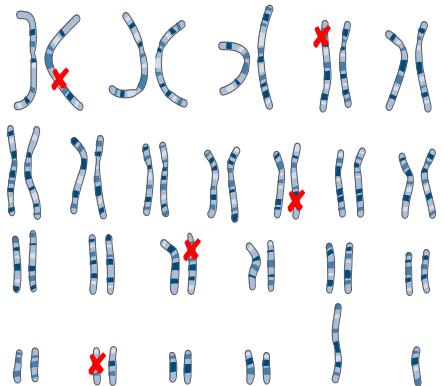


Niveau de complexité 3: Syndrome de Brugada

Une anomalie clinique



Génétique complexe

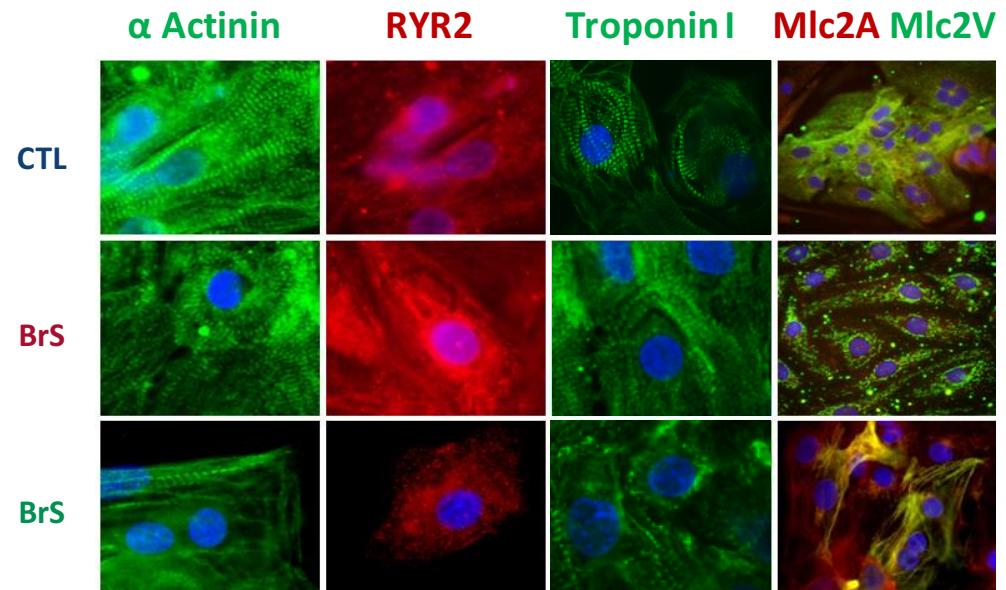
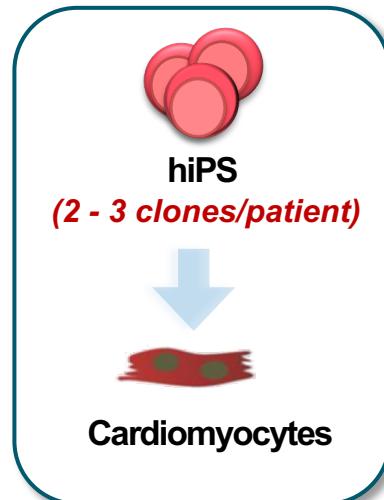
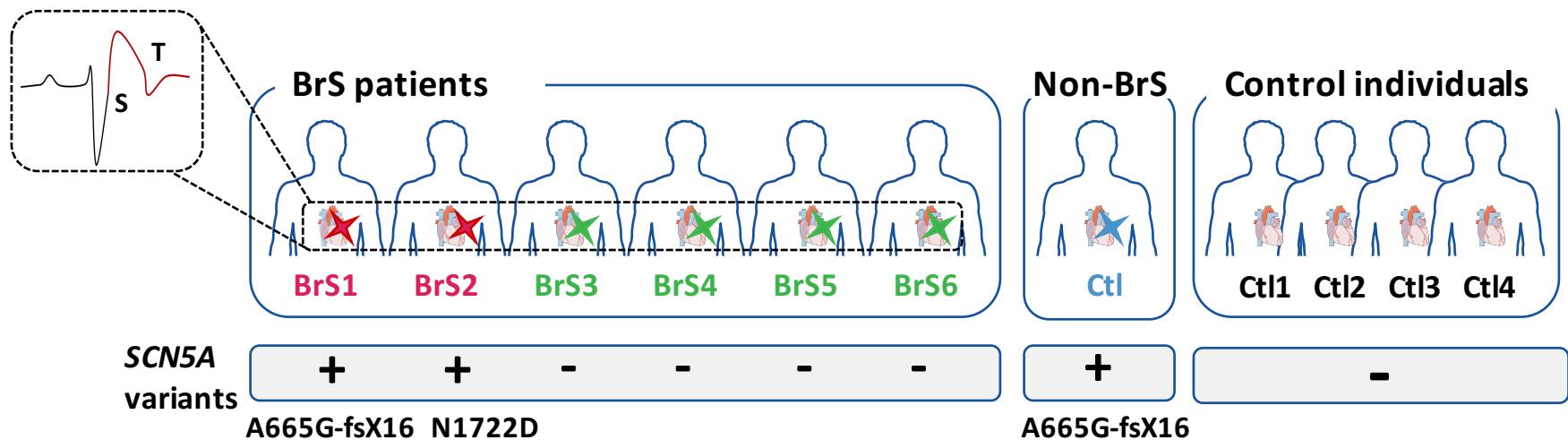


Cellular phenotype

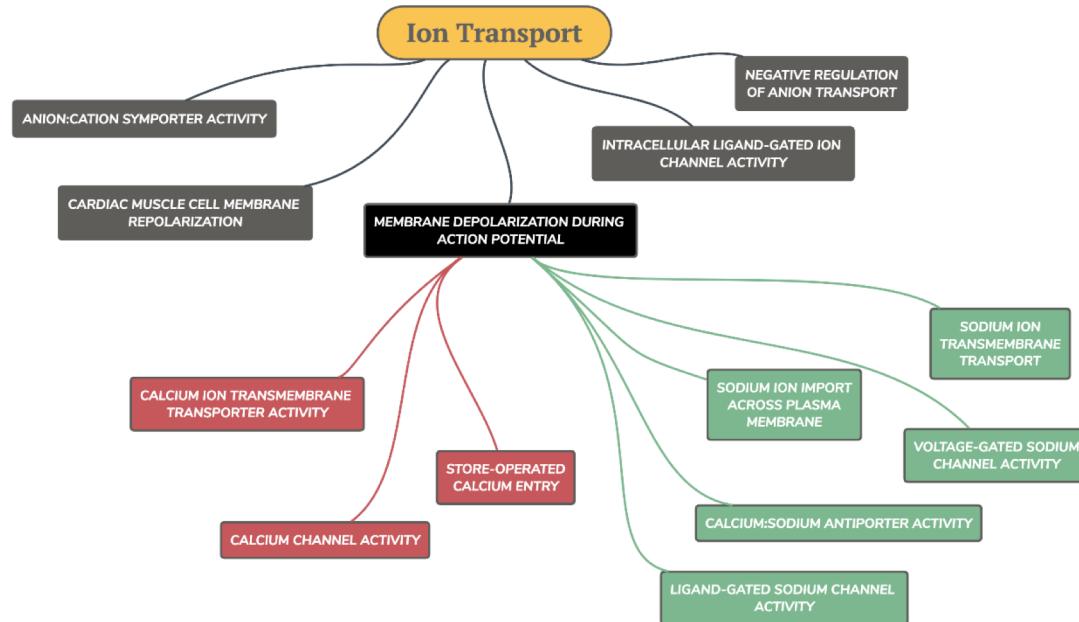
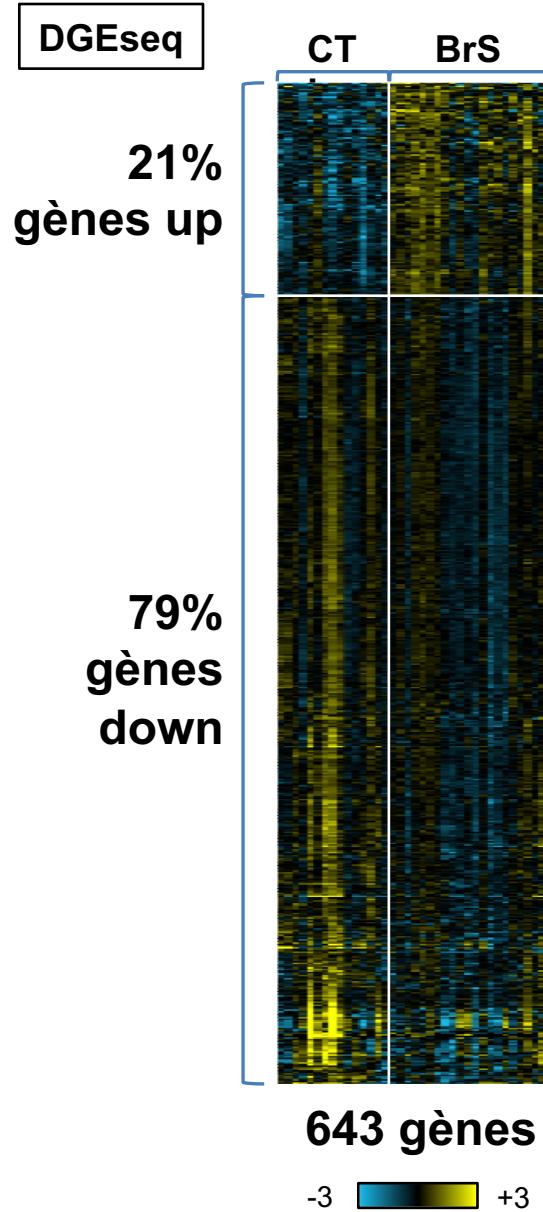
Y a t'il un phénotype cellulaire Brugada-spécifique?

Y a t'il un phénotype cellulaire Brugada-spécifique?

Méthodologie

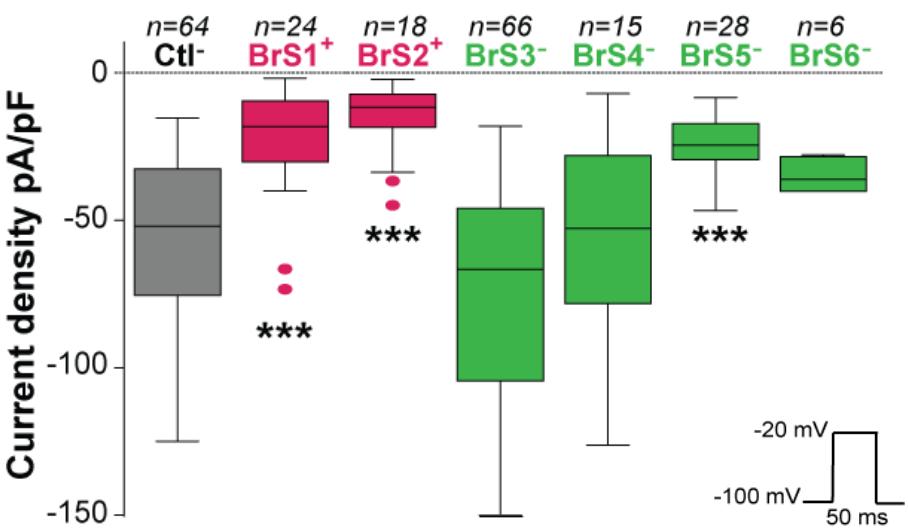
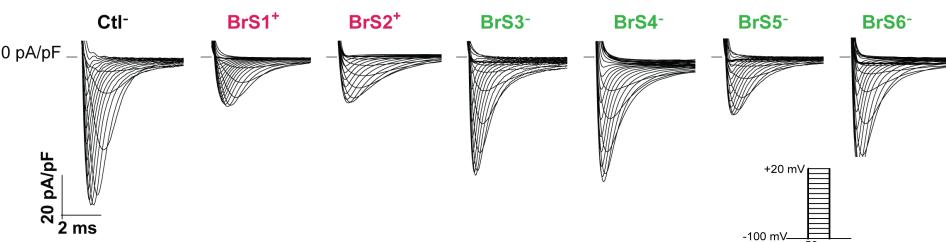


Analyse transcriptionnelle

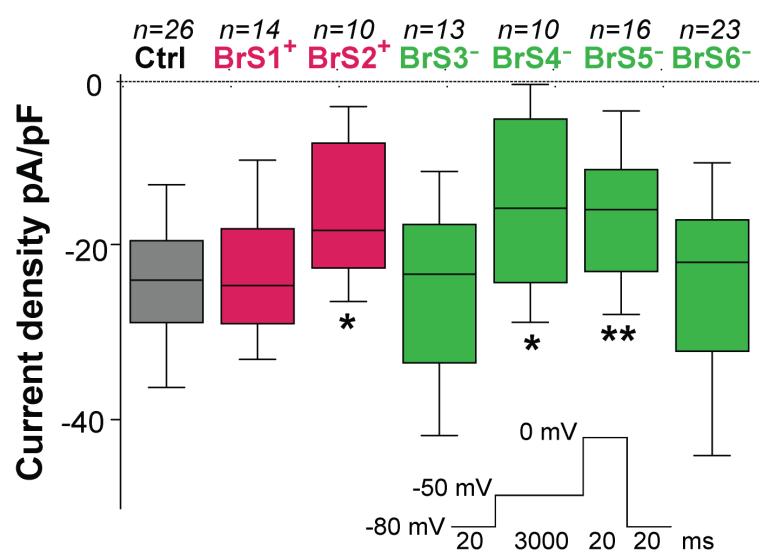
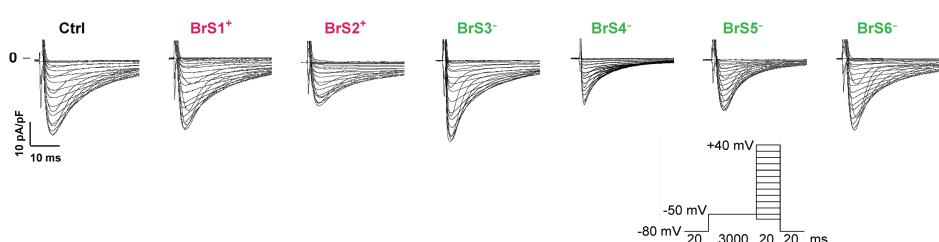


Altération des fonctions calcique et sodique

Analyse de fonction cardiaque sodique

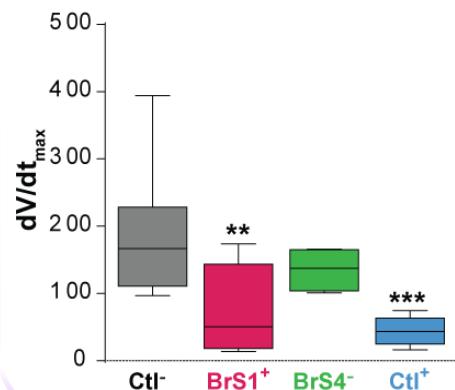
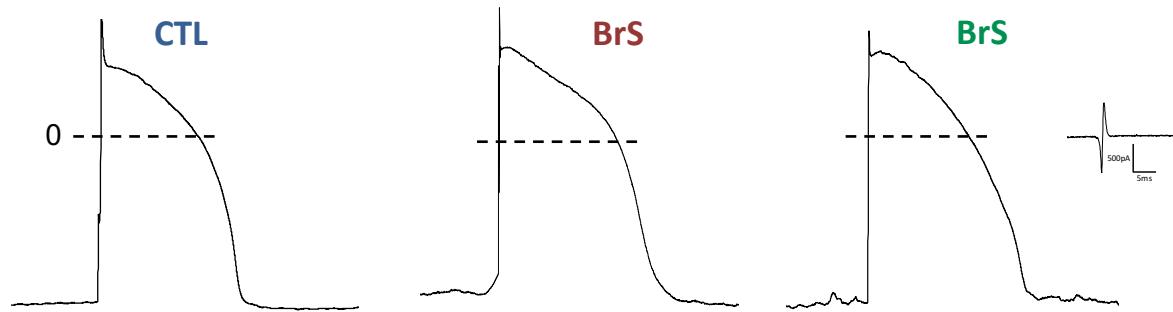
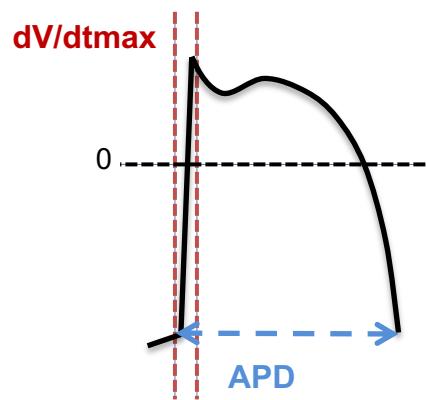


Analyse de fonction cardiaque calcique

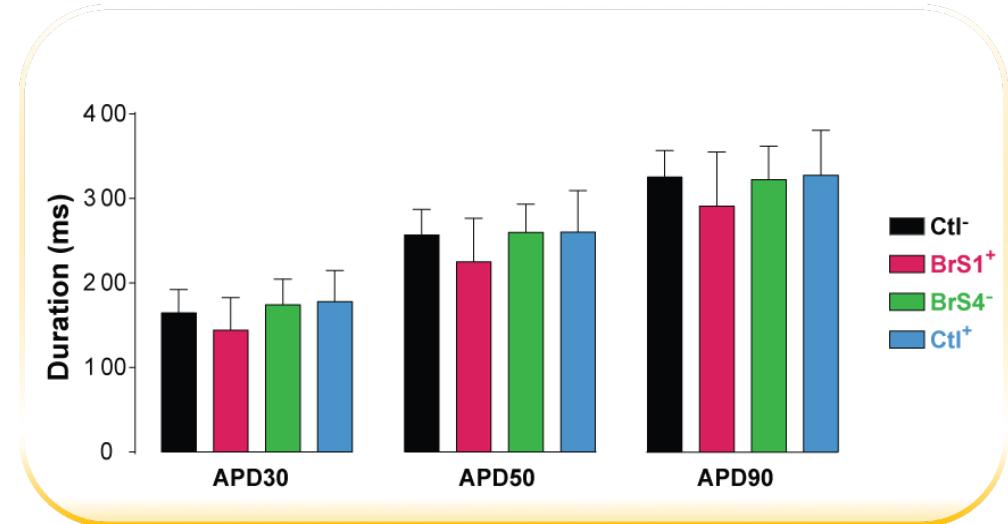


La reduction de I_{Na} et I_{Ca} n'est pas un trait commun entre toutes les lignées iPS-CMs BrS

Analyse des potentiels d'action



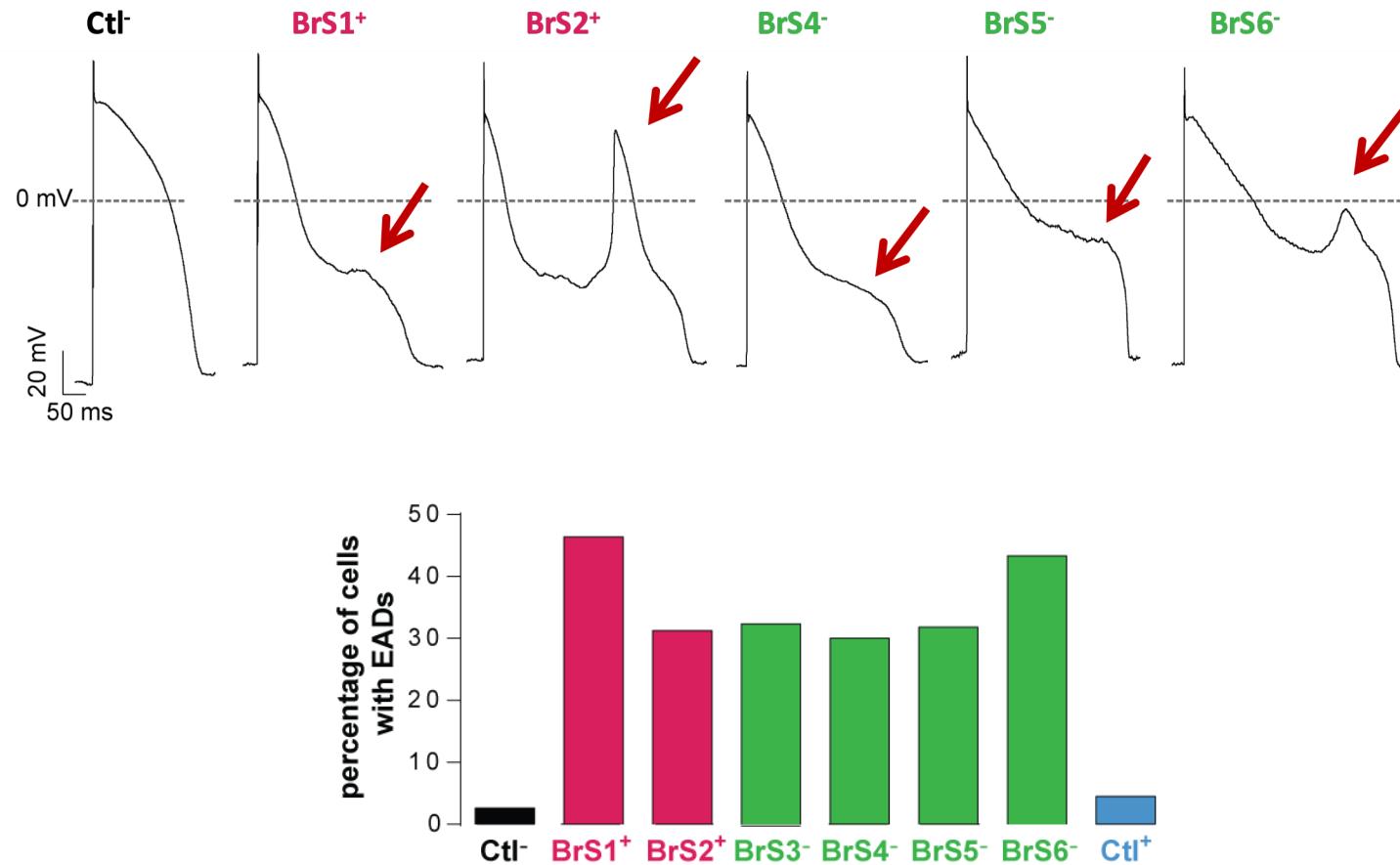
Dépolarisation



Repolariisation

Modification génotype-spécifique de la vitesse de dépolarisation

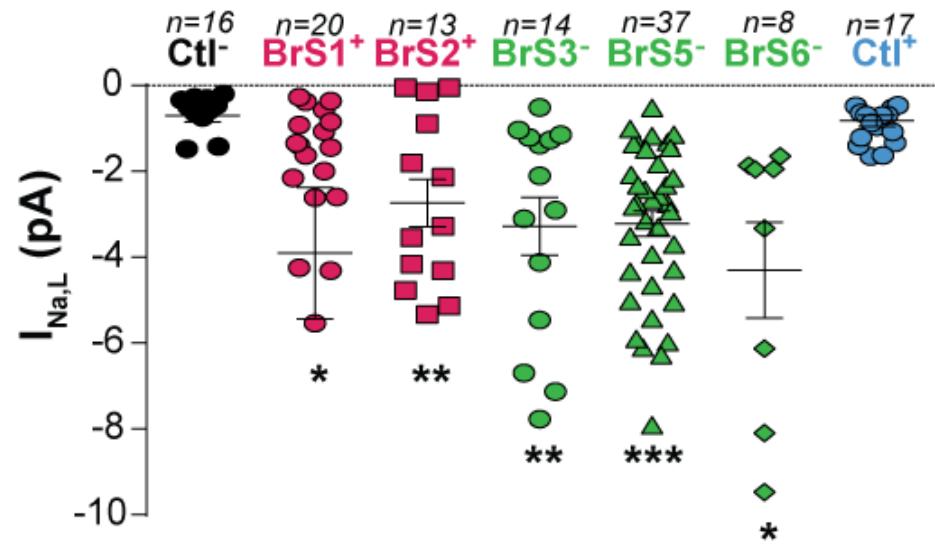
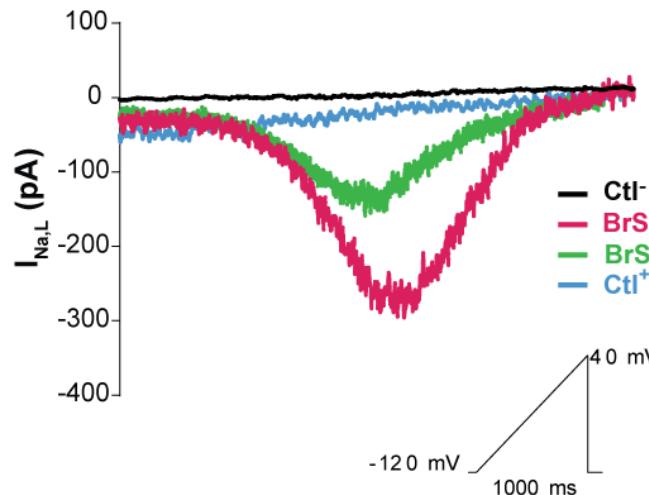
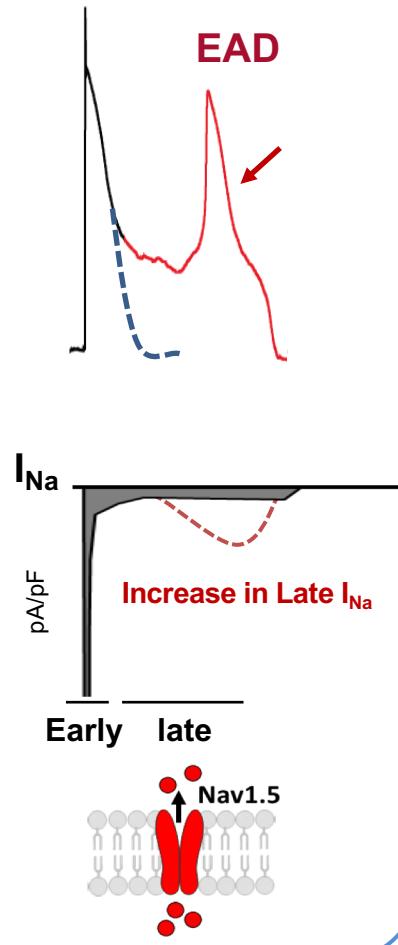
EADs: phénotype commun aux BrS-CMs



EADs dans 30% des PA ventriculaires: phénotype cellulaire commun au Brugada?

Courant sodique persistant

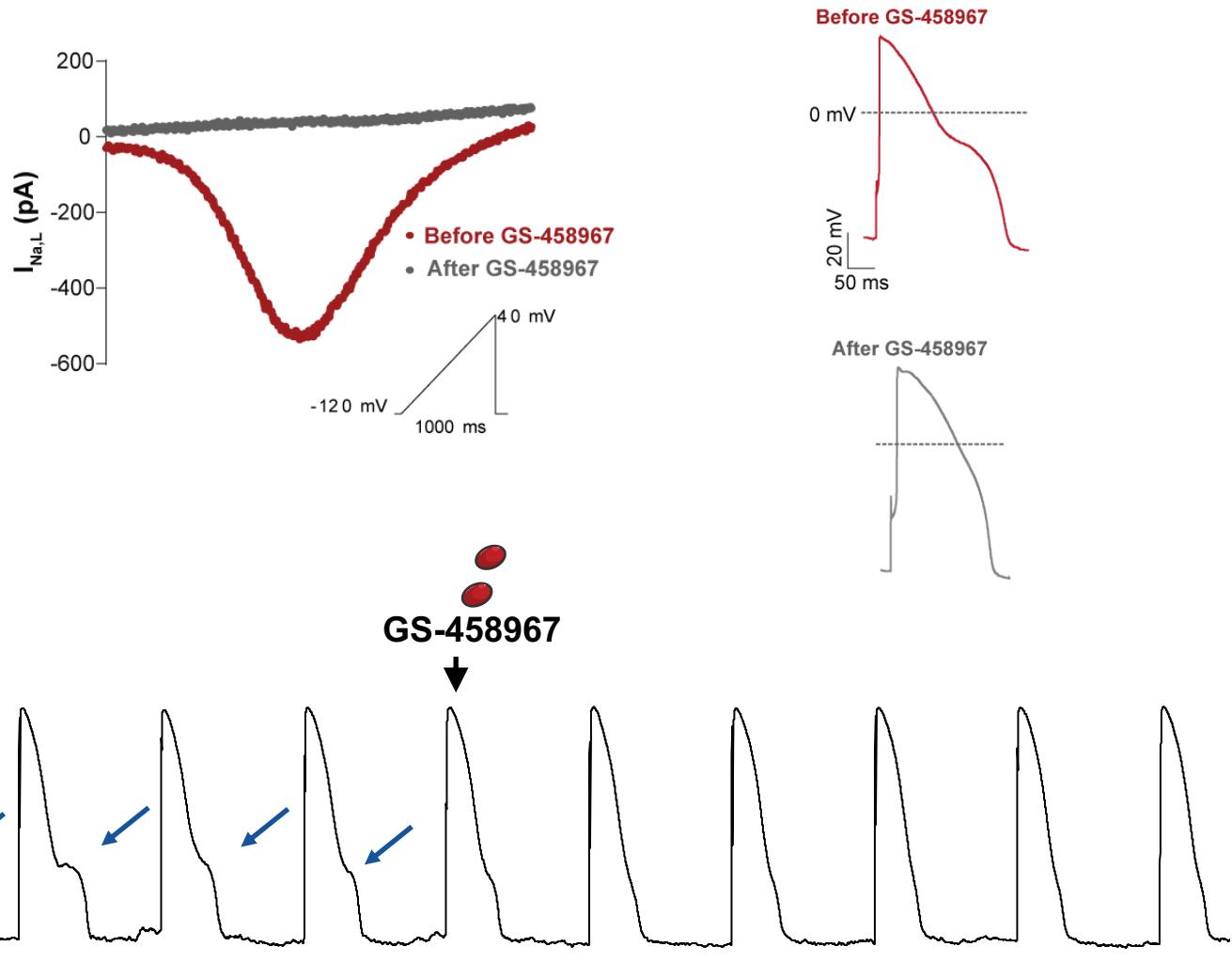
Hypothesis



$I_{Na,L}$ increases in Brugada iPS-CMs lines

Late sodium current inhibition

GS-458967 \rightarrow $I_{Na,L}$



$I_{Na,L}$ increase is implicated in EADs formation in Brugada iPS-CMs lines

Conclusions

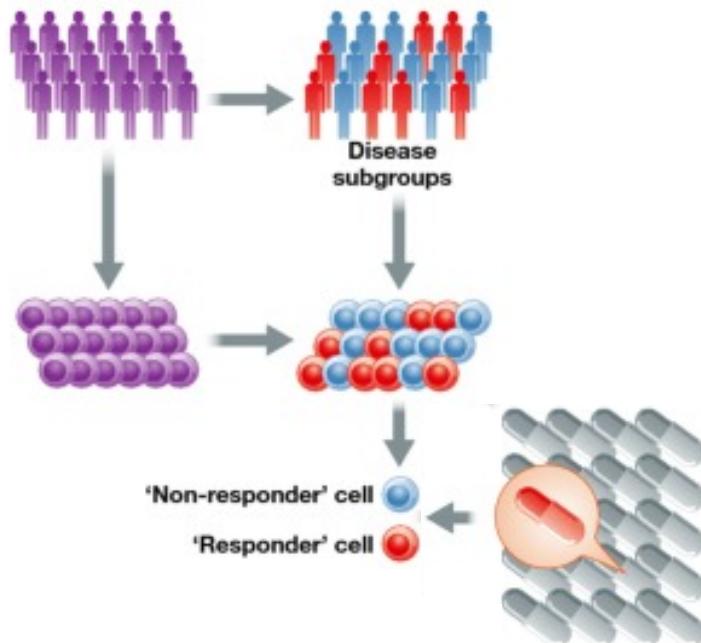
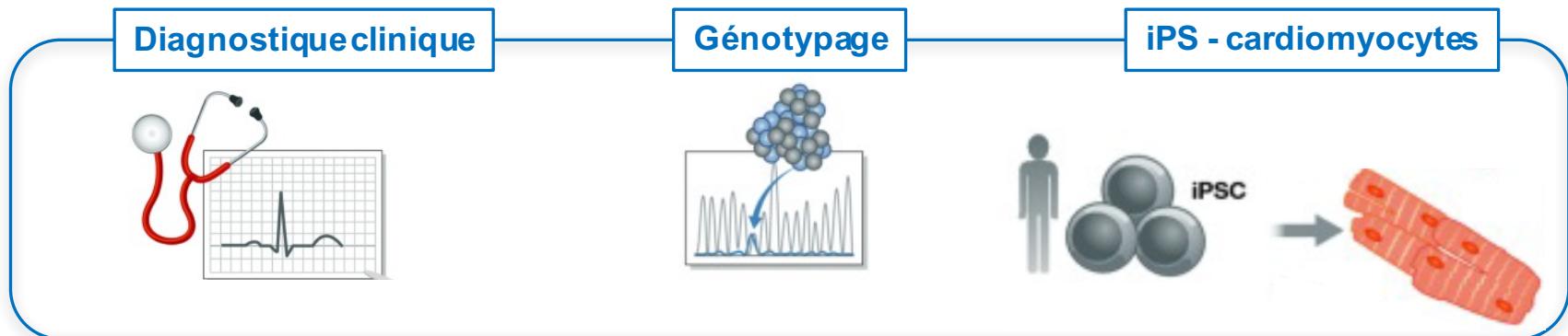
Le phénotype BrS est localisé à l'intersection de plusieurs anomalies électrophysiologiques

- ✓ Importance de la dépolarisation dans le phénotype cellulaire BrS
- ✓ Les anomalies du I_{Na} semblent être associées à la présence d'un variant SCN5A
- ✓ Les EADs semblent ubiquitaires, sans lien avec le génotype des patients

Les BrS ont une prédisposition cellulaire aux arythmies

Contribution de ces anomalies aux arythmies observées chez les patients?

Perspectives



✓ Spécificités dans les phénotypes

Plateforme iPS
Robotisation de la culture des iPS

✓ Spécificités dans les réponses aux médicaments

Patch automatique

iPS: avantages et inconvénients

Tous les avantages des cellules souches embryonnaires sans leurs inconvénients

Avantages:

- Maintien du patrimoine génétique du patient
- Conservation de la mutation du patient
- Potentiel de différenciation en tous types cellulaires
- Cellules humaines
- Peu de problèmes éthiques
- Possibilité de correction génique

Inconvénients:

- Cellules différencierées immatures
- Insertion potentielle d'anomalies génétiques
- Analyse *in vitro*: échelle cellulaire