



Les cellules iPS pour l'étude de pathologies cardiaques



Nathalie GABORIT

L'unité de recherche de l'institut du thorax

Inserm UMR 1087 / CNRS UMR 6291

Nantes, France

☐ 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

☐ Introduction générale

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

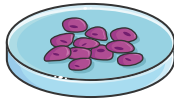
☐ Aspects technologiques

- ☐ 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 *in vitro*

Lignées cellulaires immortalisées (Cos-7, HEK293)



Origine animale
Origine humaine

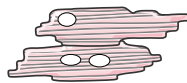
Evaluation de l'effet d'une mutation d'un canal ionique sur sa fonction.

- 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

Cultures primaires de cardiomyocytes



Origine animale

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 *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:

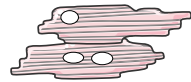
- fibrose dans le myocarde ventriculaire
- expression hétérogène de la Connexine 43 (protéine de la conduction)

Royer A, et al. Circulation. 2005

Limites des modèles de pathologies cardiaques

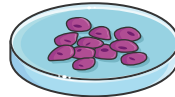
Modèles *in vitro*

Cultures
primaires



Origine animale

Lignées cellulaires
immortalisées



Pas de patrimoine
génétique

Modèles *in vivo*

Animaux
transgéniques



Patrimoine génétique et fonction
biologiques différentes

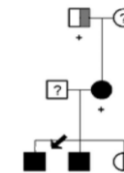
Hétérogénéité



Clinique



Génétique



Phénotypique

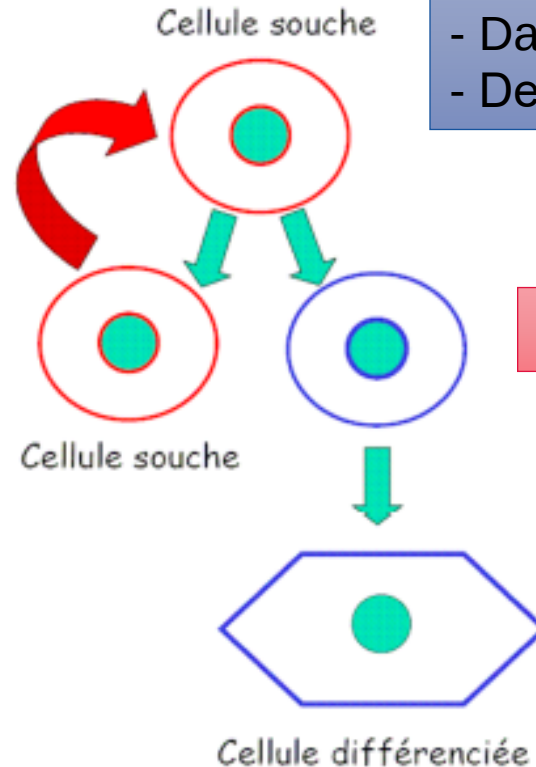
**Nécessité de disposer de nouveaux outils pour comprendre les
mécanismes cellulaires à l'origine des pathologies**

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

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

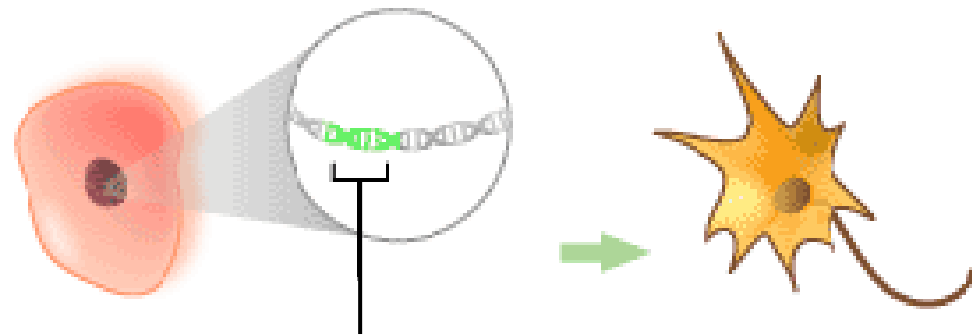
→ Conduit à la formation d'un clone cellulaire

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



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

❑ Les cellules souches sont caractérisées par des stades de maturation différents qui déterminent leur potentiel de différenciation

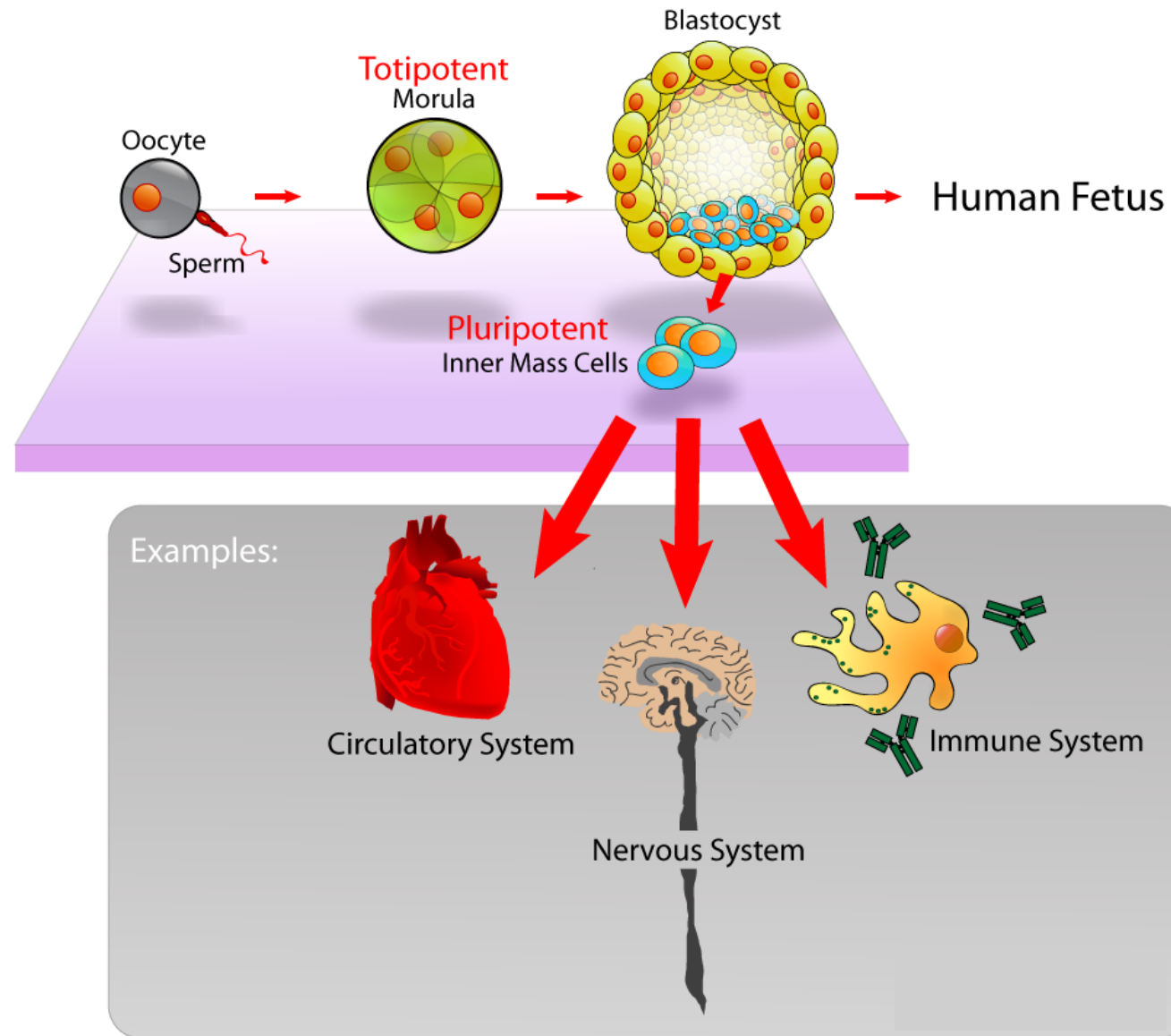
❑ Ces stades de maturation sont liés au stade de développement

❑ On identifie des cellules:

- Totipotentes
- **Pluripotentes**
- Multipotentes
- Unipotentes

Cellules de la vie embryonnaire

Cellules souches embryonnaires



Facteurs intrinsèques

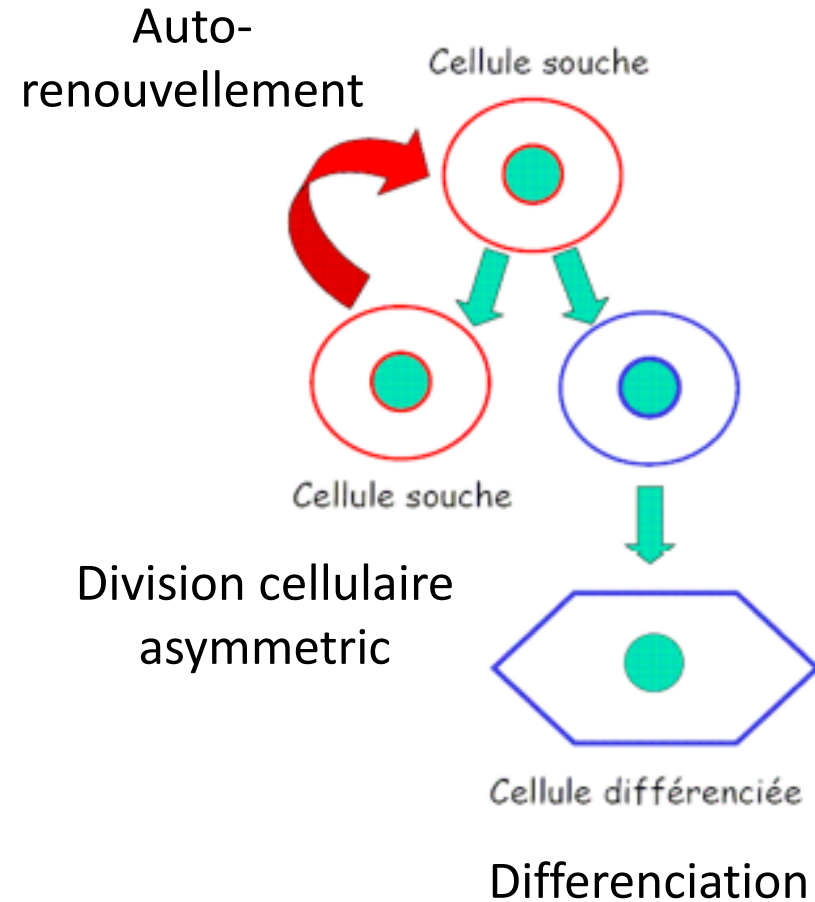
= programme d'expression de gène

Facteurs de transcription

Facteurs extrinsèques

= Micro-environnement (niche)

- Matrice extracellulaire
- Facteurs de croissance



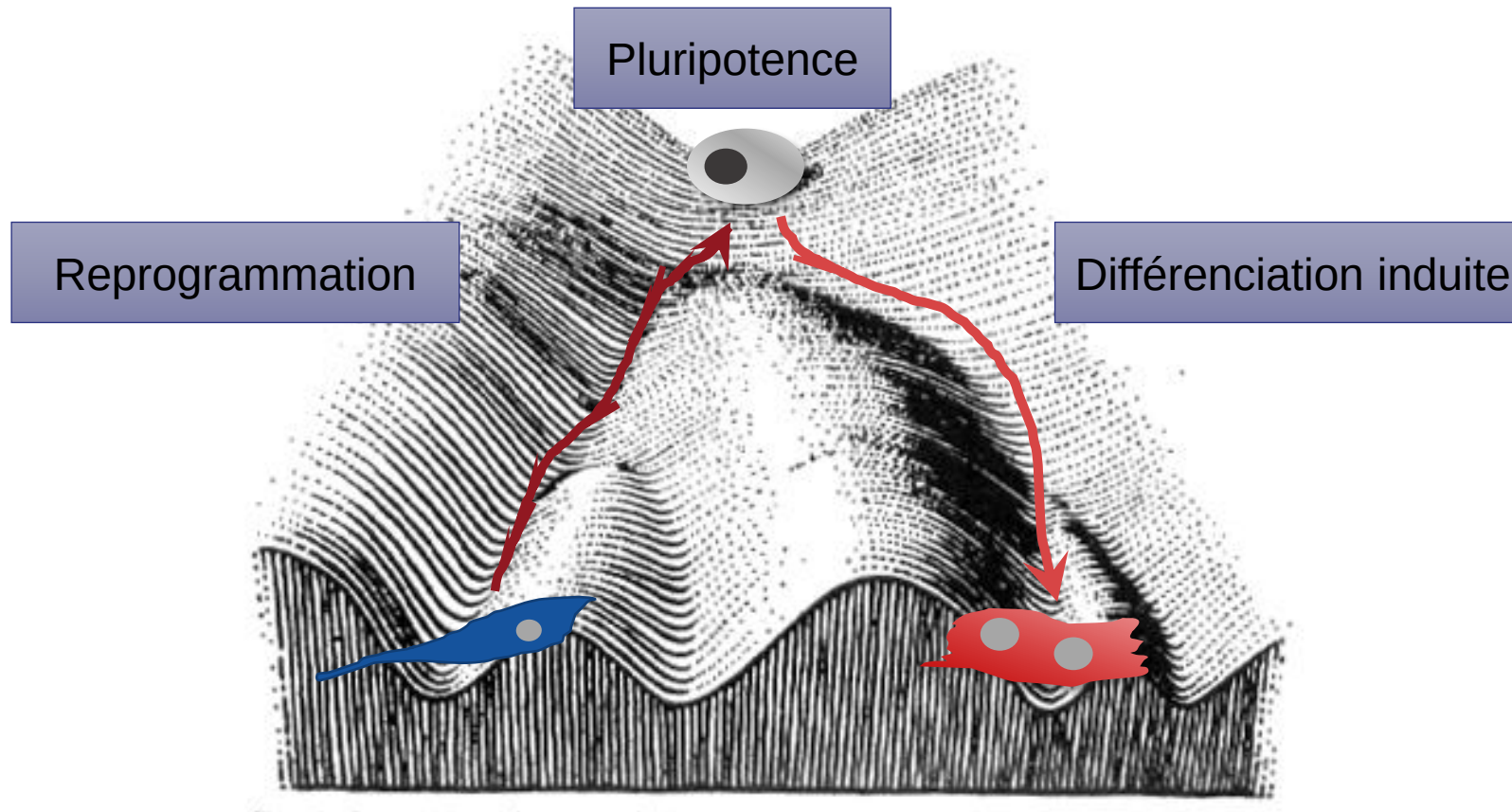
Si on utilisait ces connaissances pour modifier le devenir d'une cellule?

i.e.

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

→ Reprogrammer des cellules adultes en PSC induites

« Forcer » le destin cellulaire

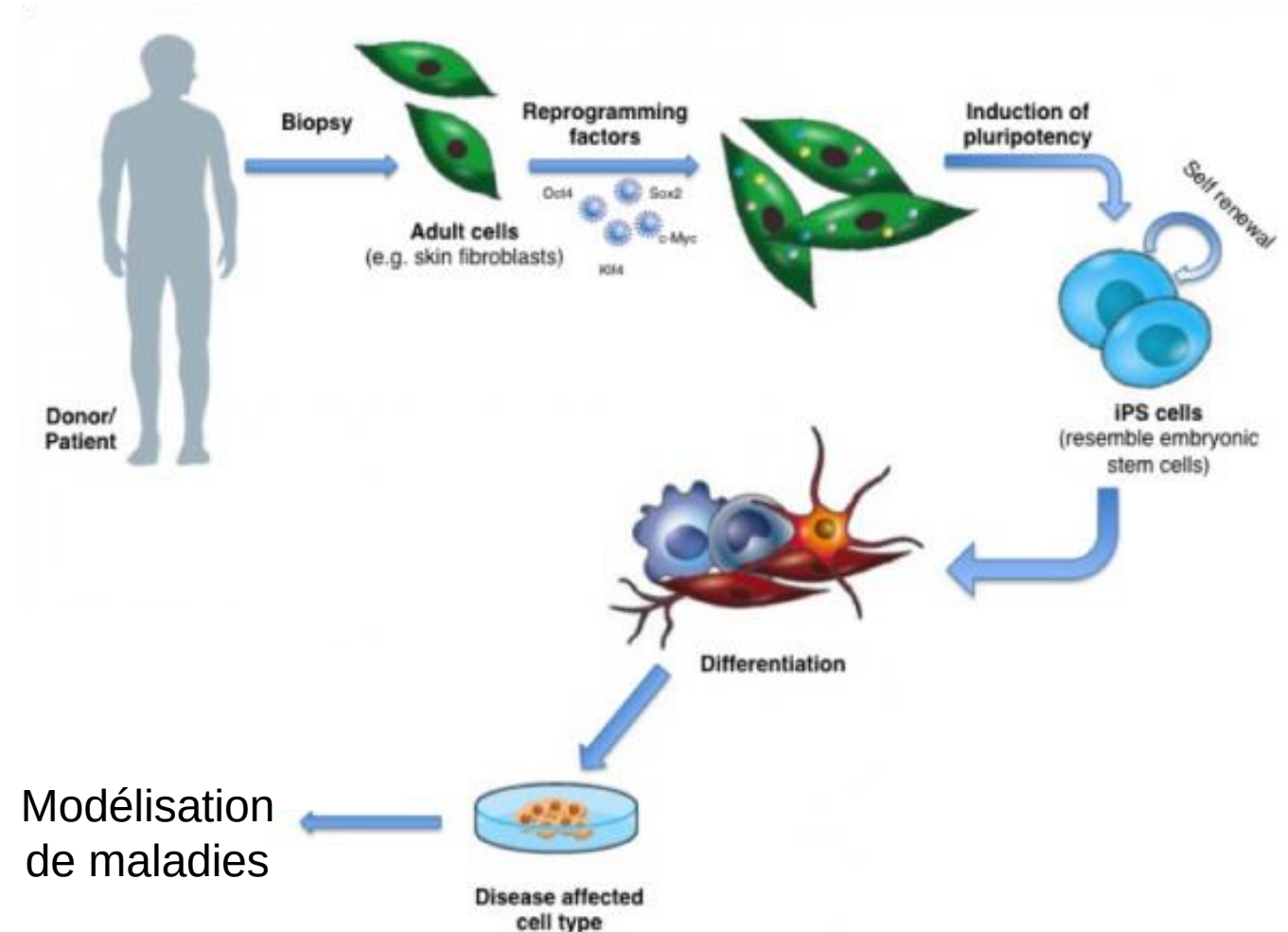


Yamanaka S, Gurdon J: Prix nobel de médecine 2012

"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



☐ Introduction générale

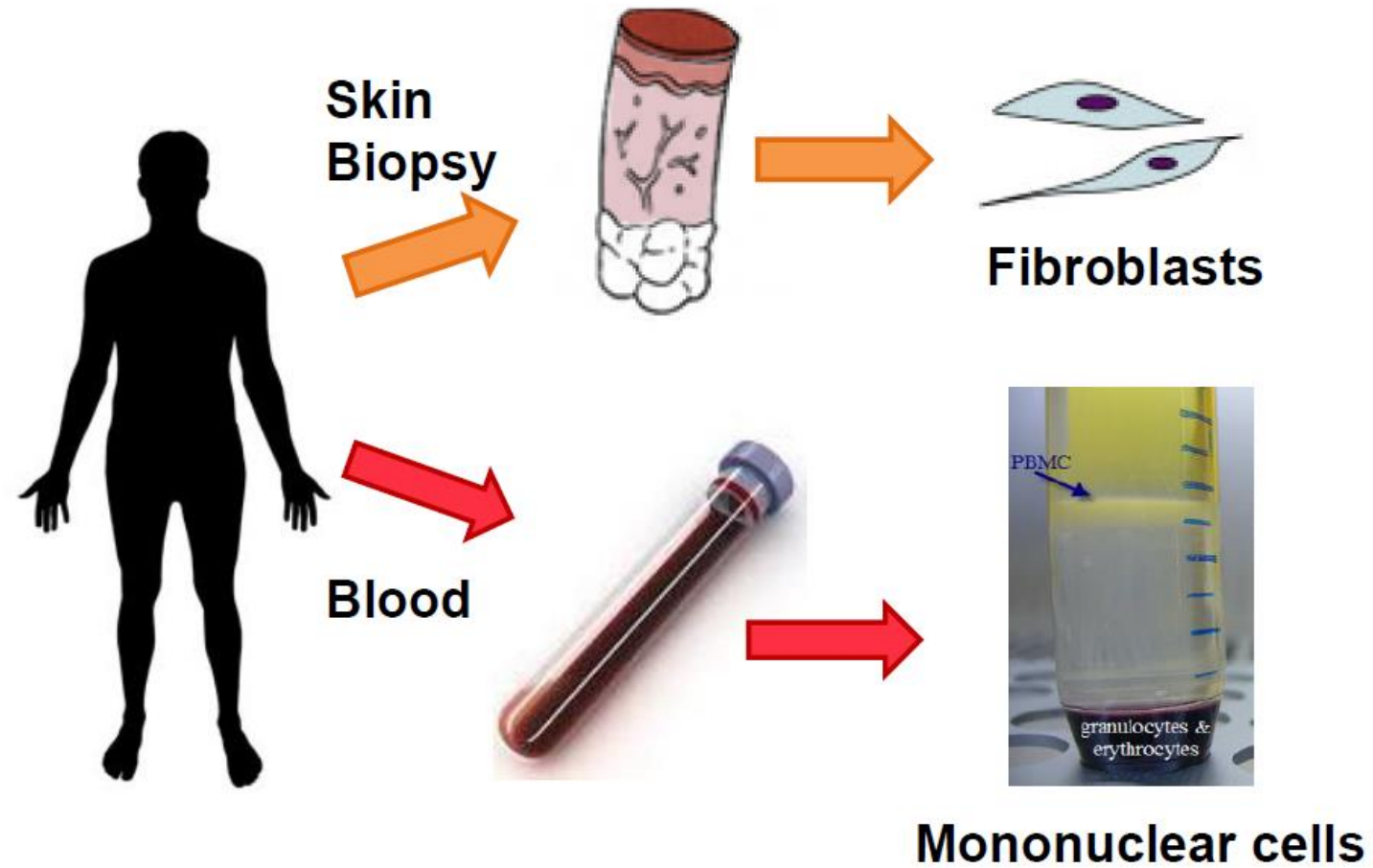
- ☐ Modèles d'étude classiques de pathologies cardiaques
- ☐ Cellules souches
- ☐ Technologie des cellules iPS

☐ Aspects technologiques

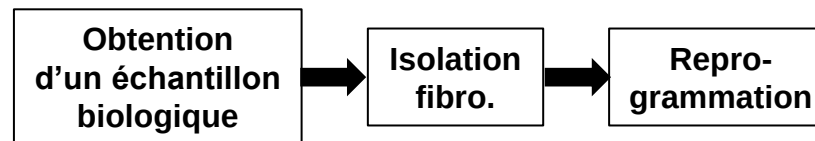
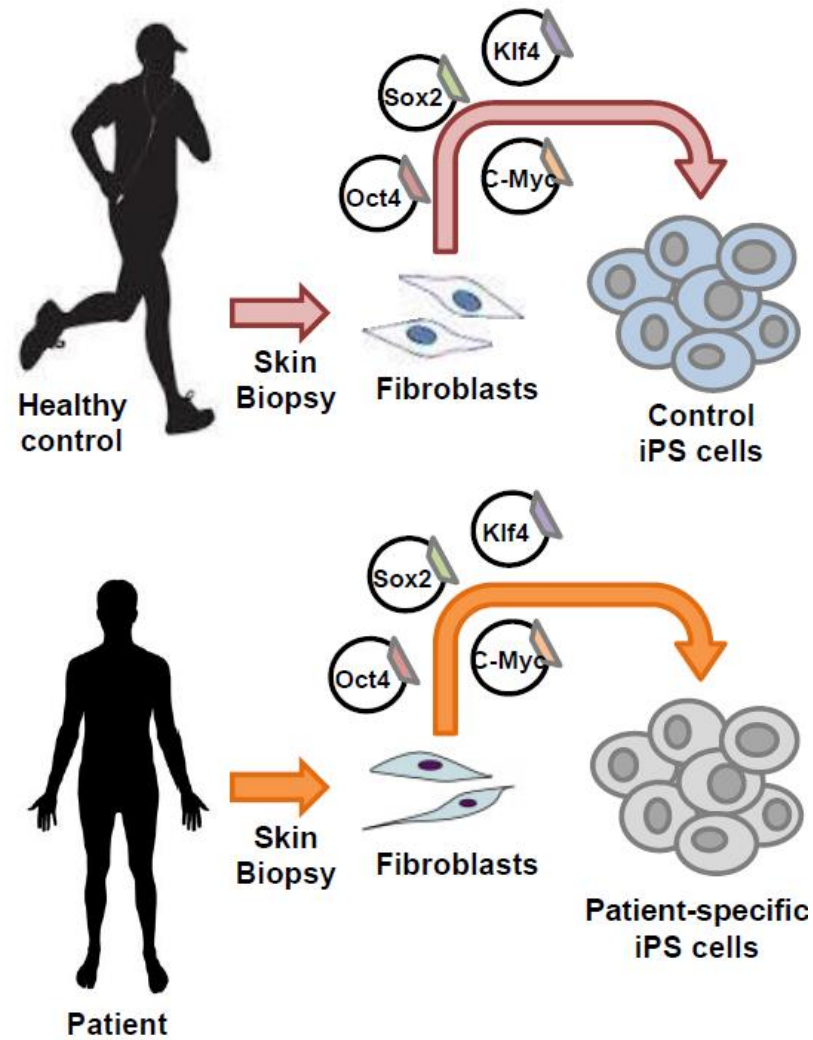
- ☐ Comment générer des cellules iPS
- ☐ Comment caractériser des cellules iPS
- ☐ Comment générer des iPS-CMs
- ☐ Comment caractériser des iPS-CMs

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

La reprogrammation

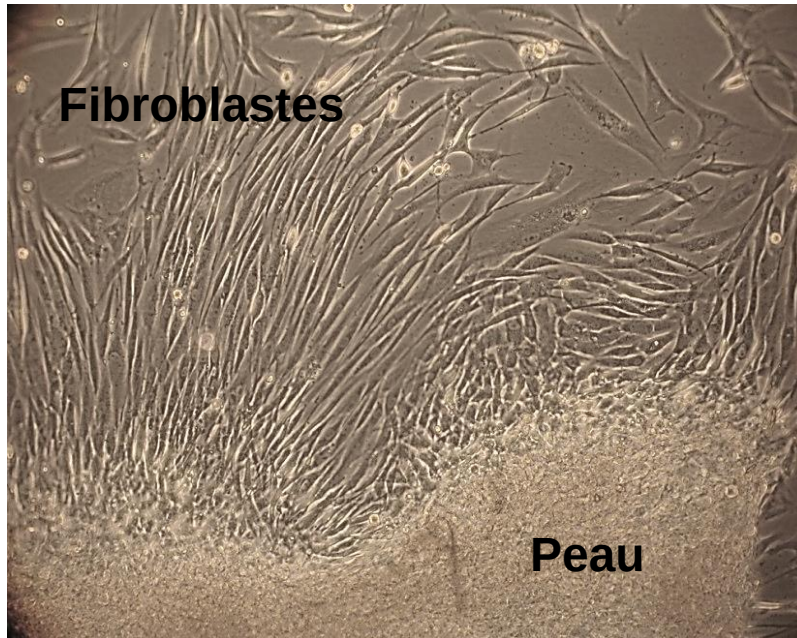


La reprogrammation

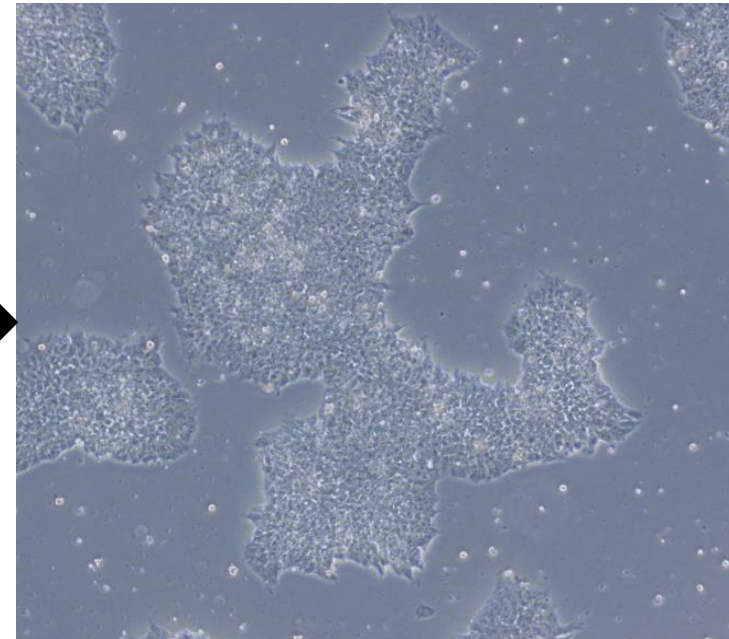


La reprogrammation

Reprogrammation



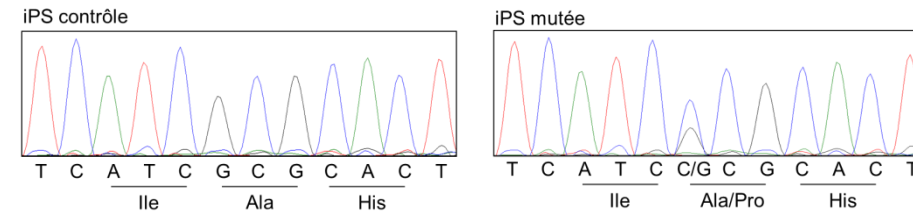
Fibroblastes de peau



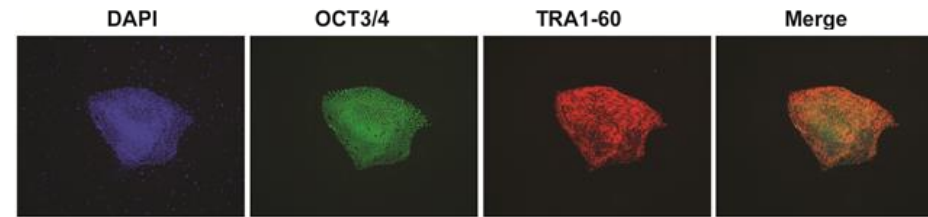
Colonies de cellules iPS

Comment valider des cellules iPS humaines

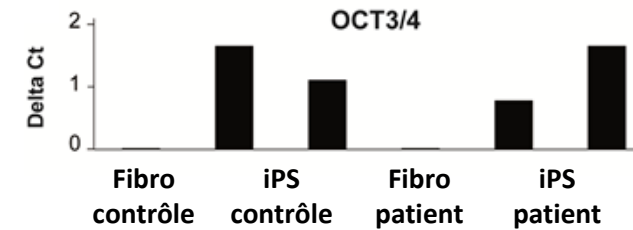
Séquençage de la mutation du patient.



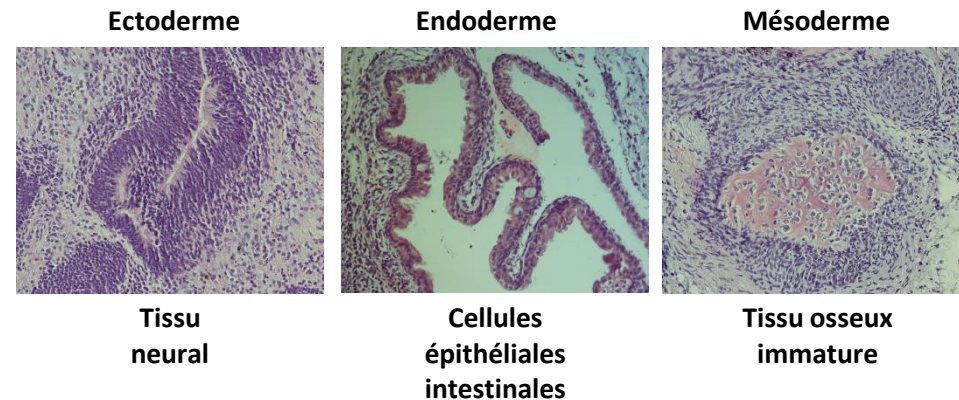
Expression de marqueurs protéiques de cellules souches: Oct3/4, TRA-1-60 (immunomarquage et FACS).



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).



☐ Introduction générale

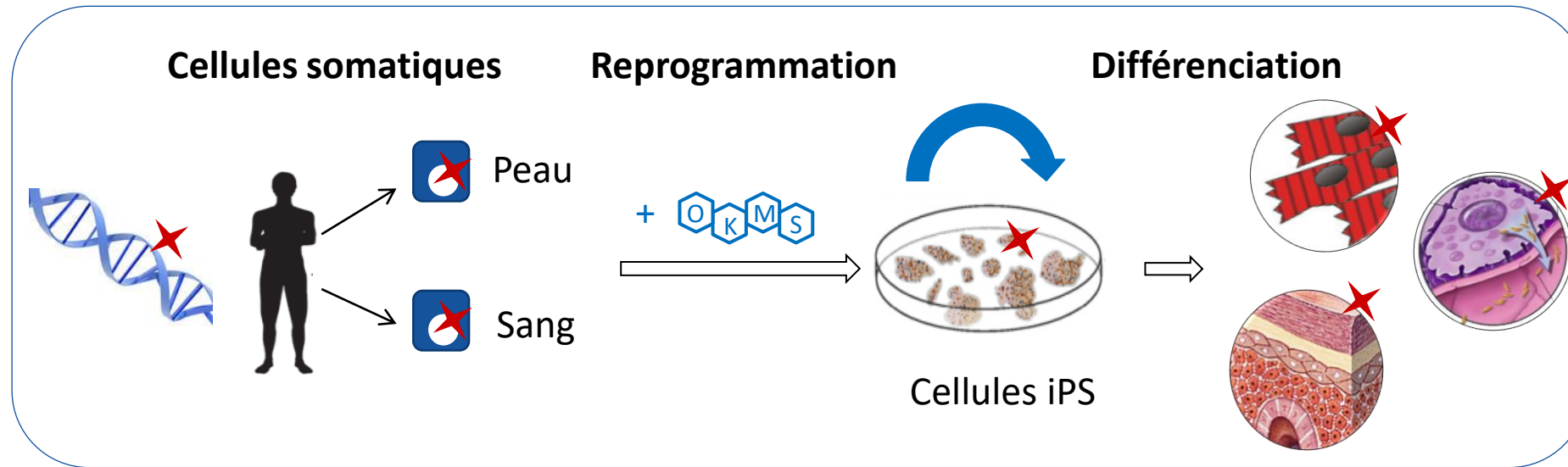
- ☐ Modèles d'étude classiques de pathologies cardiaques
- ☐ Cellules souches
- ☐ Technologie des cellules iPS

☐ Aspects technologiques

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

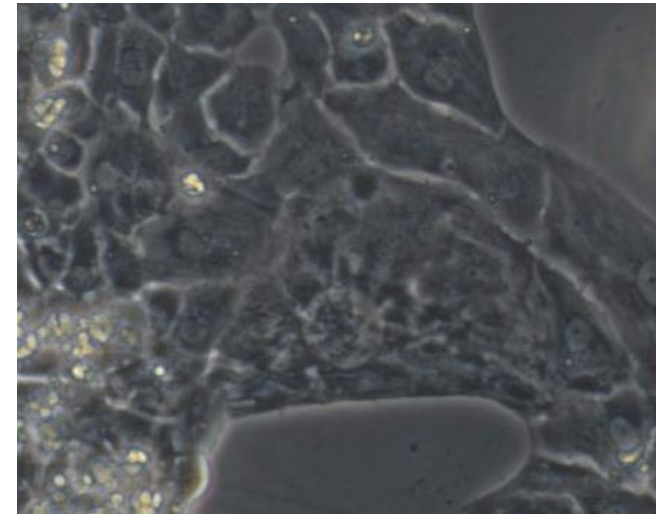
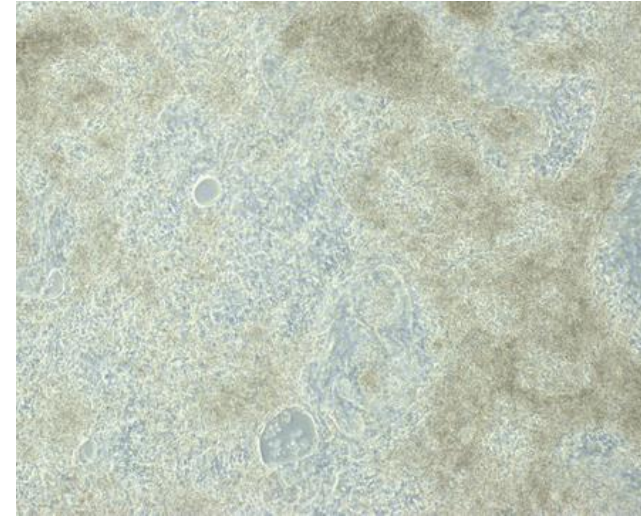
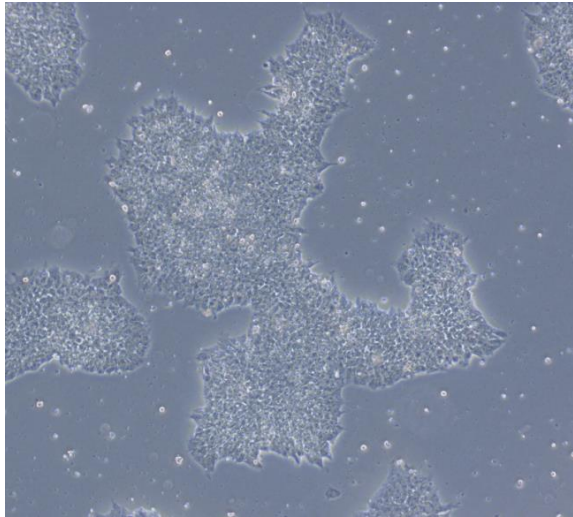
☐ Exemples de modélisation de pathologies du rythme cardiaque à l'aide d'iPS-CMs

Cardiomyocytes humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites

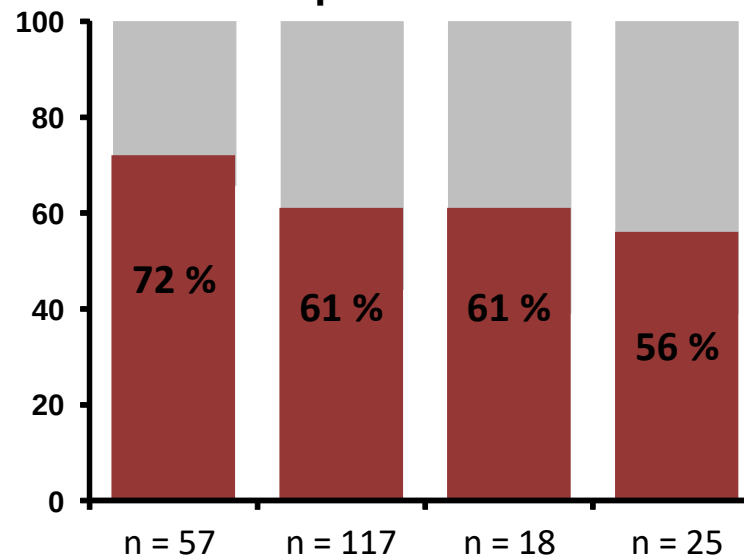


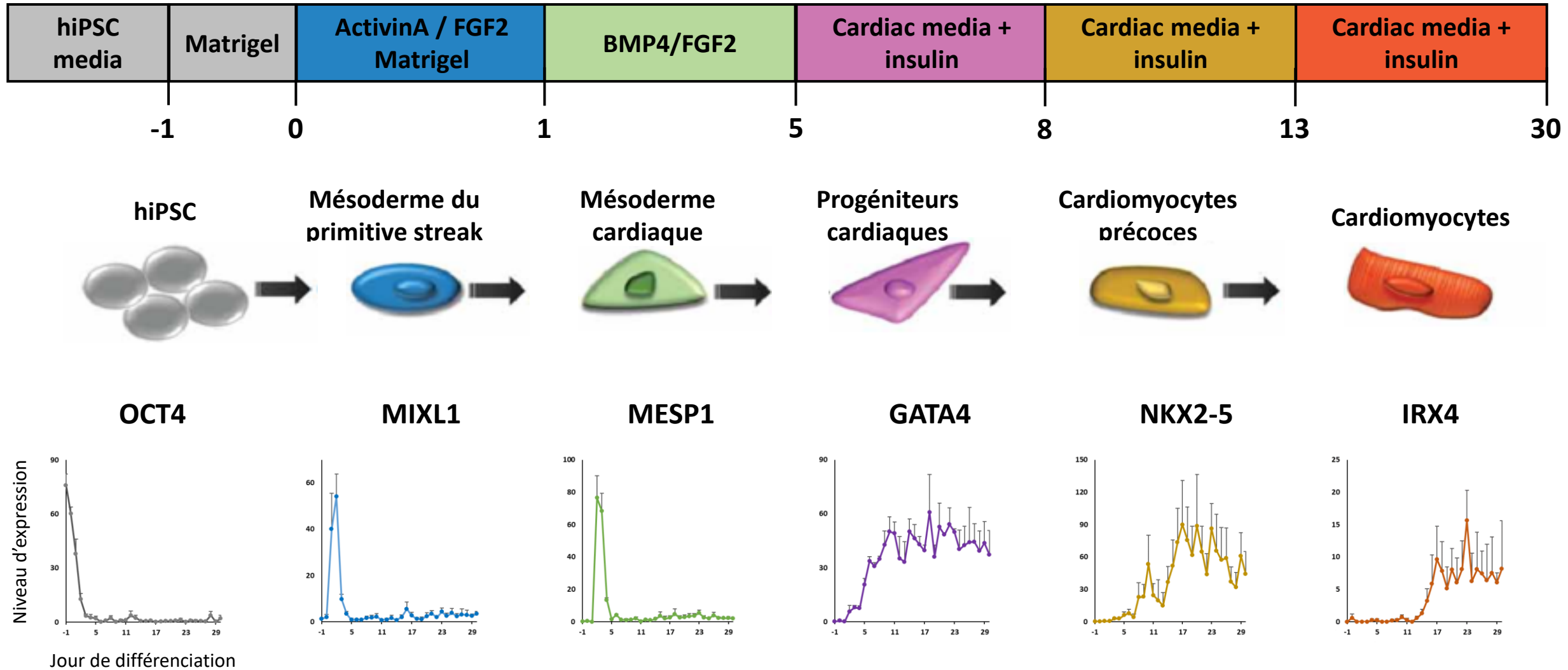
- Cardiomyocytes portent
 - le patrimoine génétique du patient
 - mutation / variant génétique rare
- Caractéristiques de la pathologie retrouvées dans les cardiomyocytes dérivés des cellules hiPS

Cardiomyocytes dérivés d'hiPSC en 2D

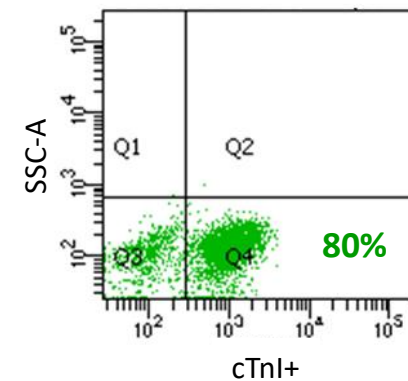
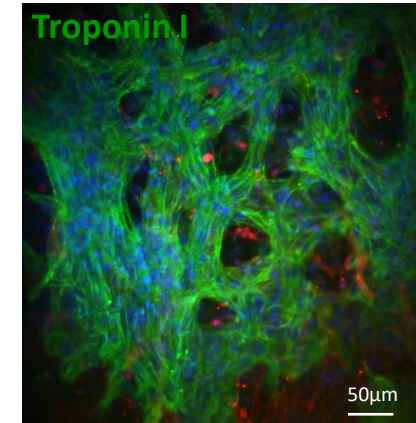
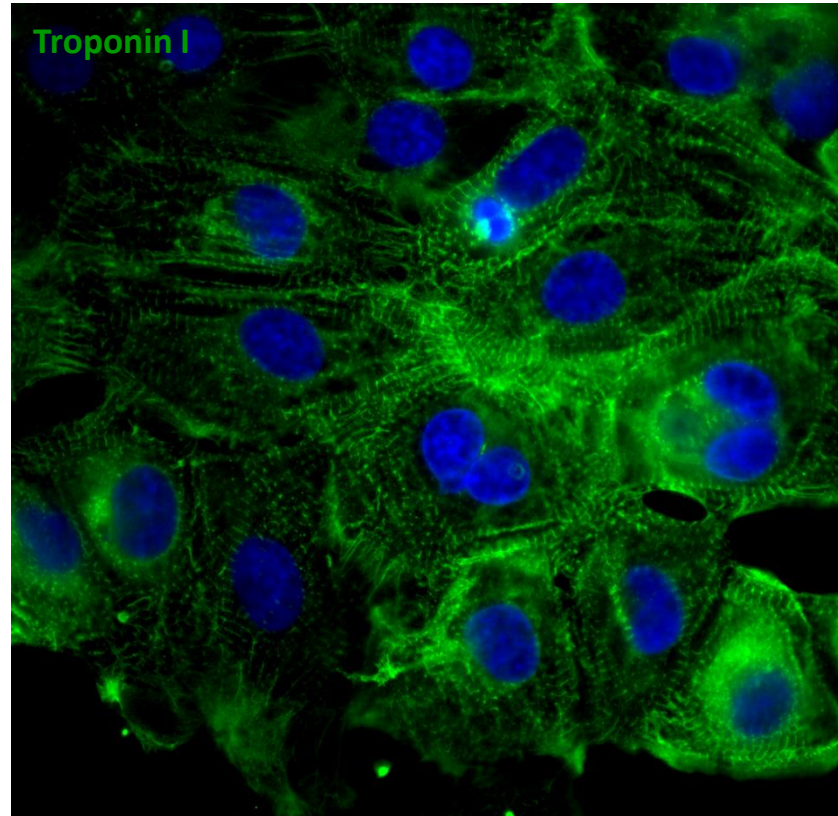
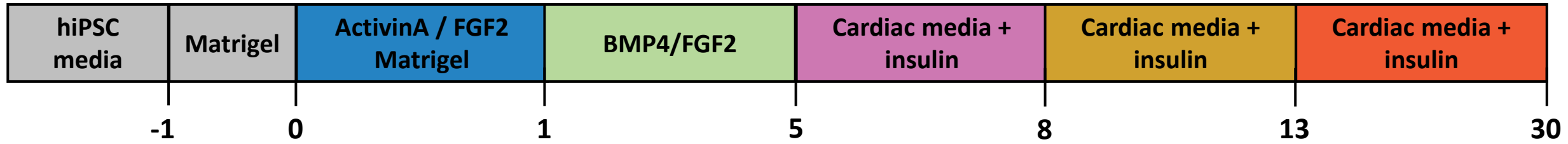


**Fonction contractile:
% puits battants**

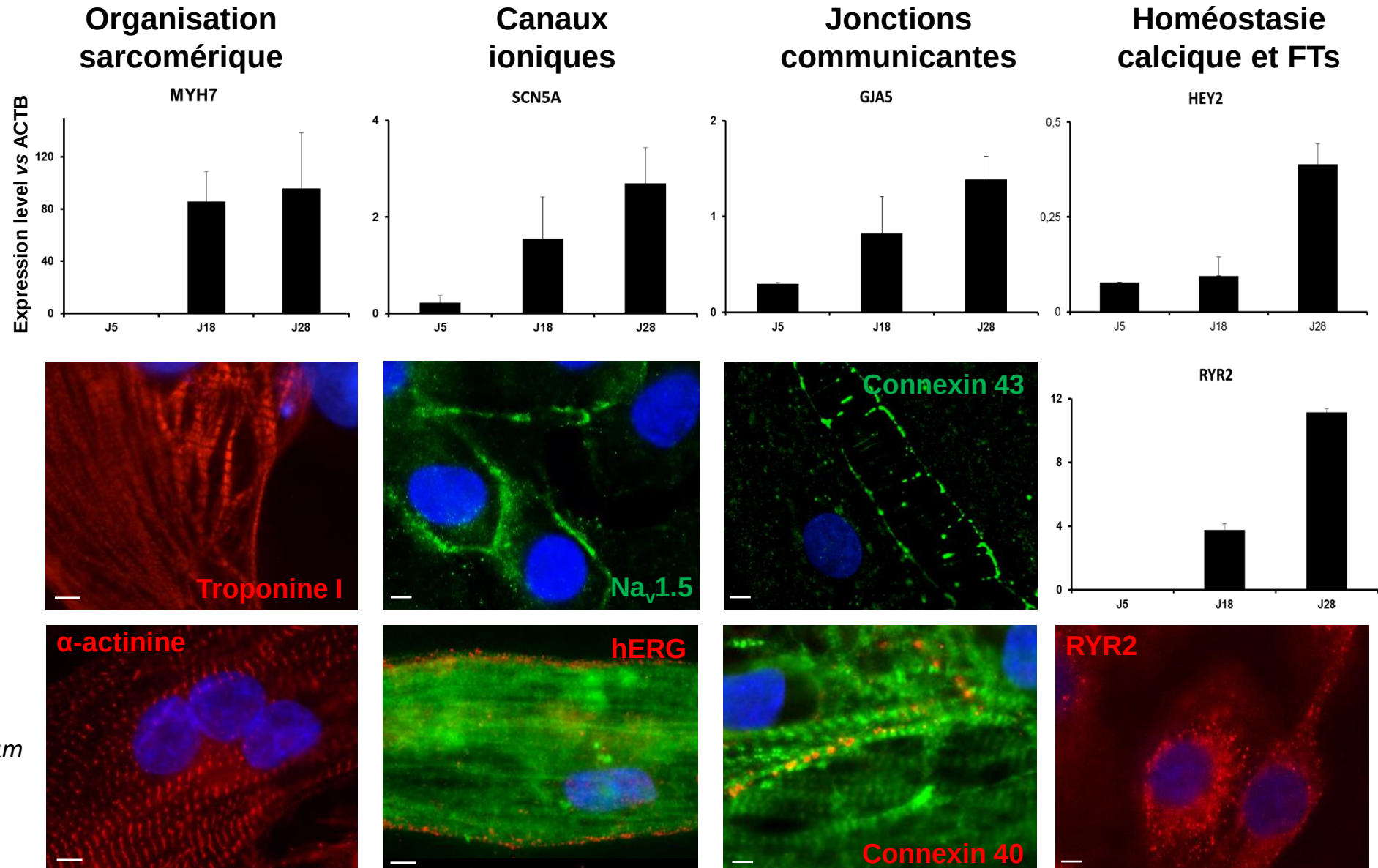




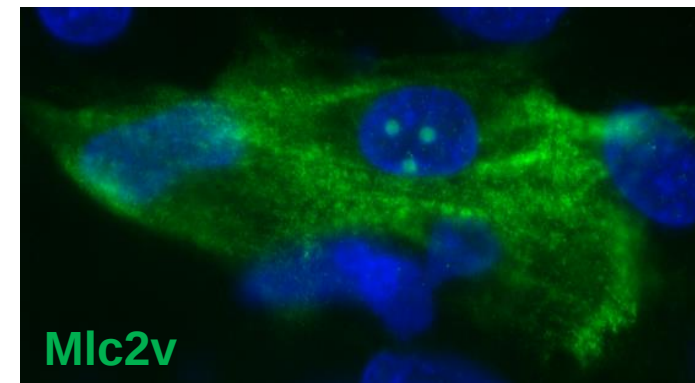
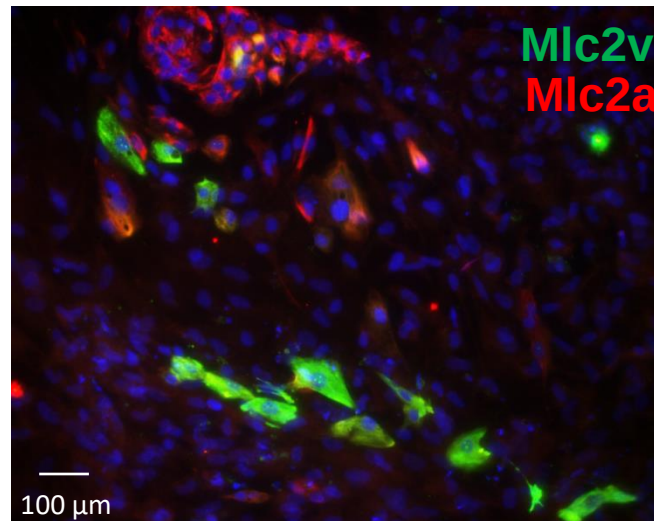
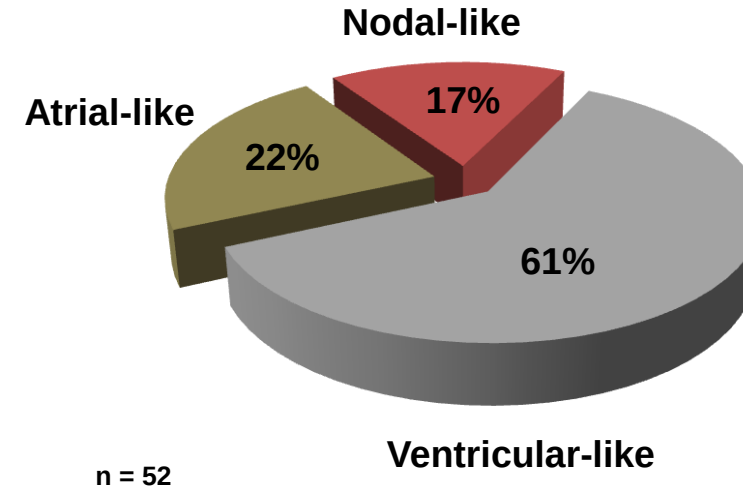
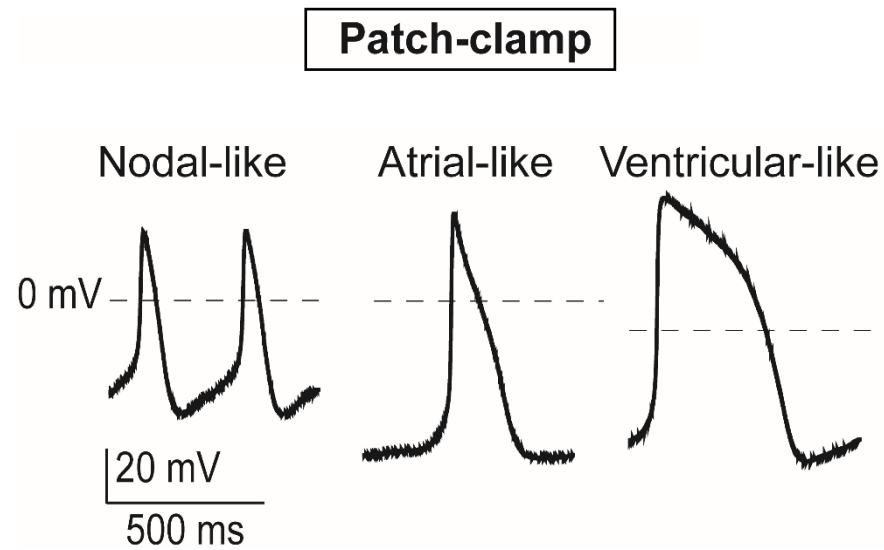
La différenciation des hiPSC reproduit les étapes attendues de la cardiogénèse



Différenciation cardiomyocytaire en 2D: caractérisation



Cardiomyocytes dérivés d'hiPSC - en 2D: hétérogénéité cellulaire



SingleCell
transcriptomics

10X
GENOMICS®
Single Cell
3' v3

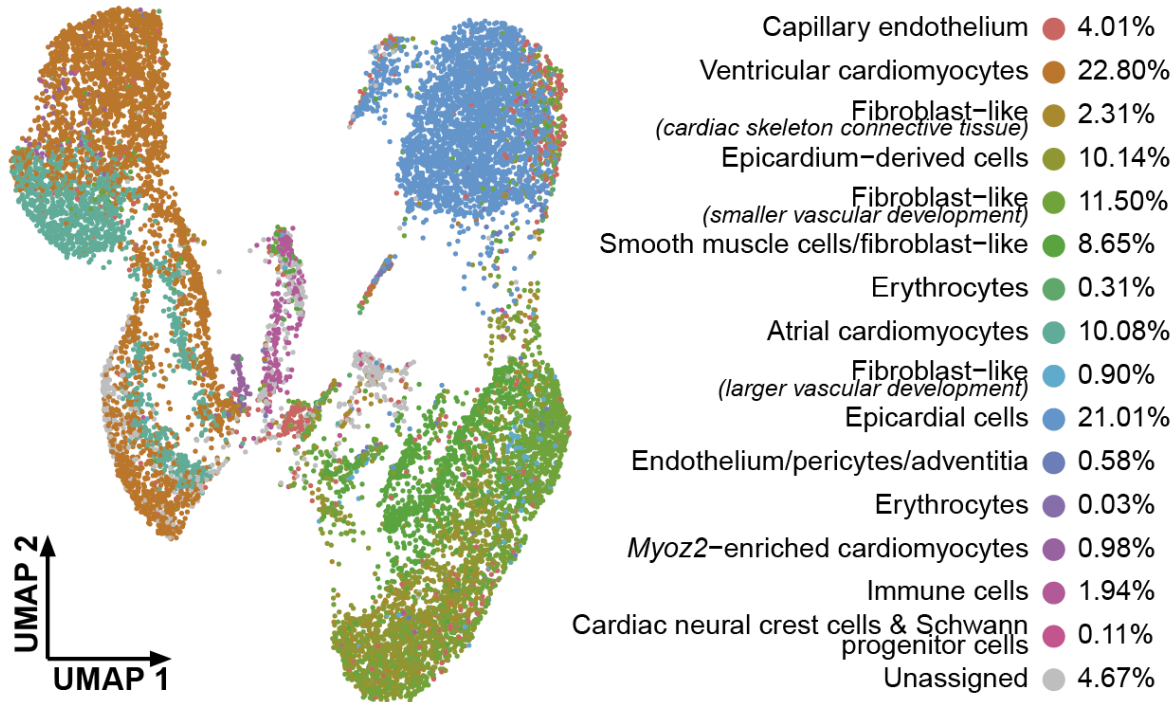
hiPSC-A (n=3)

●
J30

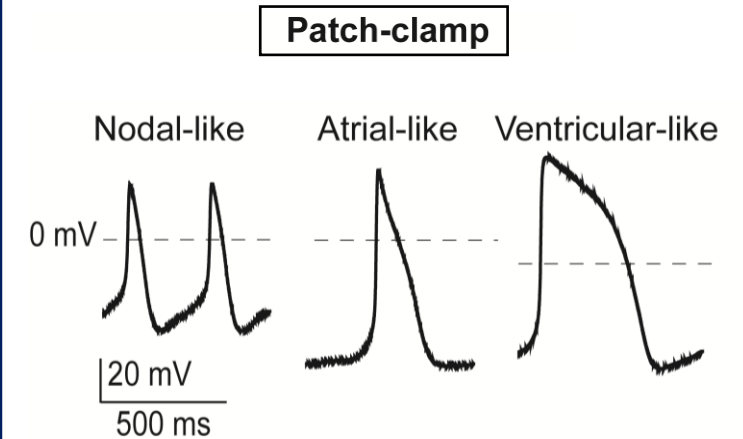
Cell type
annotation

- Tool: Cell-ID
- Data: Asp *et al.*, 2019, Cell

Cell type-diversity



Electrical diversity

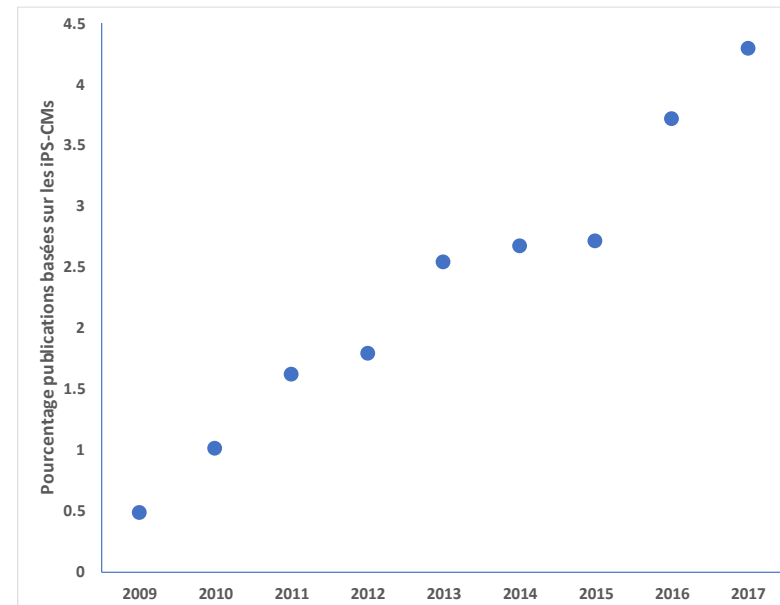
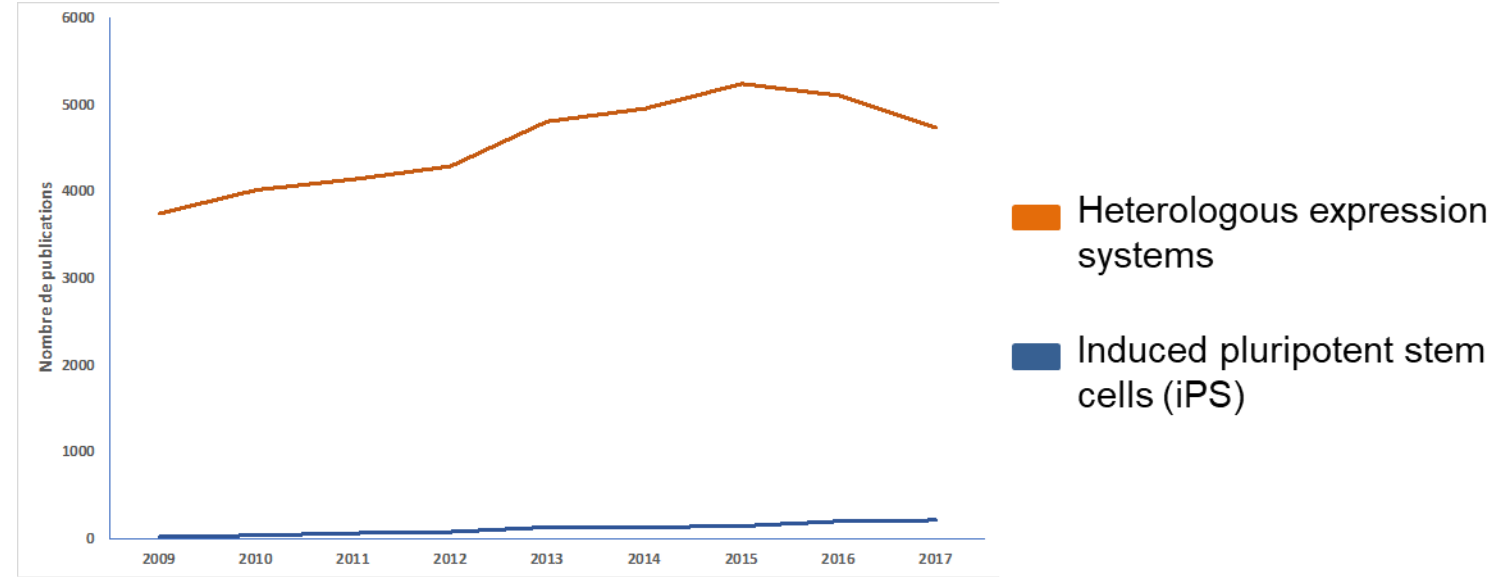


2D hiPSC cardiac differentiation generates cell diversity typical of the human heart

Cardiomyocytes dérivés d'hiPSC - en 2D: hétérogénéité cellulaire

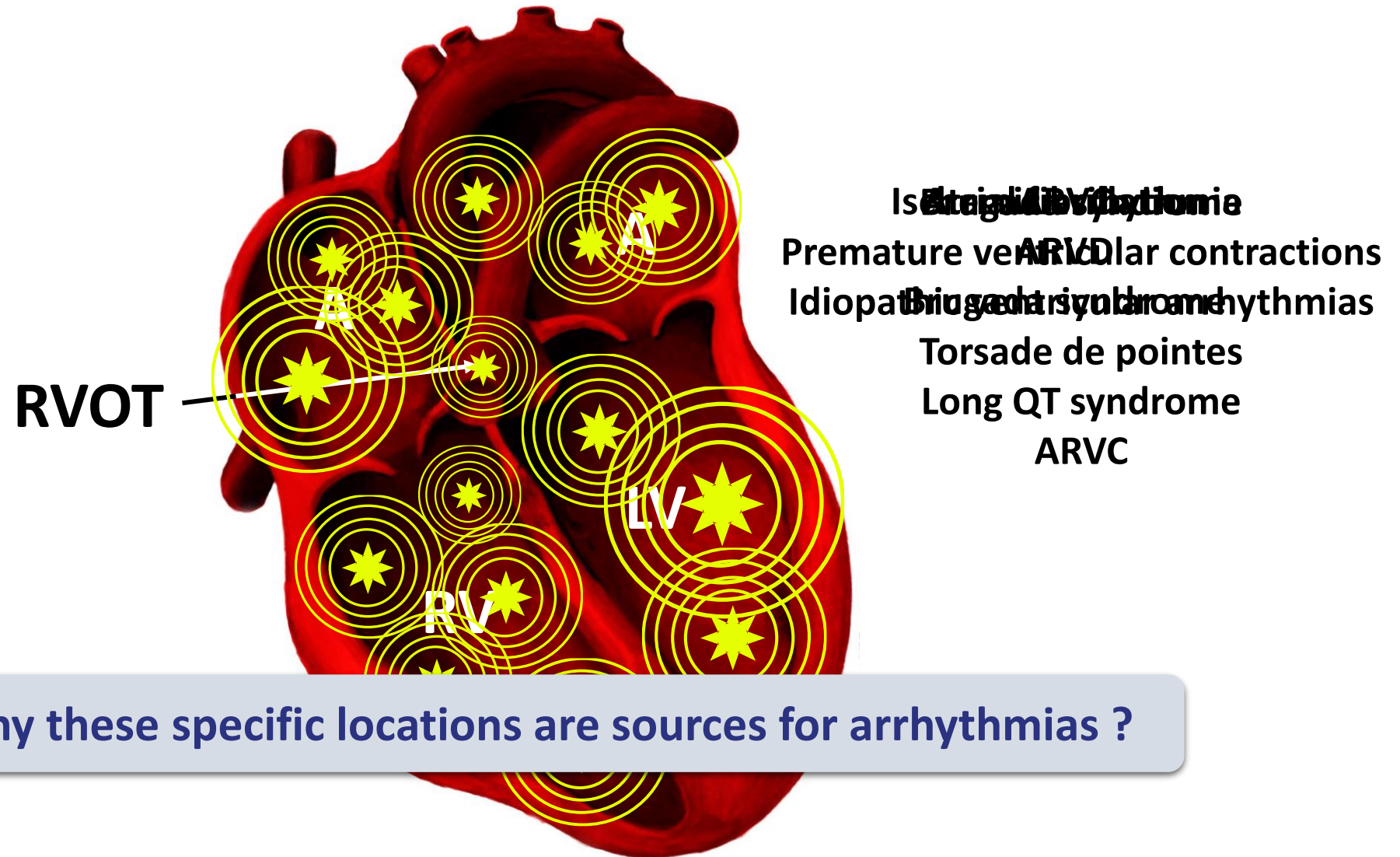


Yamanaka S.
2007



En 2017
5% des articles
utilisent des iPS

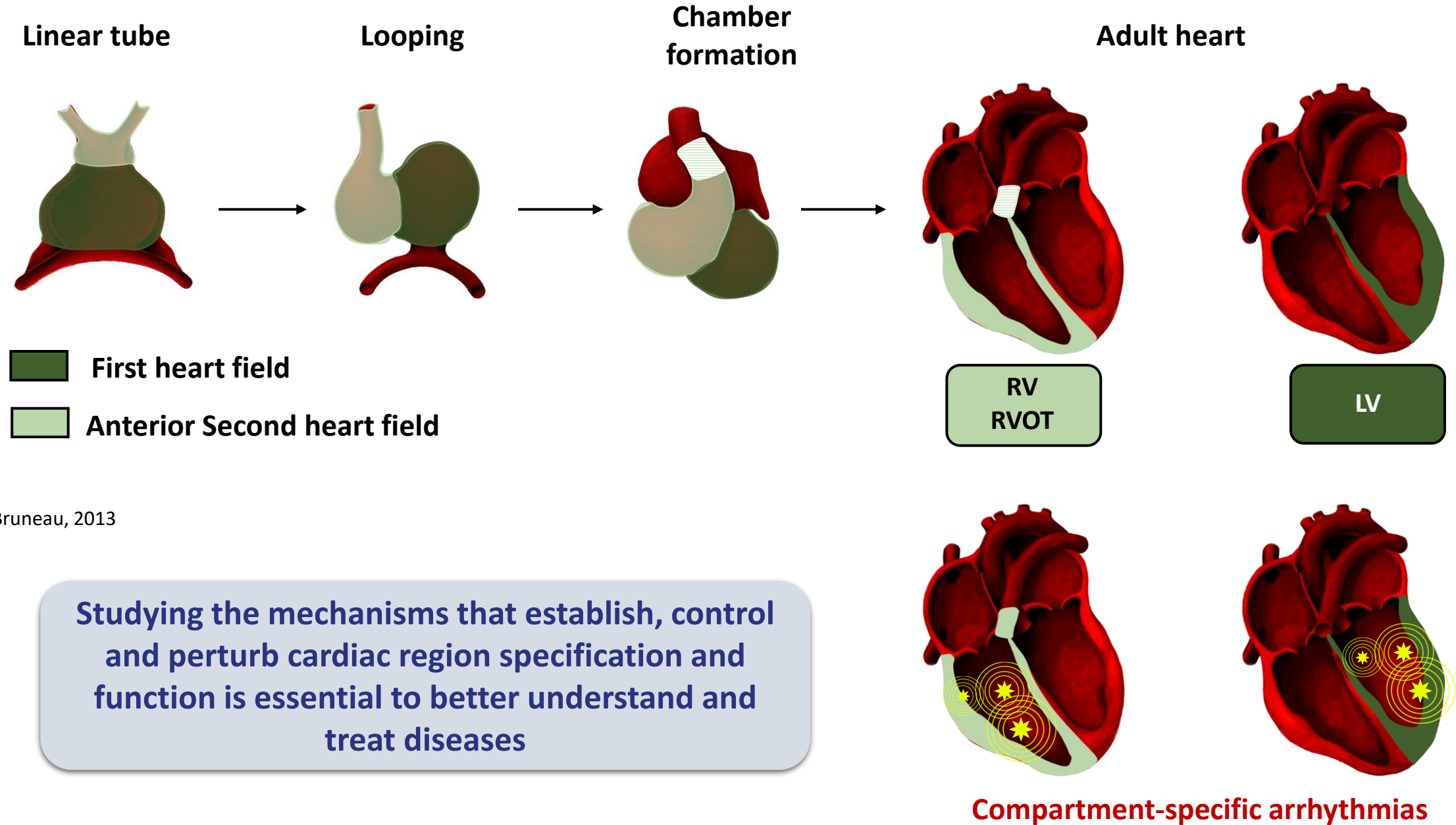
Pour aller plus loin: Cardiac arrhythmias are region-specific



Why these specific locations are sources for arrhythmias ?

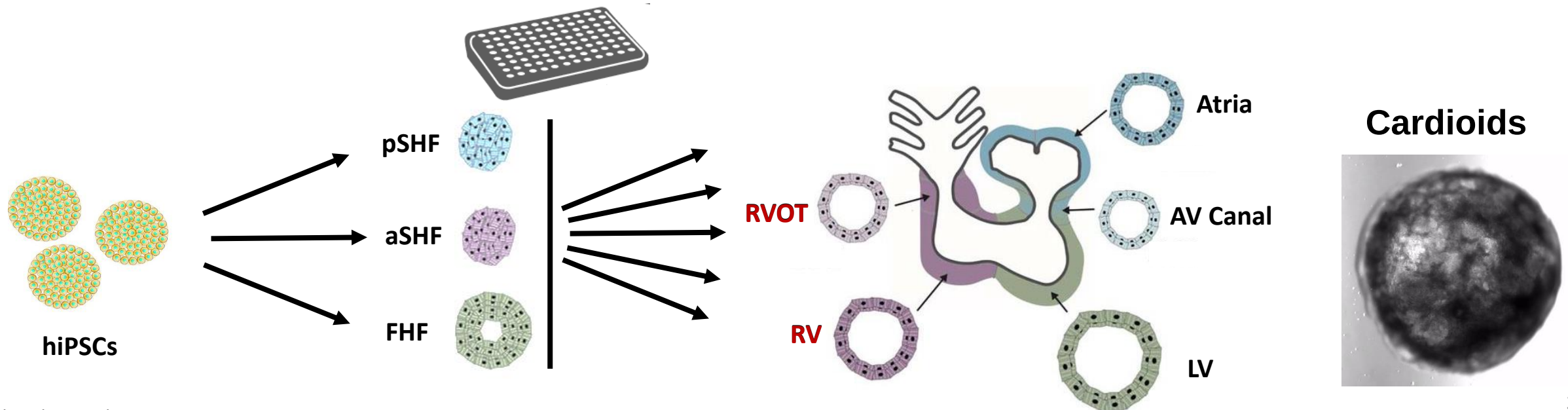
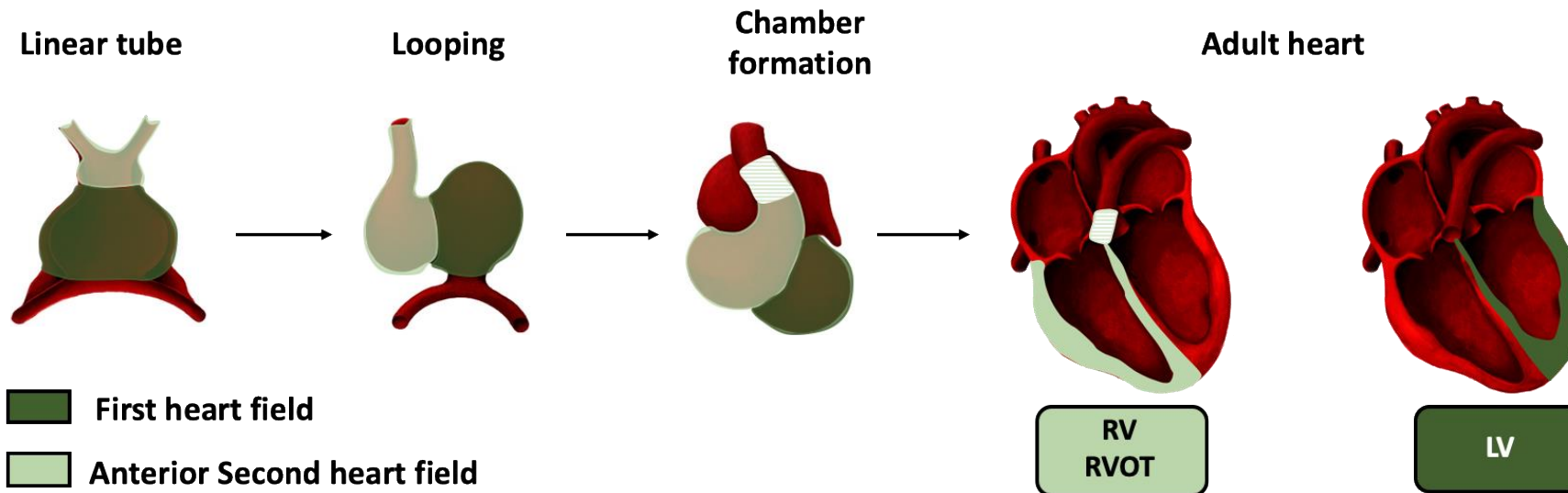
Hypothesis: linked to the fact that they each arise from a particular developmental process.

Cardiac-region specification: temporally established during development

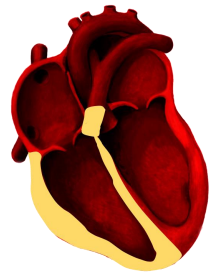
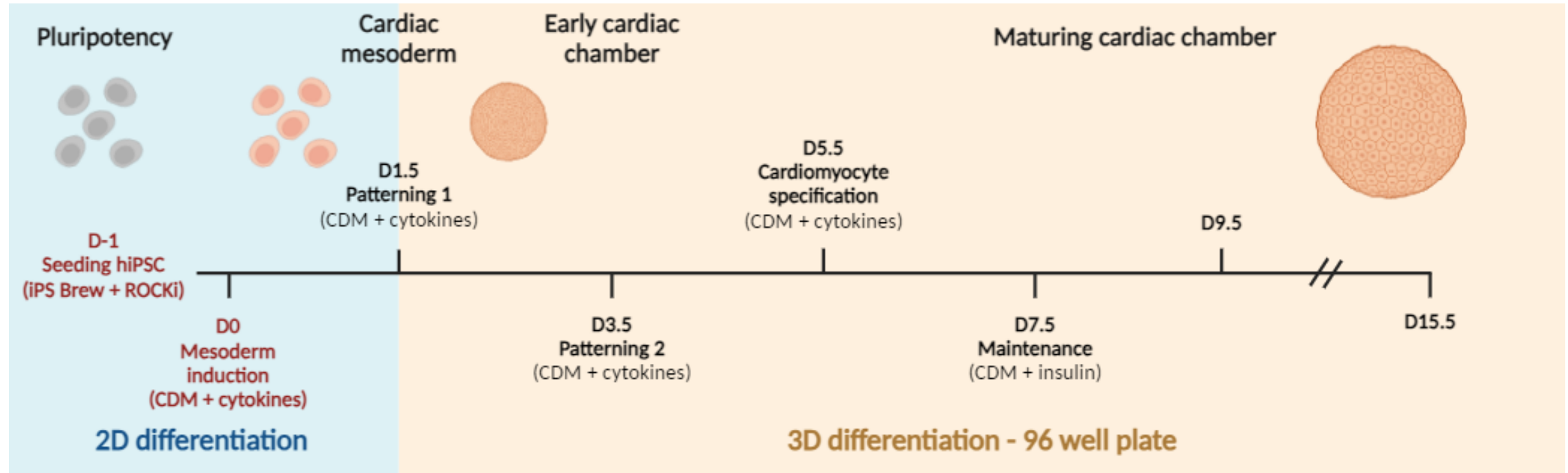


Adapted from Bruneau, 2013

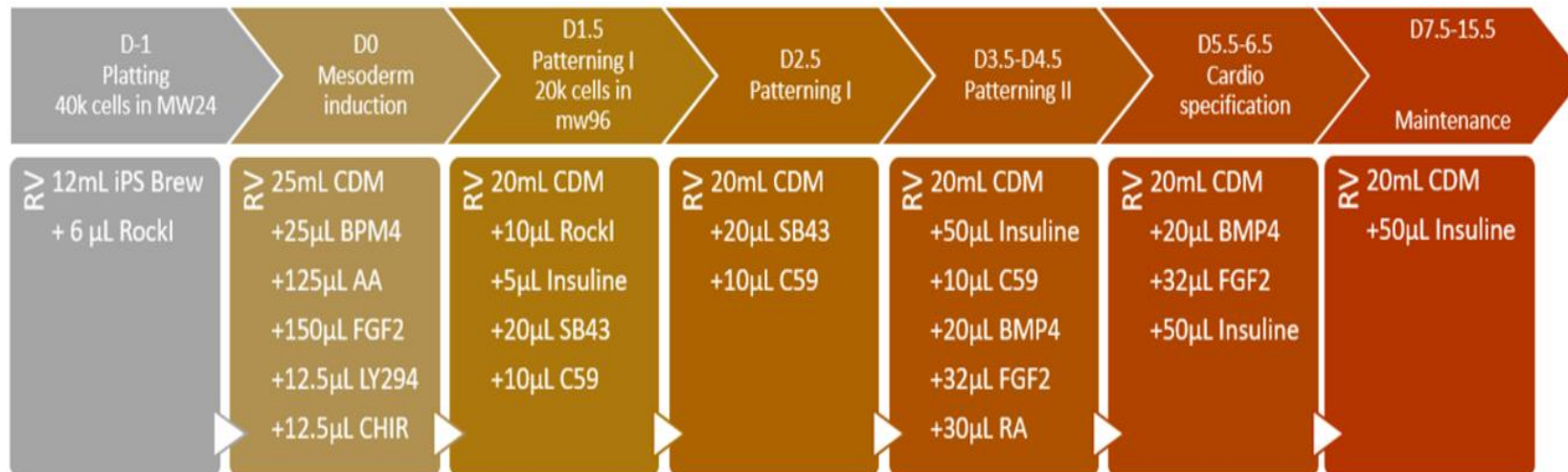
New hiPSC model of each cardiac-region specification in 3D



3D hiPSC-organoids: quick overview of the protocol



RV protocol



☐ Introduction générale

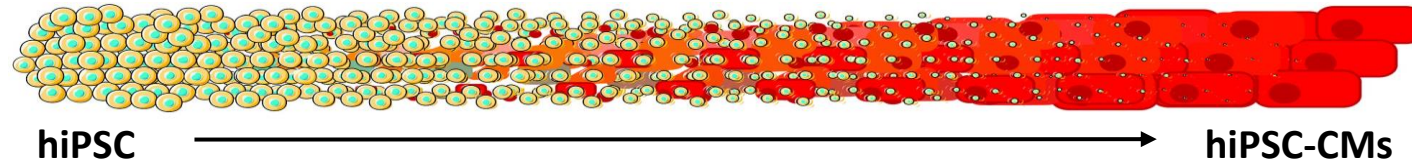
- ☐ Modèles d'étude classiques de pathologies cardiaques
- ☐ Cellules souches
- ☐ Technologie des cellules iPS

☐ Aspects technologiques

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

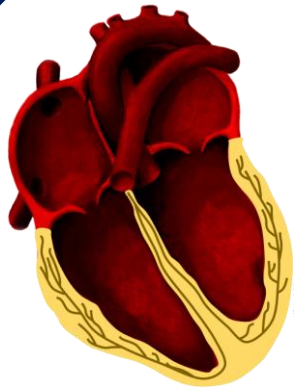
☐ Exemples de modélisation de pathologies du rythme cardiaque à l'aide d'iPS-CMs

Successive modeling approaches using hiPSC-CMs

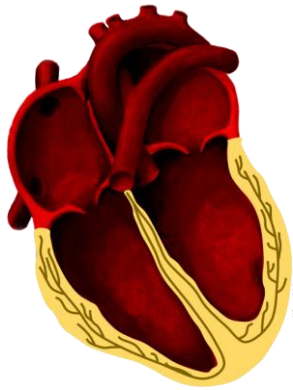


2D modelings

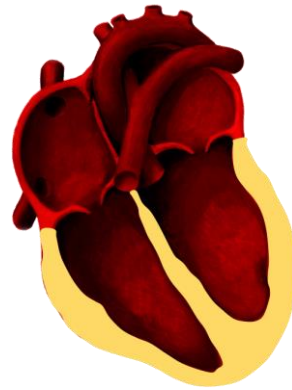
Arrhythmic diseases modeling



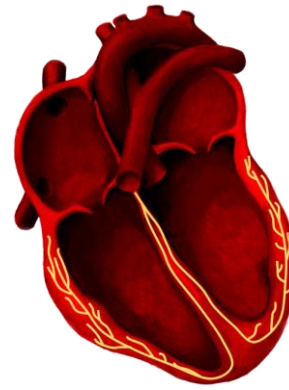
**LQT2
syndrome**



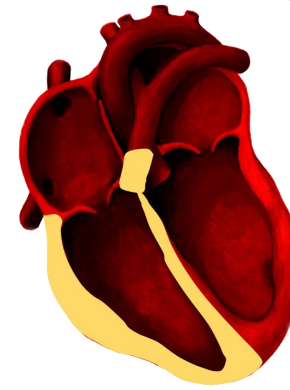
**Catecholamine-
induced
LQT**



CPVT



**Hamamy
Syndrome**



**Brugada
syndrome**



Jouni et al., *J Am Heart Assoc.* 2016

Es-Salah et al.,
JMCC. 2016

Cimarosti et al.,
Stem Cell Res. 2022

Etienne et al.,
Europace. 2018

De Waard et al.,
in preparation

Cimarosti et al.,
Stem Cell Res.
2022

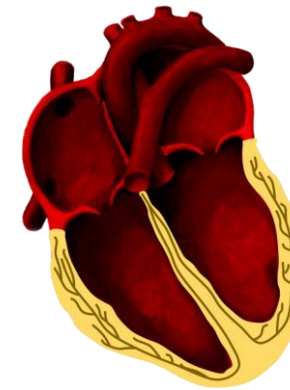
Al Sayed et al.,
Card Res. 2021

Canac et al., *Stem
Cell Res.* 2022

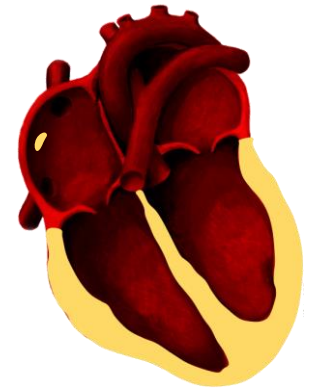
Al Sayed et al., *Clin
Transl Med.* 2021

Belbachir et al.,
Eur Heart J. 2019

Molecule testing



**BeKm-1 on
ventricular
relaxation**



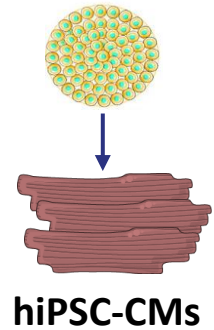
**Maurocalcin on
ventricular and
nodal Ca⁺⁺
homeostasis**



De Waard et al.,
Int J Mol Sci.
2020

De Waard et al.,
Biochem J. 2020

Approches successives d'étude de l'activité électrique



Niveau de complexité

Pathologie monogénique – phénotype restreint

Syndrome du QT Long

Mutation : Canal ionique



Jouni M,*, (...), Gaborit N, *J Am Heart Assoc.* 2015
Lamoureux Z, (...), Gaborit N, *J Mol Cell Cardiol.* 2016

Pathologie monogénique – phénotype complexe

Syndrome d'Hamamy

Mutation : Facteur de transcription

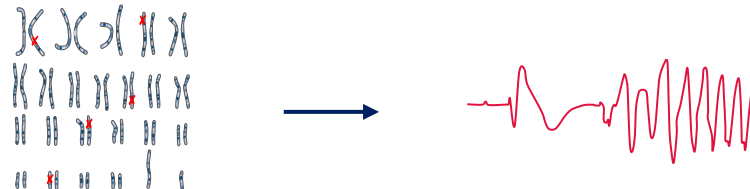


Al Sayed ZR,*, (...), Gaborit N, *Cardiovasc Res.* 2021

Pathologie oligogénique

Syndrome de Brugada

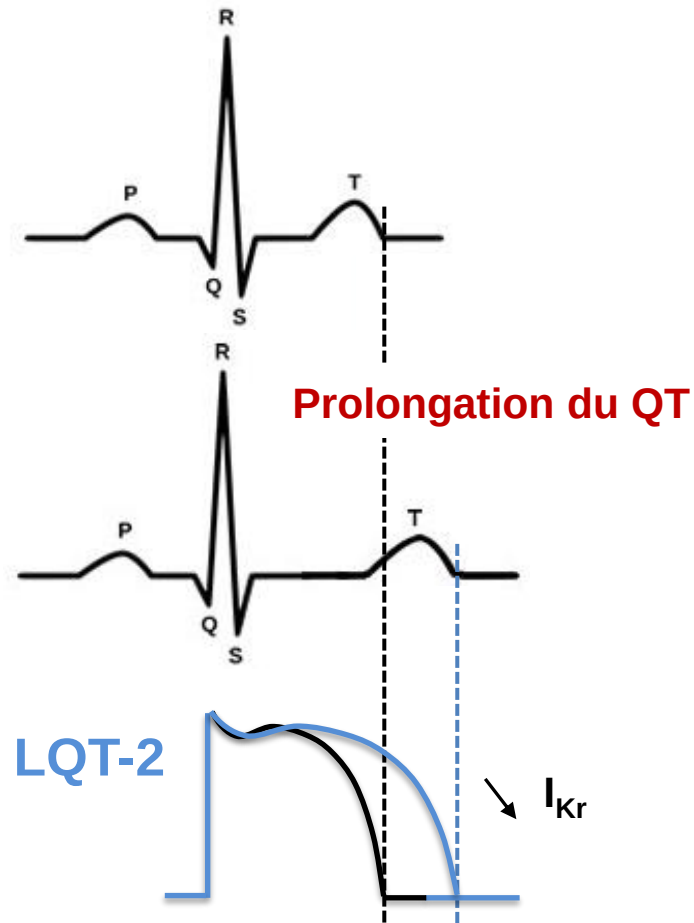
Mutation : variable ou non identifiée



Al Sayed ZR,*, (...), Gaborit N, *Clin Trans Med.* 2021

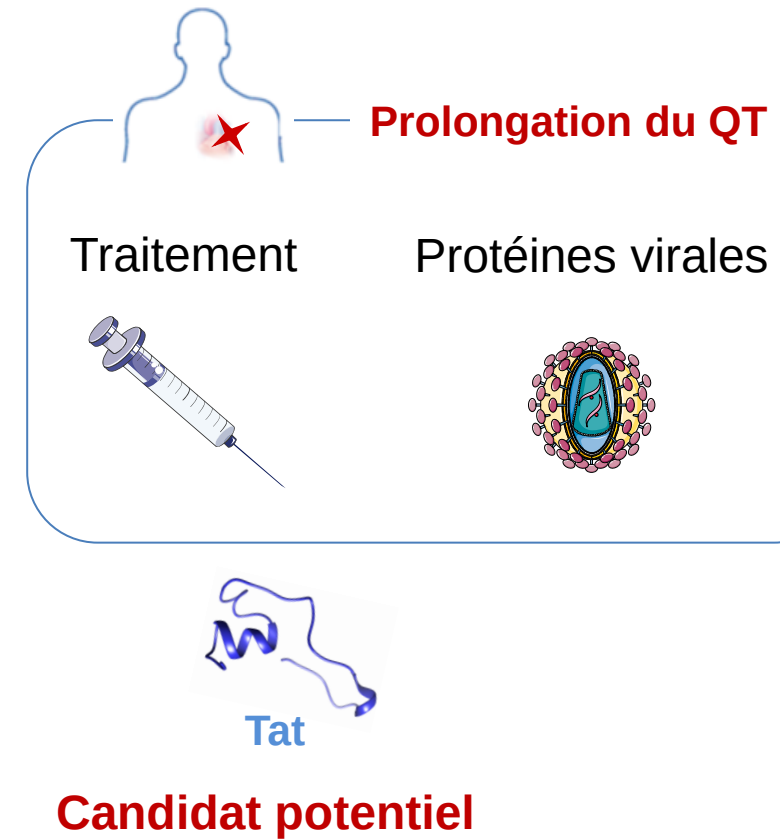
Syndrome du QT long congenital

Syndrome arythmique ventriculaire



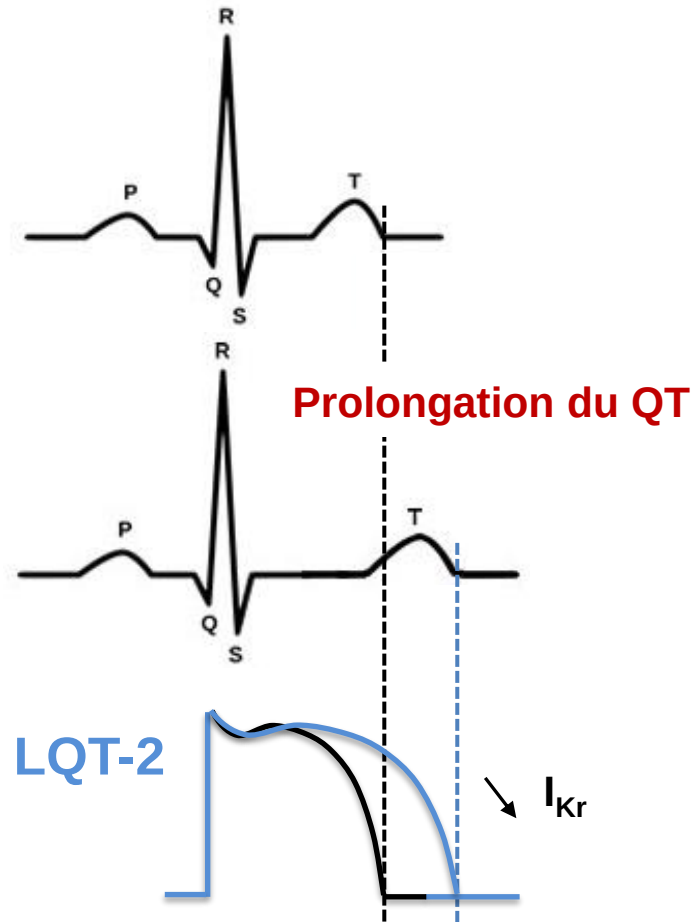
Syndrome du QT long acquis

Taux élevé d'évènements cardiovasculaires chez les patients HIV



Syndrome du QT long congénital

Syndrome arythmique ventriculaire

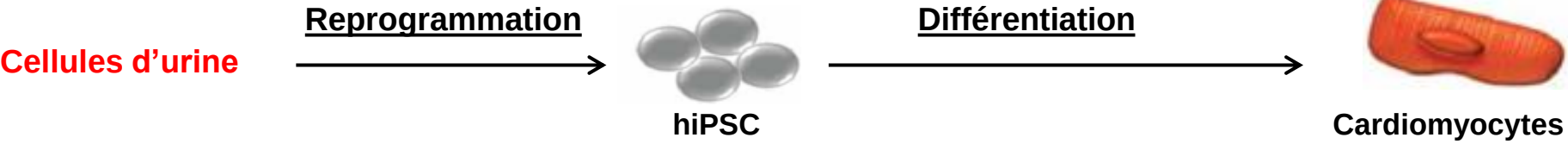


Toward Personalized Medicine: Using Cardiomyocytes Differentiated From Urine-Derived Pluripotent Stem Cells to Recapitulate Electrophysiological Characteristics of Type 2 Long QT Syndrome

Mariam Jouni, MSc; * Karim Si-Tayeb, PhD; * Zeineb Es-Salah-Lamoureux, PhD; Xenia Latypova, MSc; Benoit Champon, BSc; Amandine Caillaud, PhD; Anais Runcoat, 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

Objectif



Jouni M et al., JAHA, 2015

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

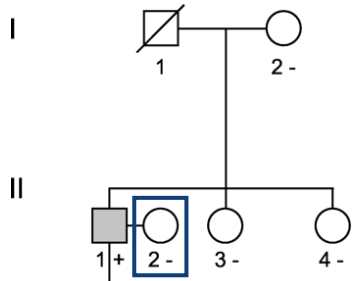
Chloé Bellocq, Ronald Wilders, Jean-Jacques Schott, Bénédicte Louérat-Oriou, Pierre Boisseau, Hervé Le Marec, Denis Escande, and Isabelle Baro

Mol Pharmacol 66:1093–1102, 2004

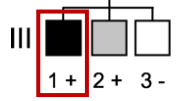
hERG A561P mutation



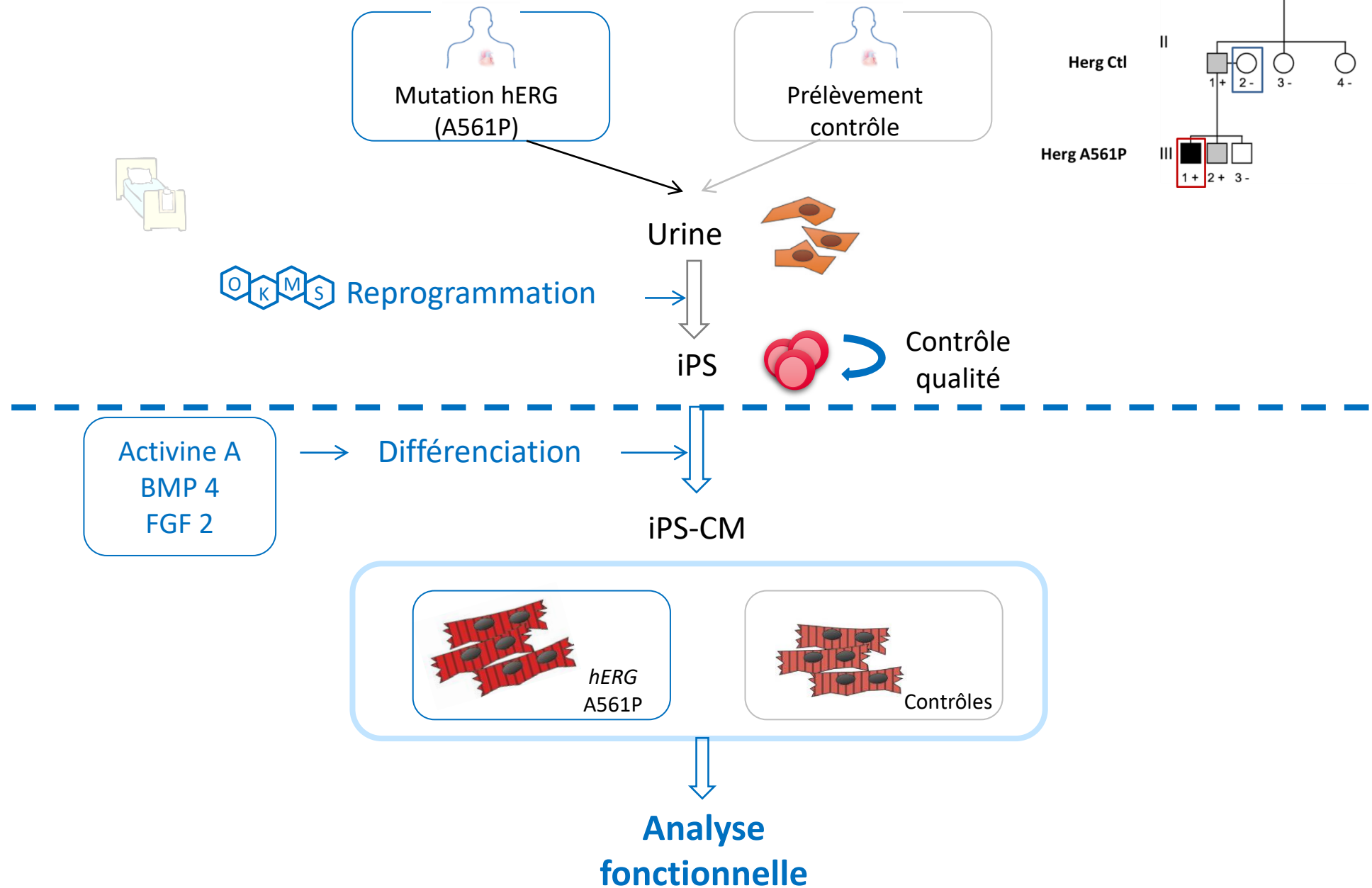
Herg Ctl



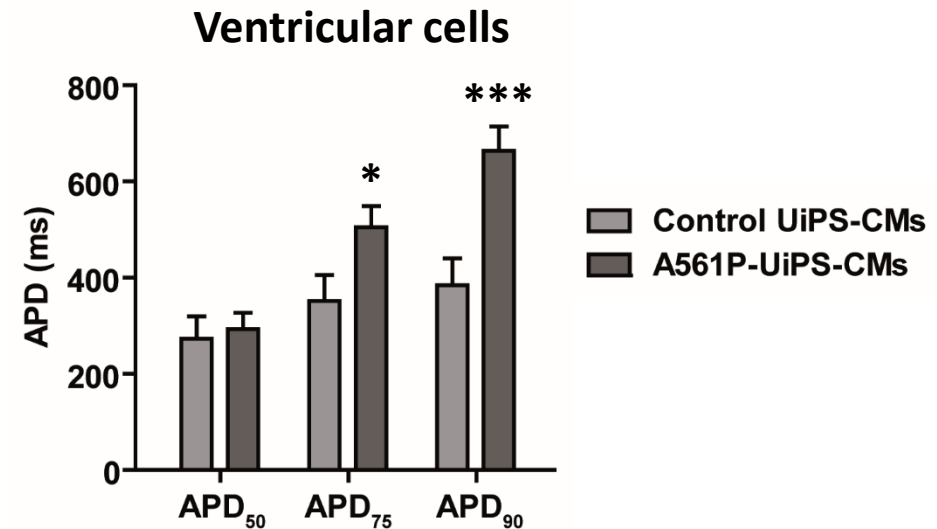
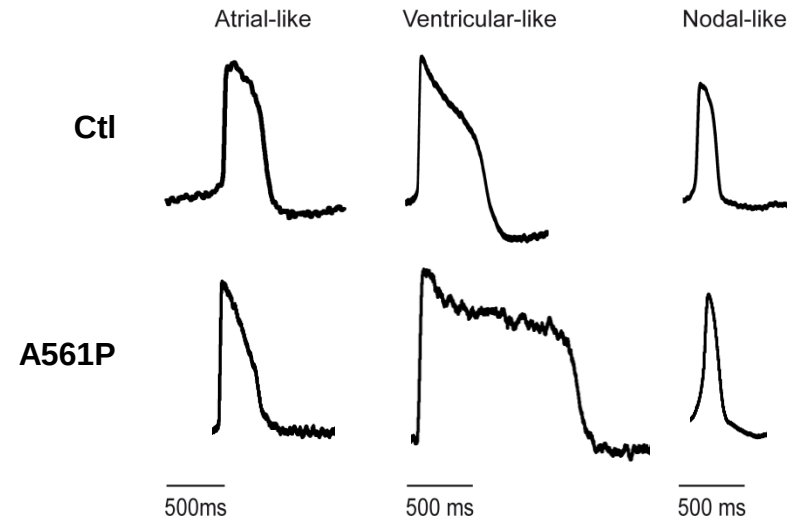
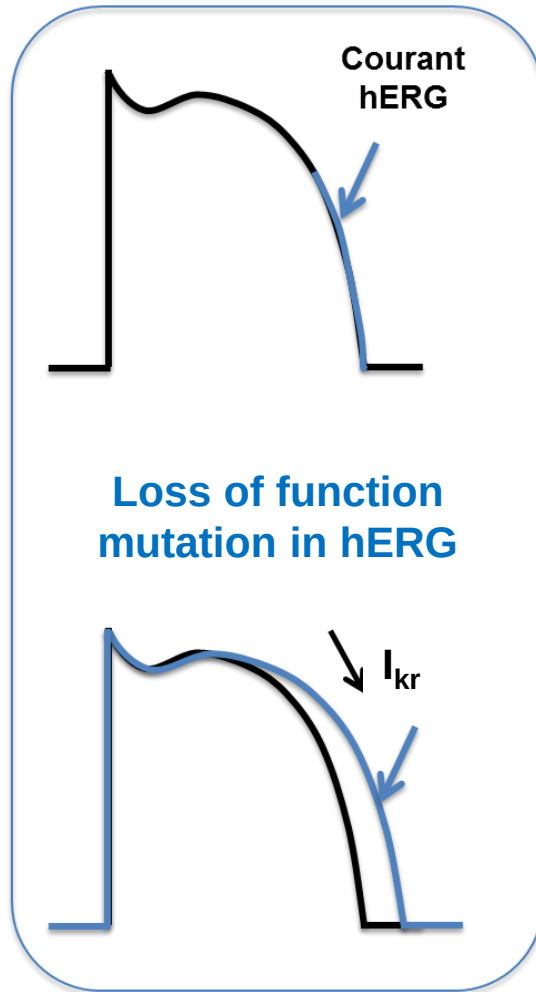
Herg A561P



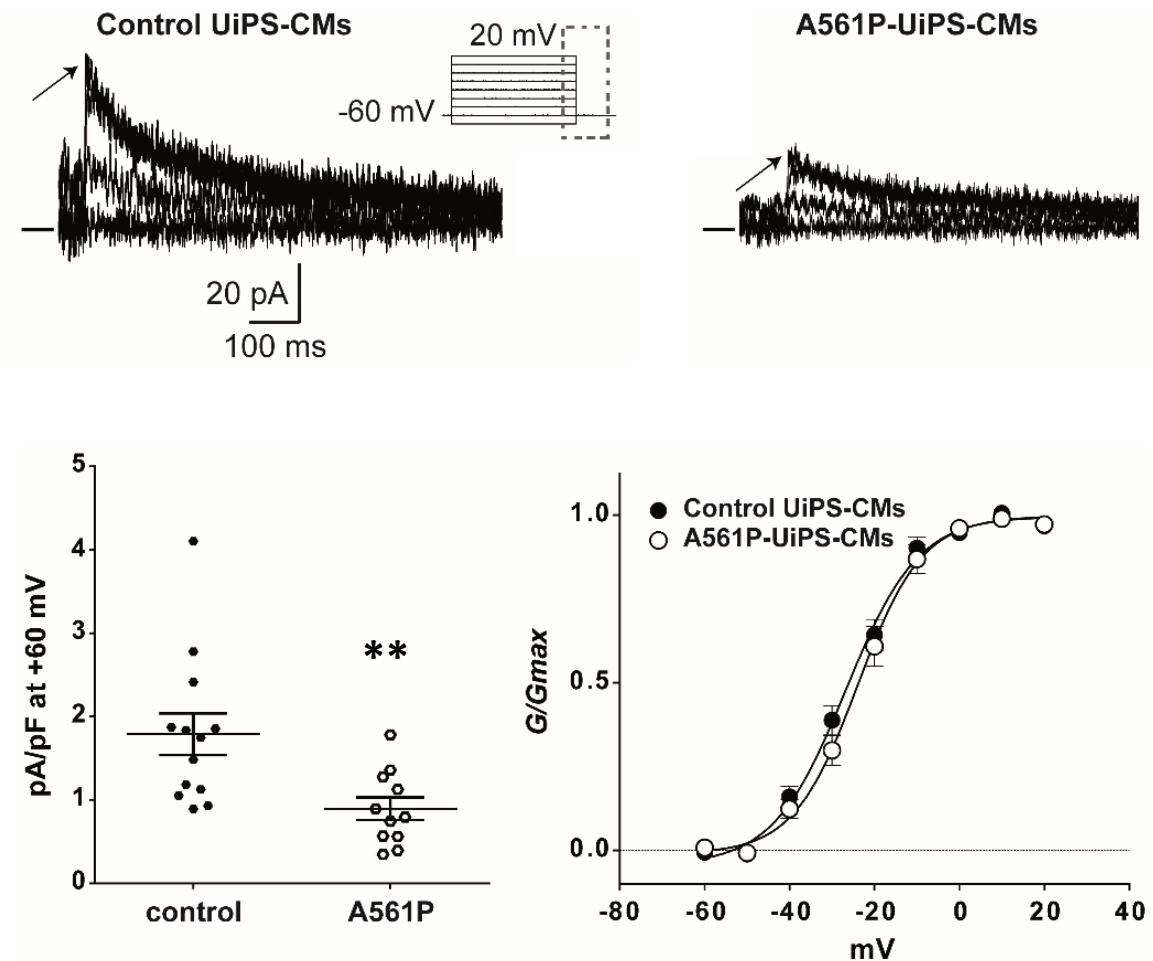
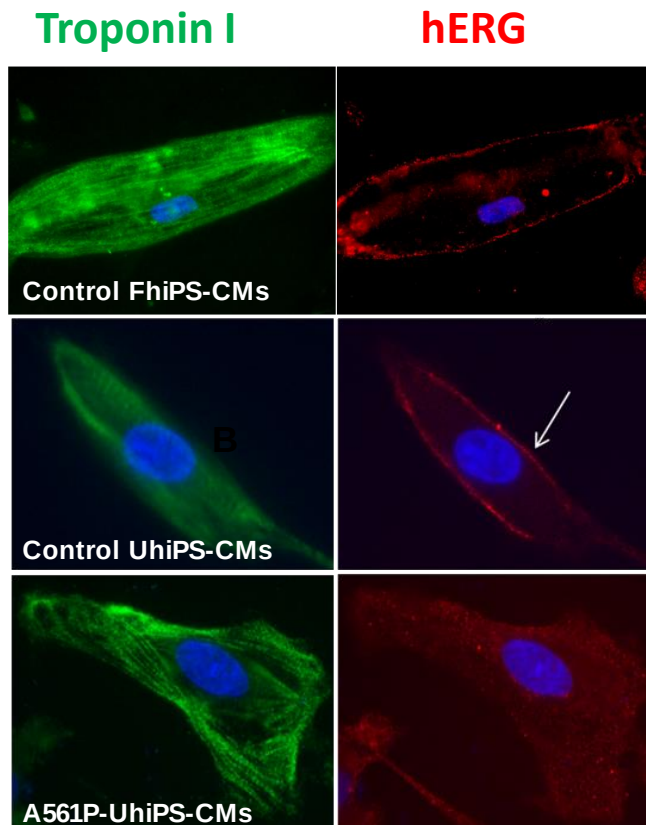
Méthodologie



Les potentiels d'action d'UhiPS-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

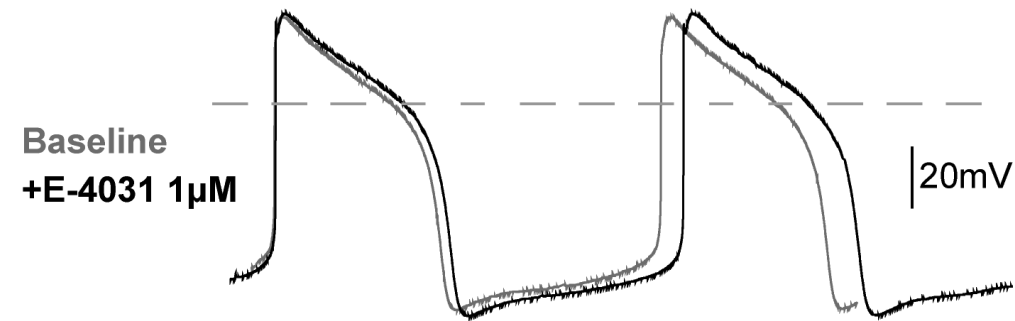


◀ May-30-97
597 ms
(628 ms) | 1 mV
400 ms

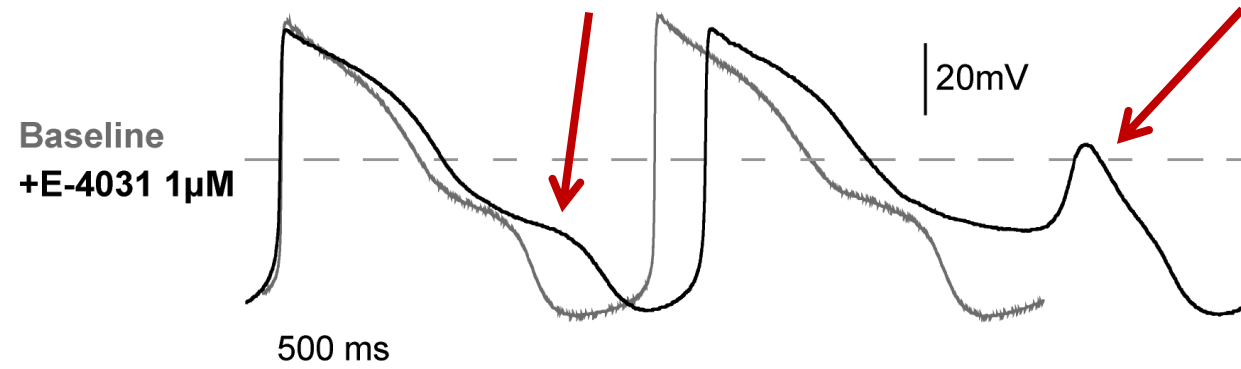
▼ Feb-05-99 – clobutinol



Control UhiPS-CM

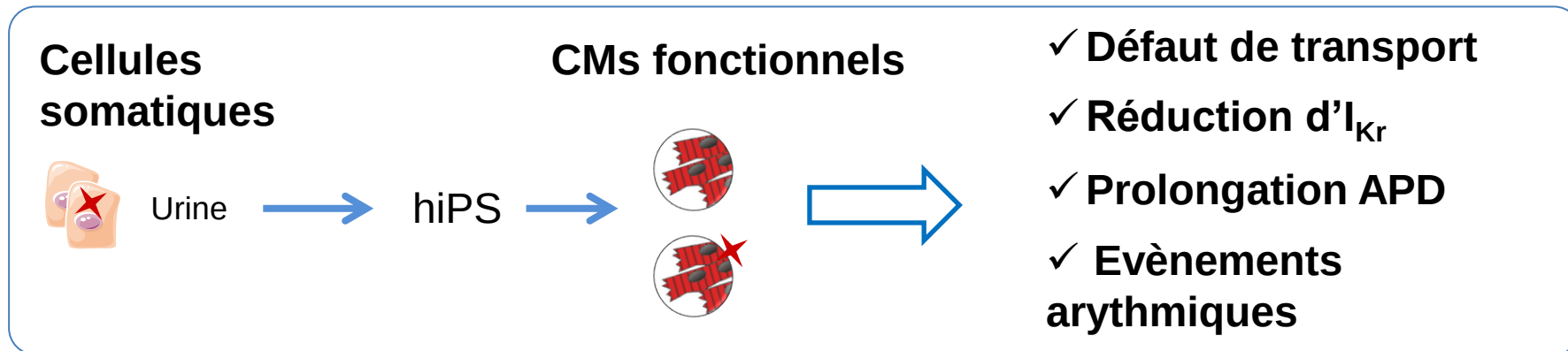


A561P-UhiPS-CM



Conclusions: modélisation du syndrome du QT long congénital

Les hiPSC-CMs dérivés d'urine modélisent la susceptibilité aux arythmies du LQT2



Jouni M et al., *JAHA*, 2015

Opportunités

Approche puissante permettant de réaliser des études fonctionnelles patient-spécifiques



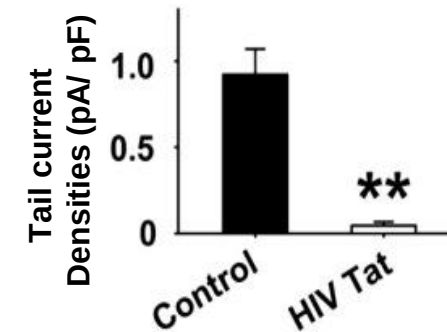
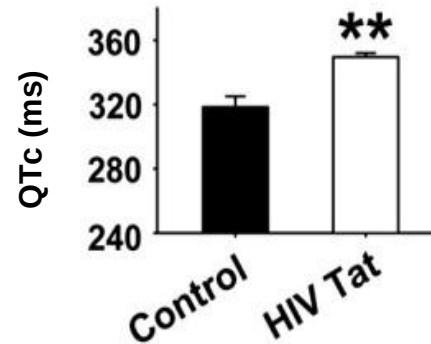
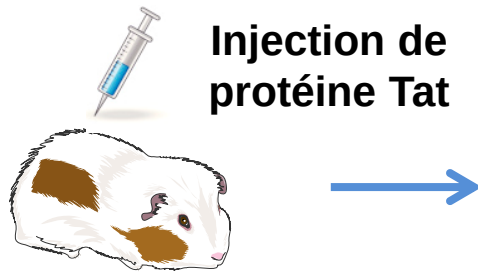
Compréhension des mécanismes sous-jacents



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

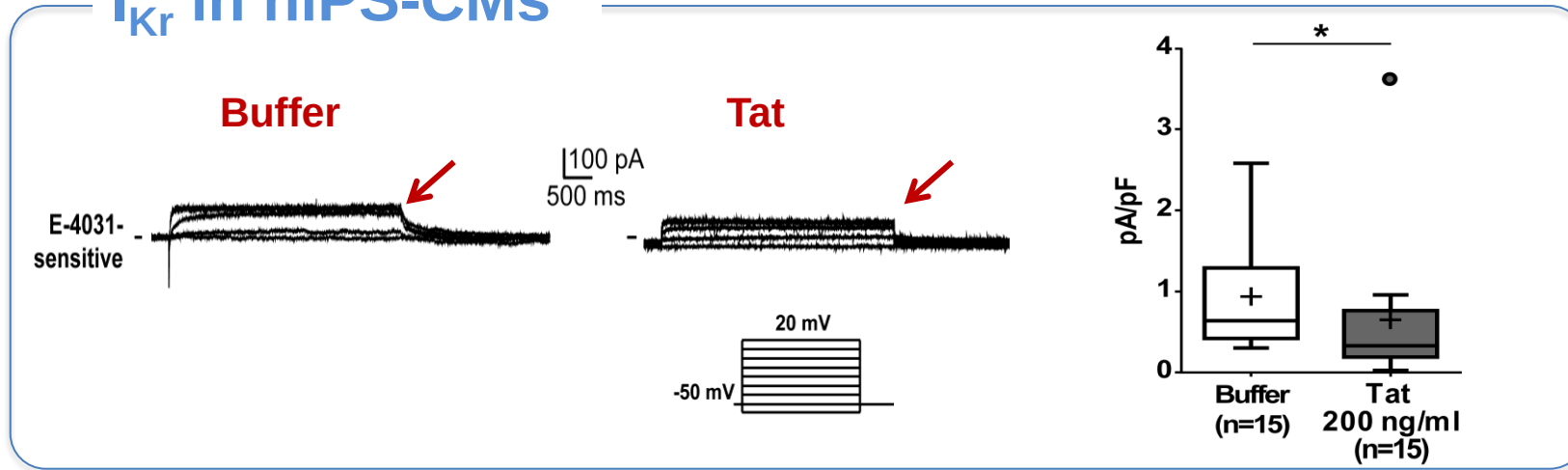


Bai et al., 2011

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

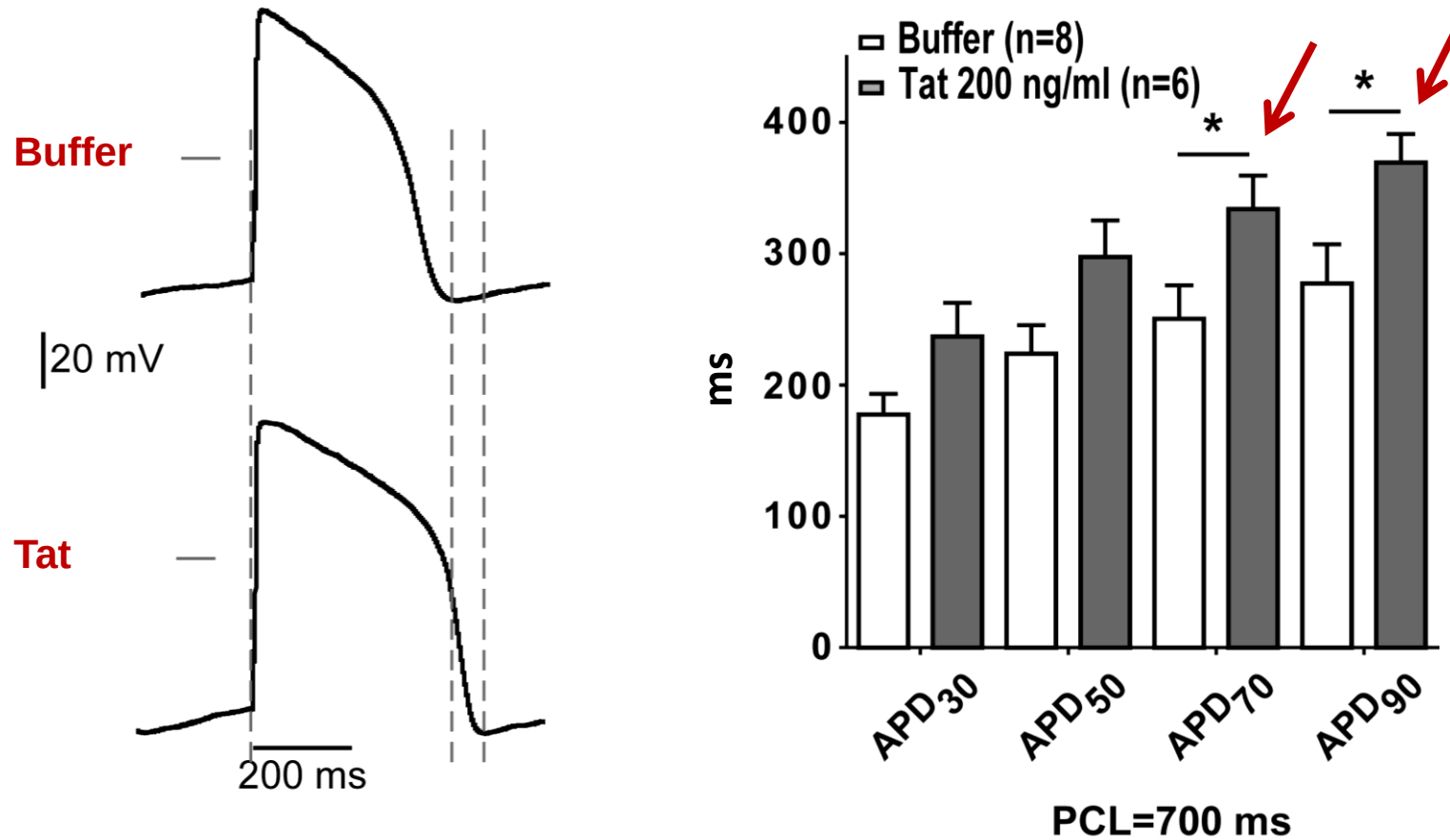
Effet de Tat sur le courant I_{Kr}

I_{Kr} in hiPS-CMs



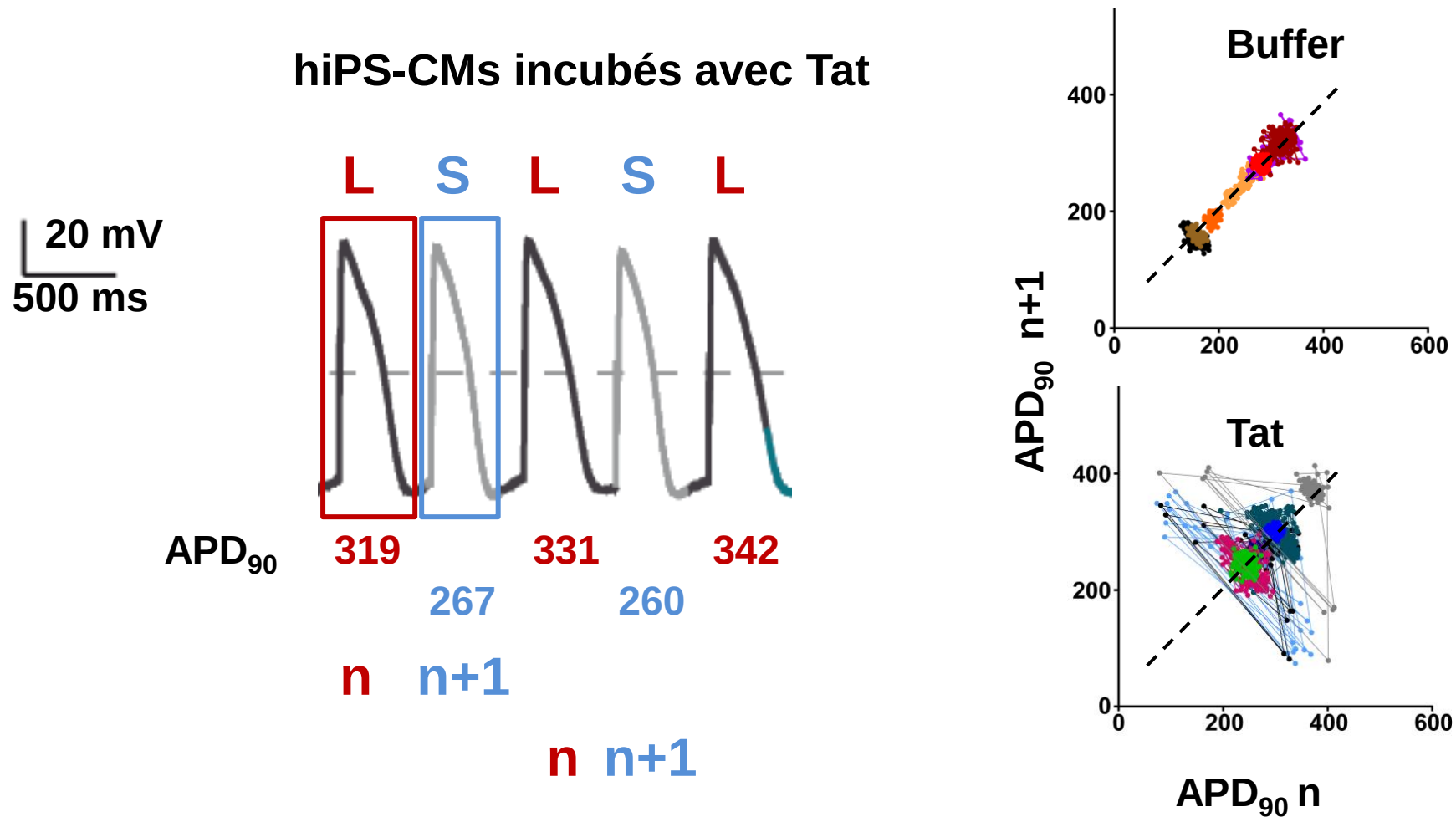
I_{Kr} est **significativement réduit** par Tat dans les hiPS-CMs

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



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

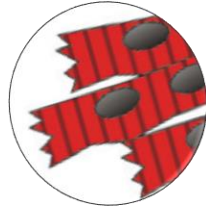
Effet de Tat sur le potentiel d'action: alternances



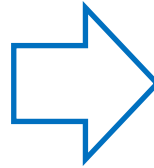
Tat entraine des alternances des APD des hiPS-CMs ventriculaires

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



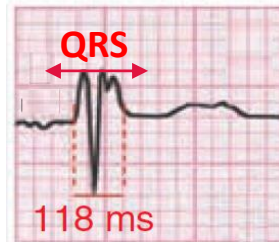
hiPS-CMs : outil d'investigation d'autres pathologies arythmiques non-génétiques

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**

Génotype - Phénotype

Délais de conduction ventriculaire



Hamamy syndrome



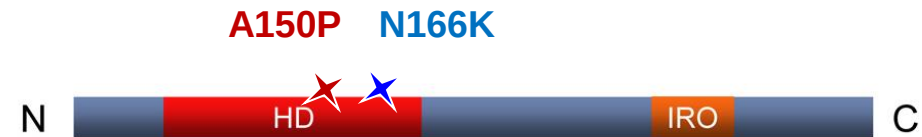
A150P

N166K

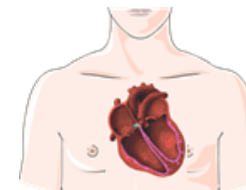


Bonnard et al. 2012

FT Iroquois homeobox



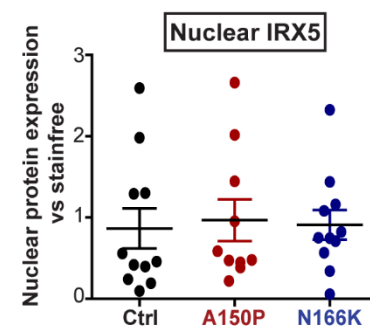
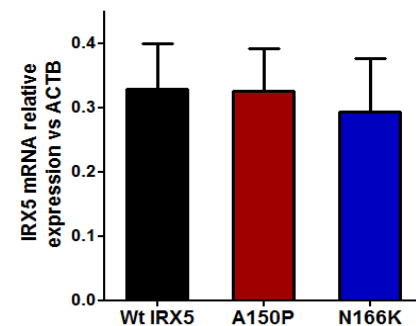
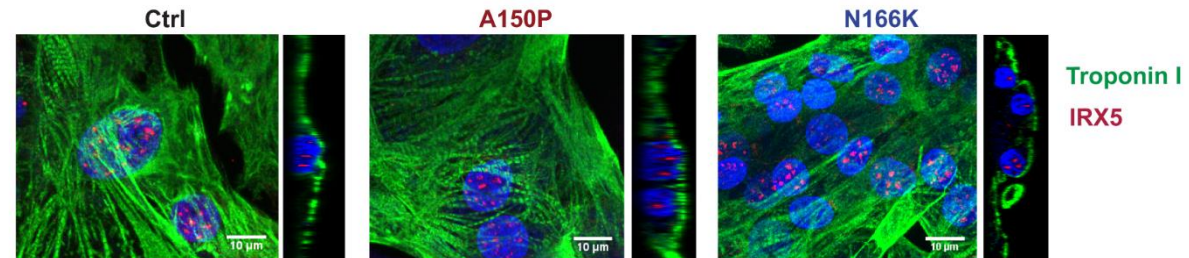
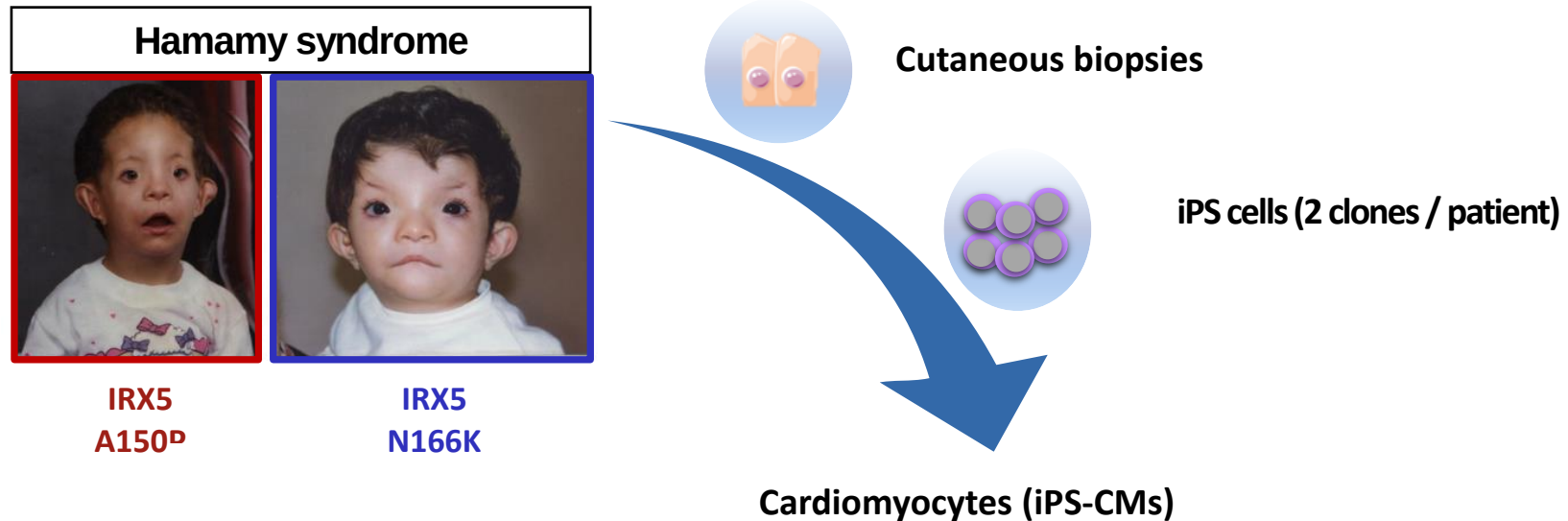
Défaut de repolarization
ventriculaire



Function dans le
coeur humain:

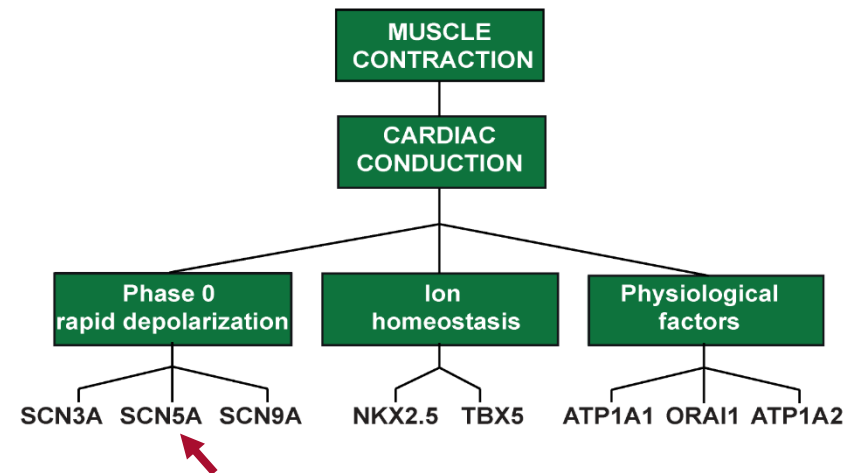
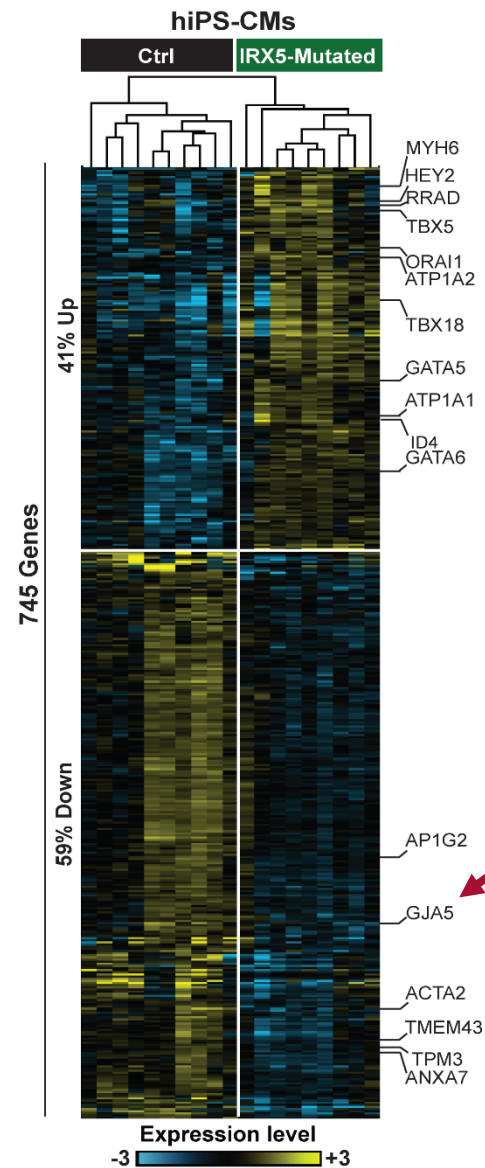
?

Cellules iPS présentent des mutations IRX5



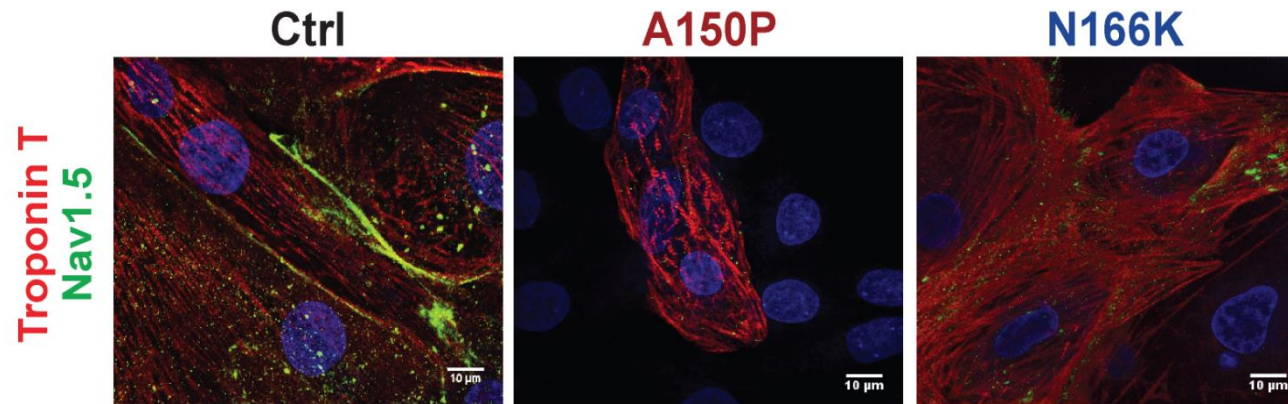
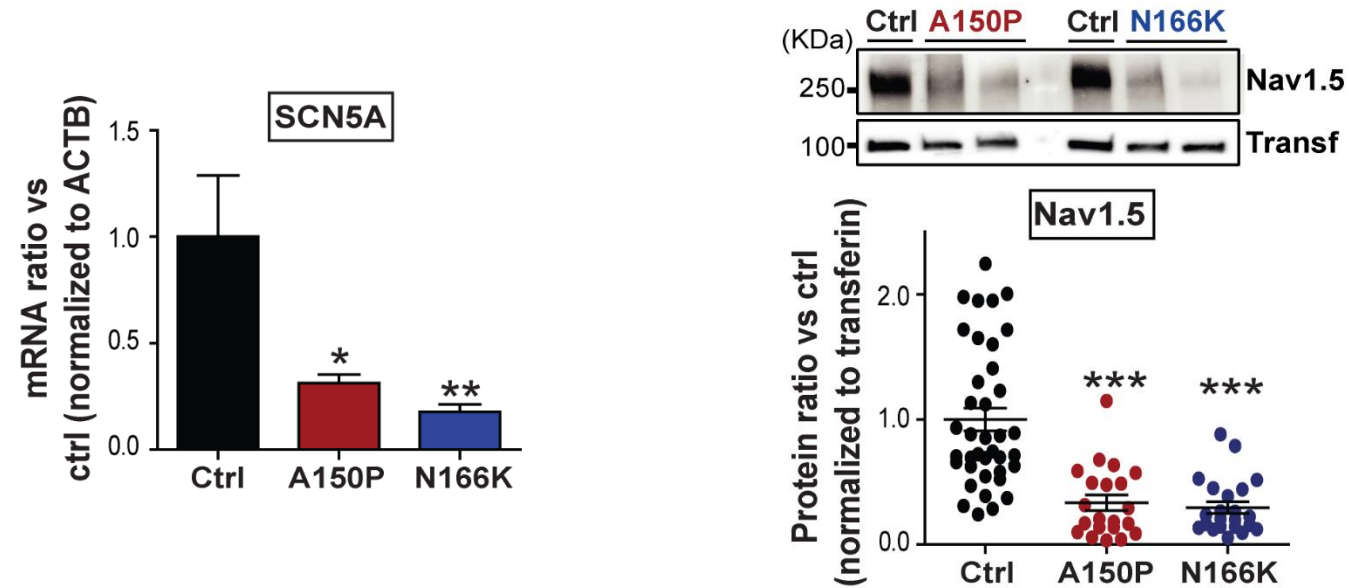
Mutations IRX5 altèrent l'expression des gènes cardiaques

Transcriptomic analysis (DGE sequencing)



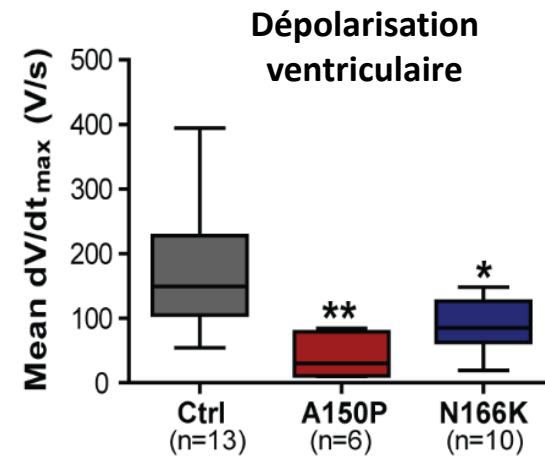
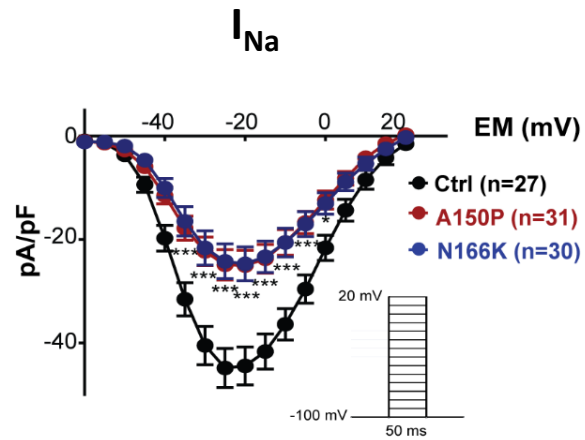
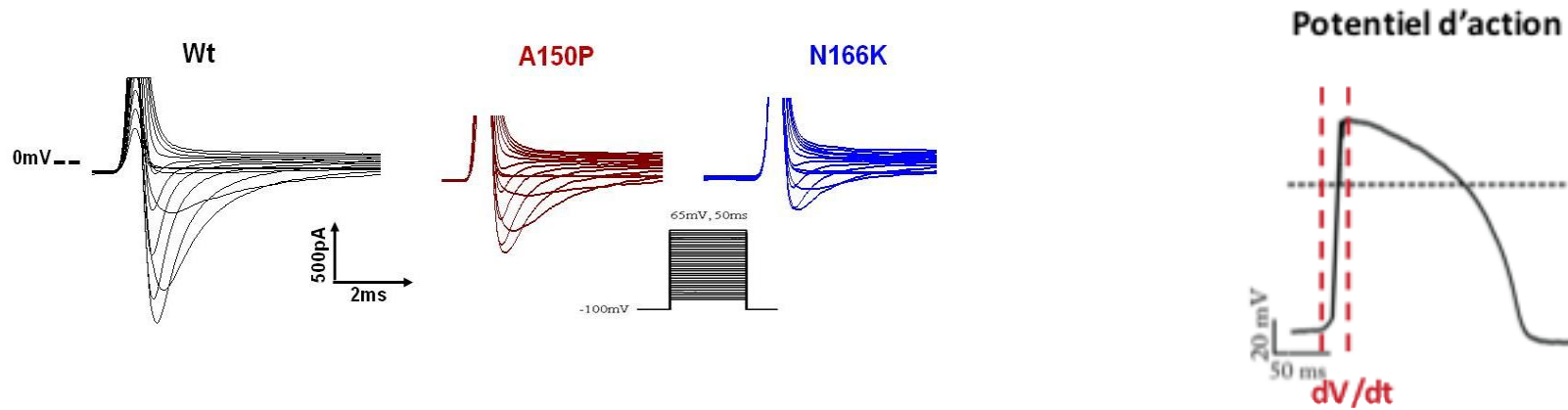
Altération de l'expression des gènes de la conduction cardiaque dans les hiPS-CMs mutées IRX5

Mutations IRX5 altèrent l'expression des gènes cardiaques

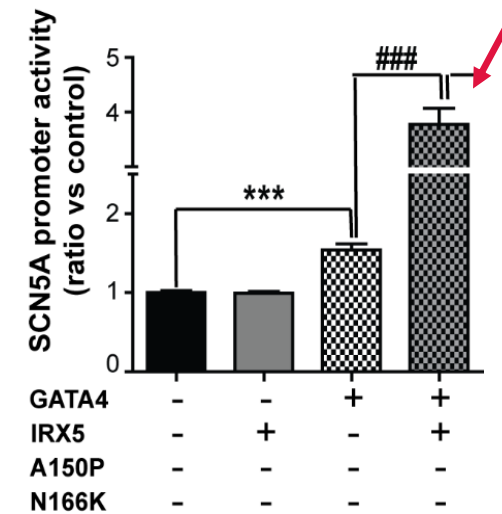
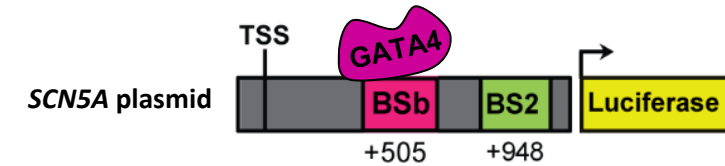
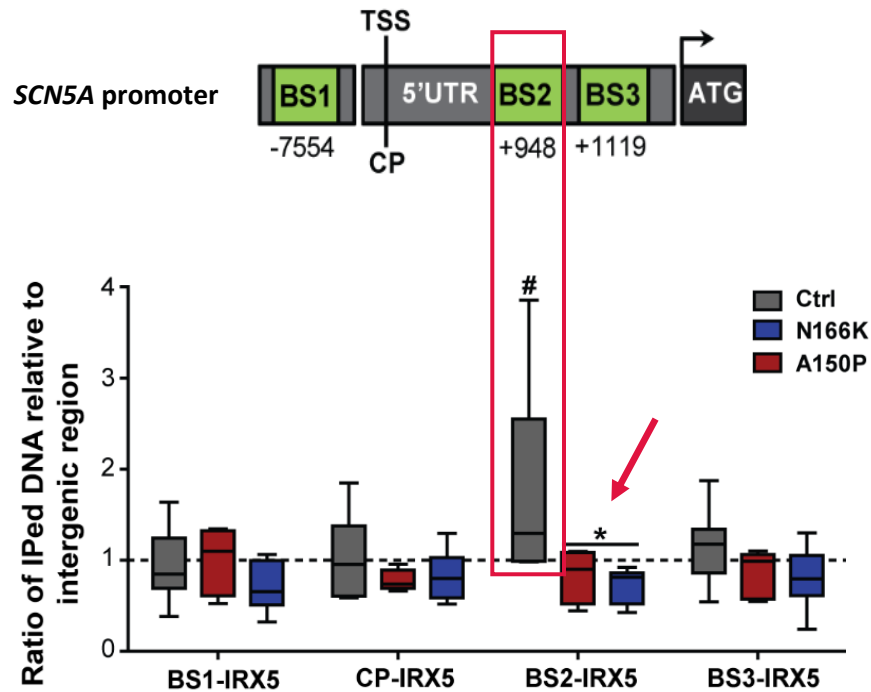


Réduction de l'expression de SCN5A dans les hiPS-CMs mutées IRX5

Altération de la fonction SCN5A



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



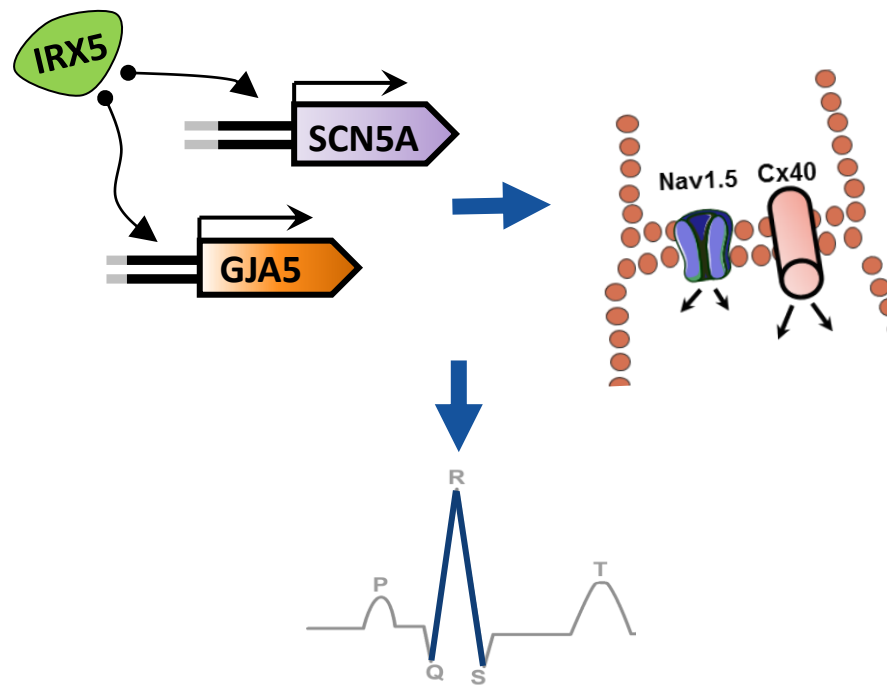
IRX5 interagit directement avec le promoteur de *SCN5A*

IRX5 potentialise l'effet de GATA4 sur l'activation du promoteur *SCN5A*

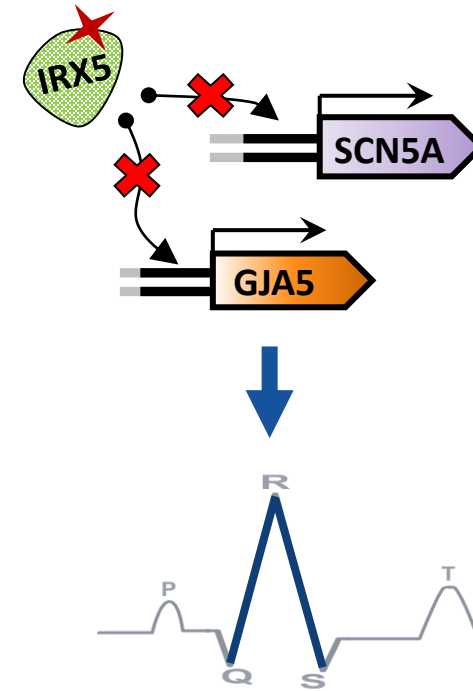
Une dérégulation de *SCN5A* pourrait participer à au ralentissement de conduction des patients Hamamy

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.

Phénotype Clinique typique



Arythmies
ventriculaires sévères

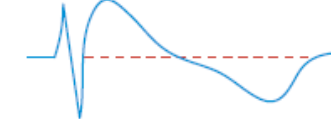


Mort subite

Individu sain

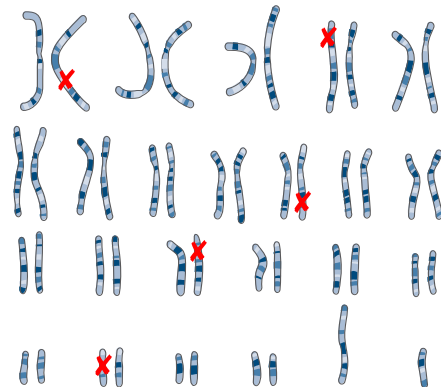


Patient BrS



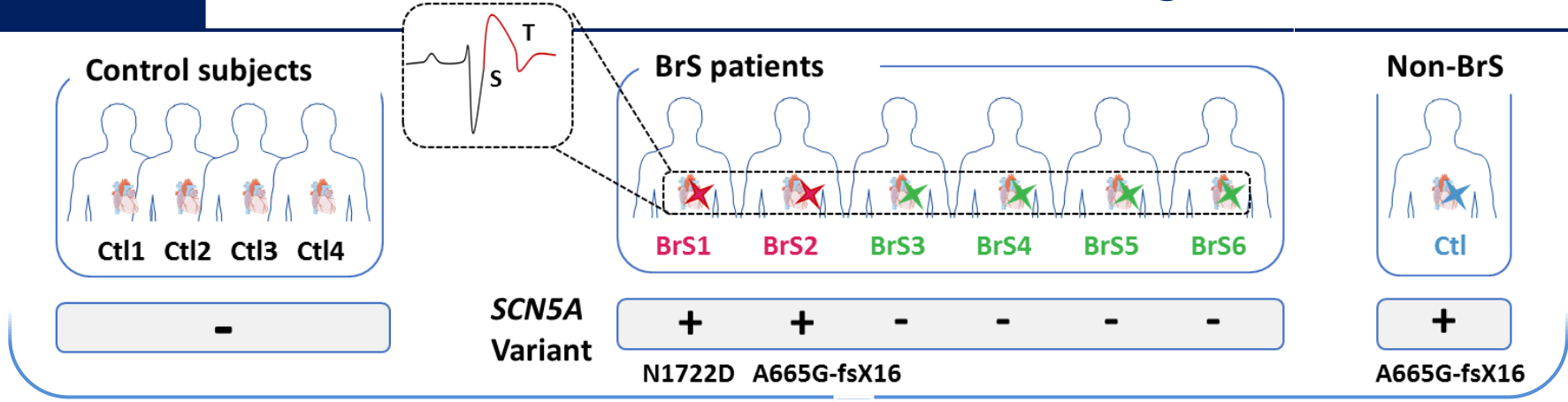
Diagnostic: ECG

Une génétique complexe

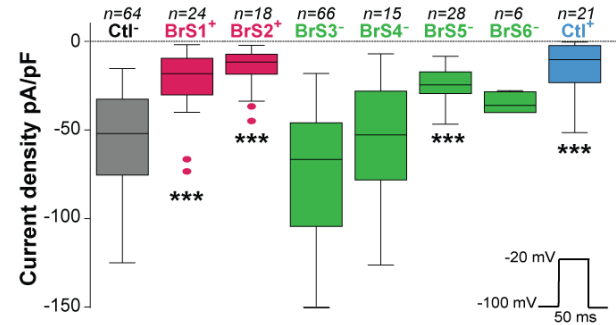
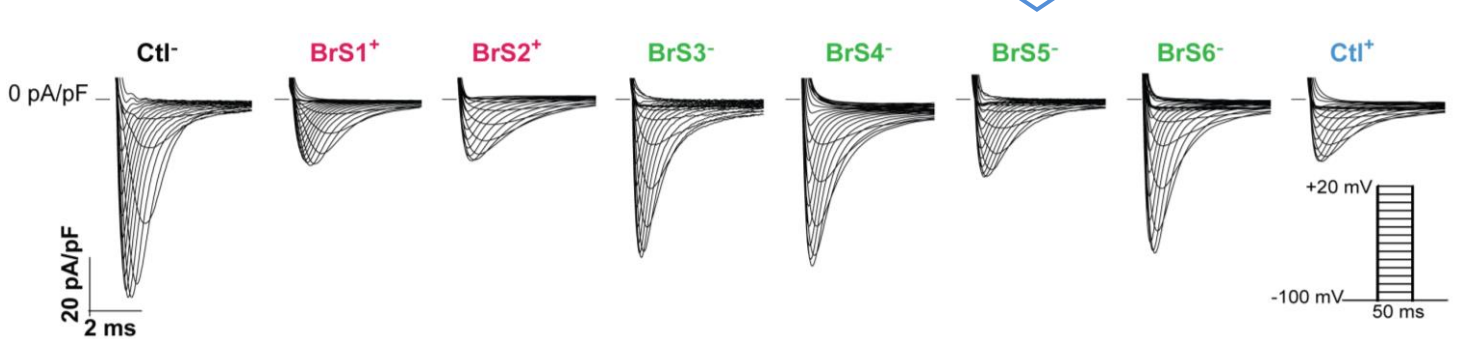


Phénotype cellulaire

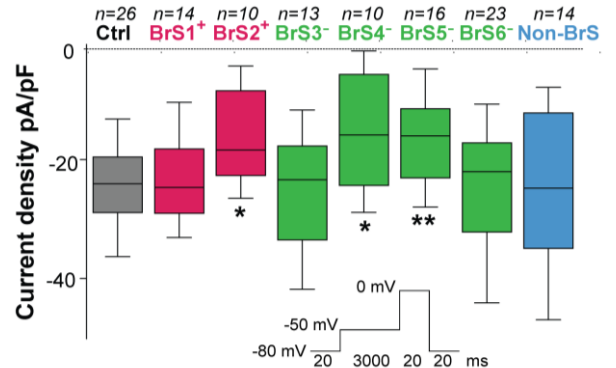
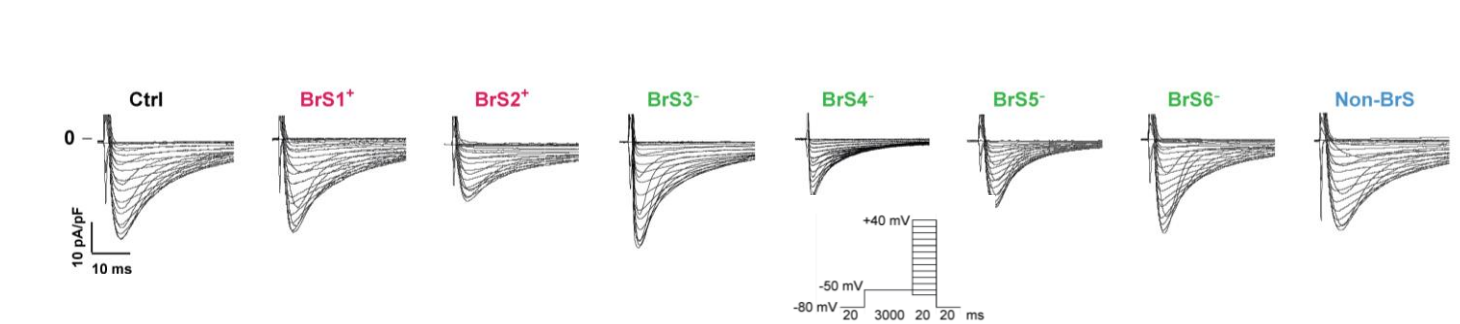
**Traits phénotypiques
cellulaires communs
partagés par les
patients affectés par
le BrS ?**



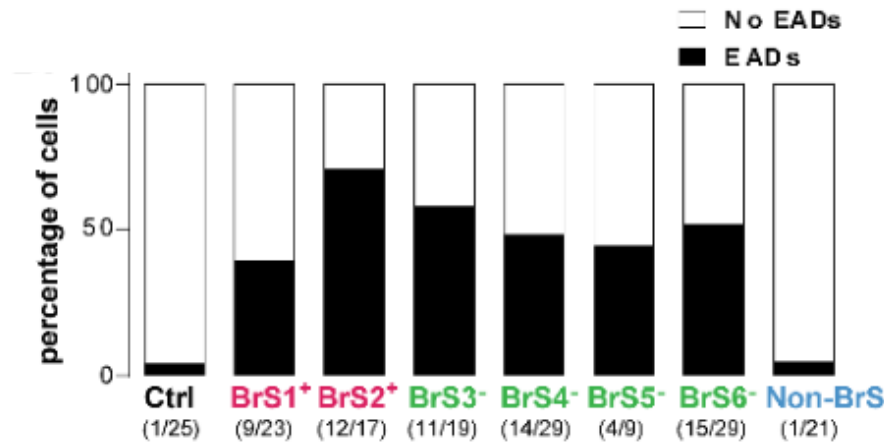
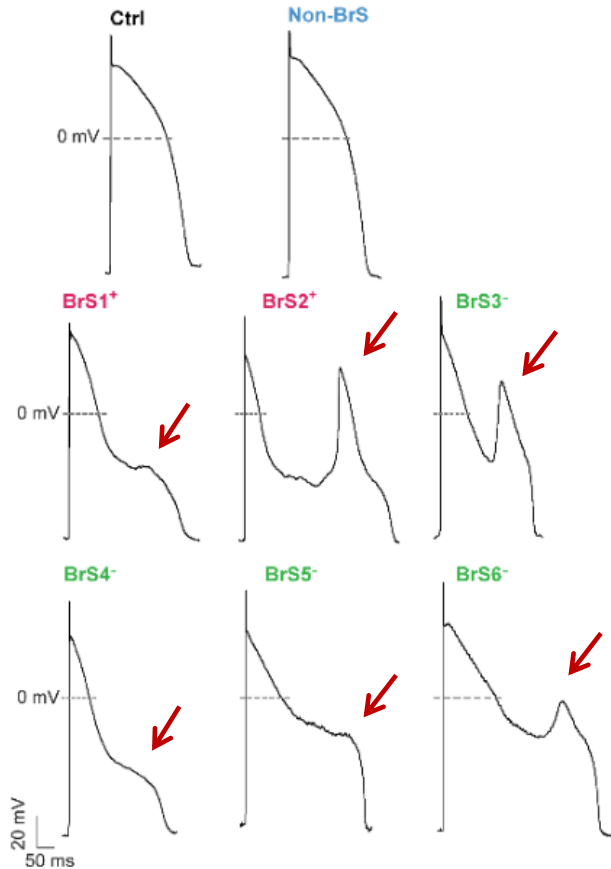
Courant sodique



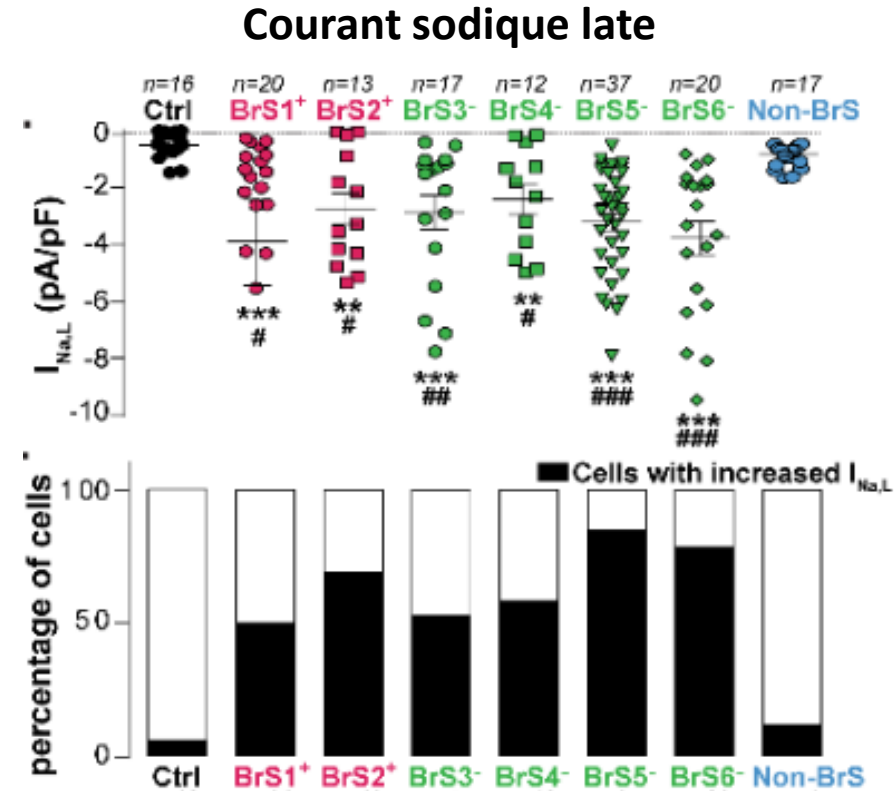
Courant calcique



La réduction de I_{Na} et I_{Ca,L} n'est pas commune à toutes les lignées hiPSC-CMs BrS



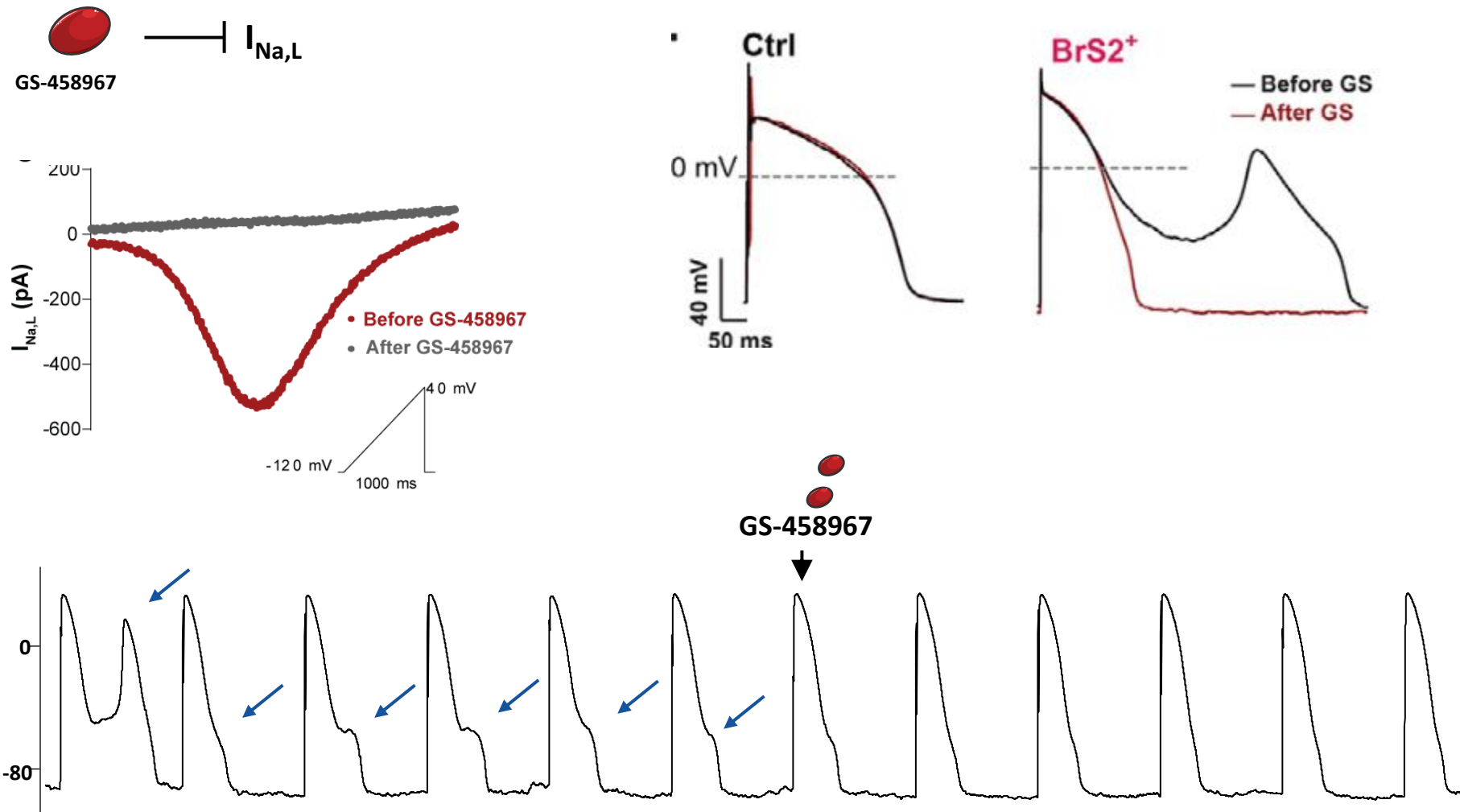
EADs dans 40% des cellules ventriculaires: phénotype cellulaire commun Brugada?



$I_{Na,L}$ augmente dans les lignées BrS

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

Late sodium current inhibition



$I_{Na,L}$ 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?

Nouveau challenge: étude du Brugada syndrome avec modèle 3D



4/5
patients die
undiagnosed

↳ Rare inherited arrhythmia - Prevalence: 1 / 2,000

↳ Causes ventricular fibrillation that can lead to sudden cardiac death

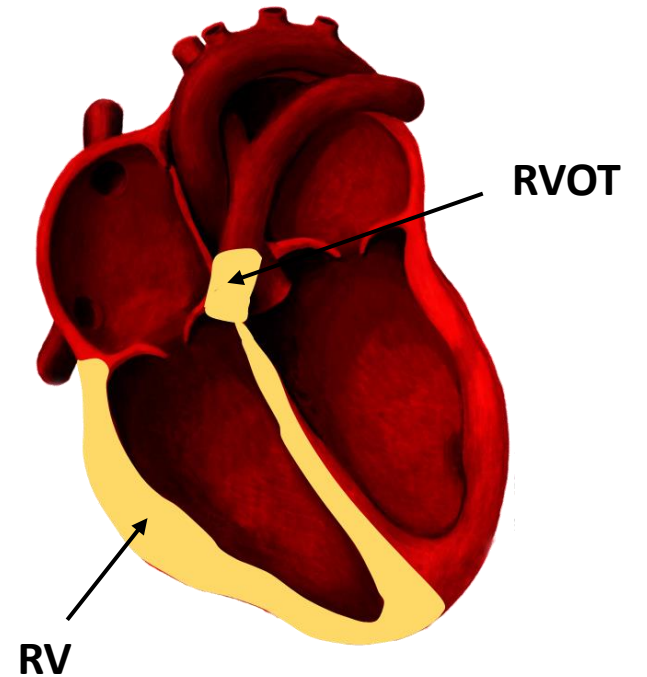
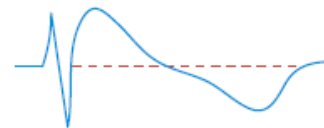
↳ Likely originates in the **RVOT** and **RV**

↳ Typical ECG features

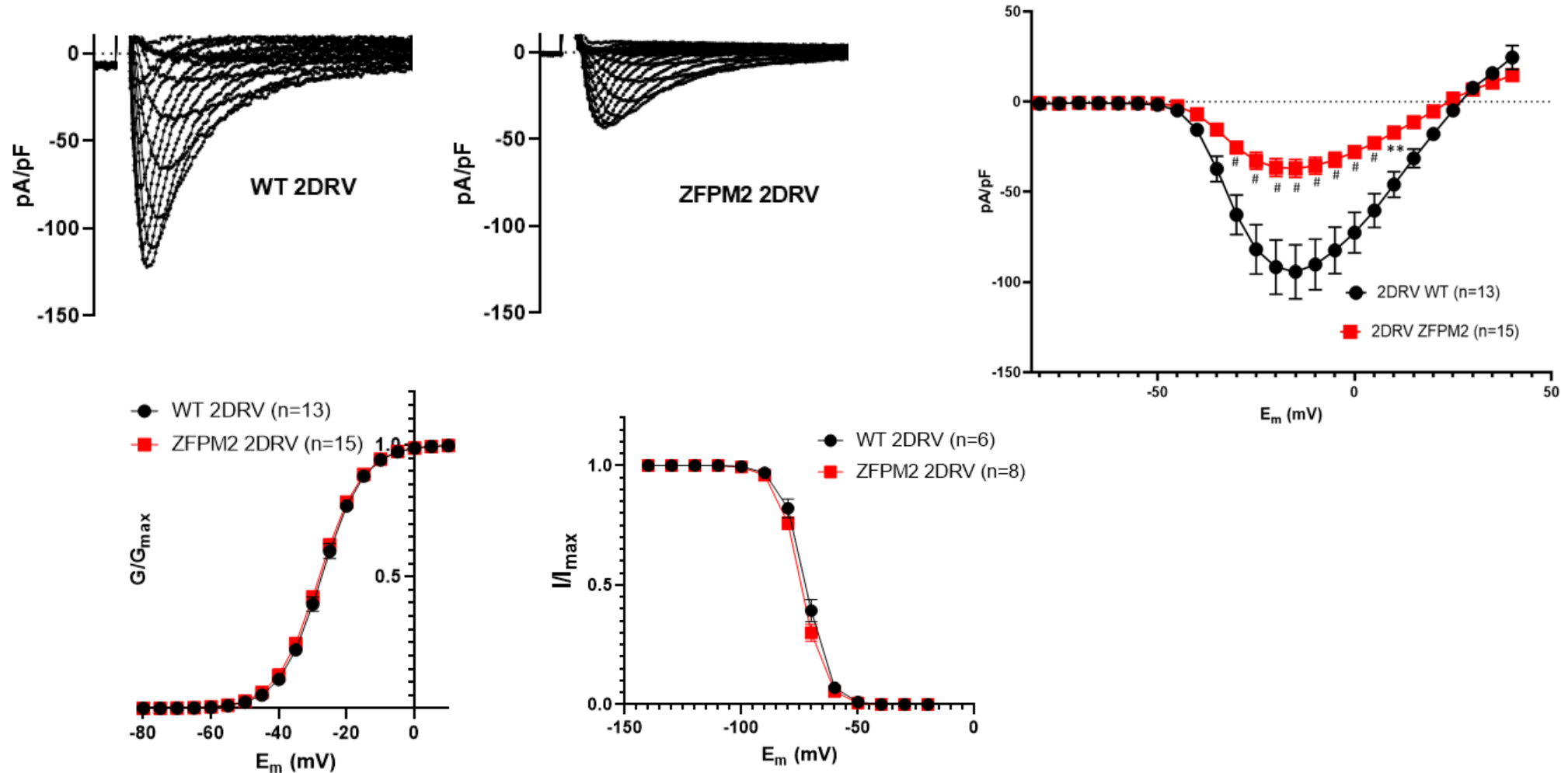
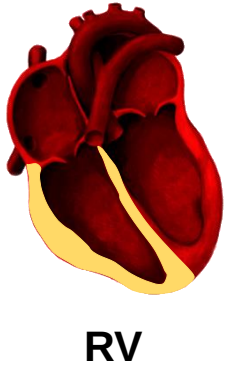
Healthy individual



BrS patient



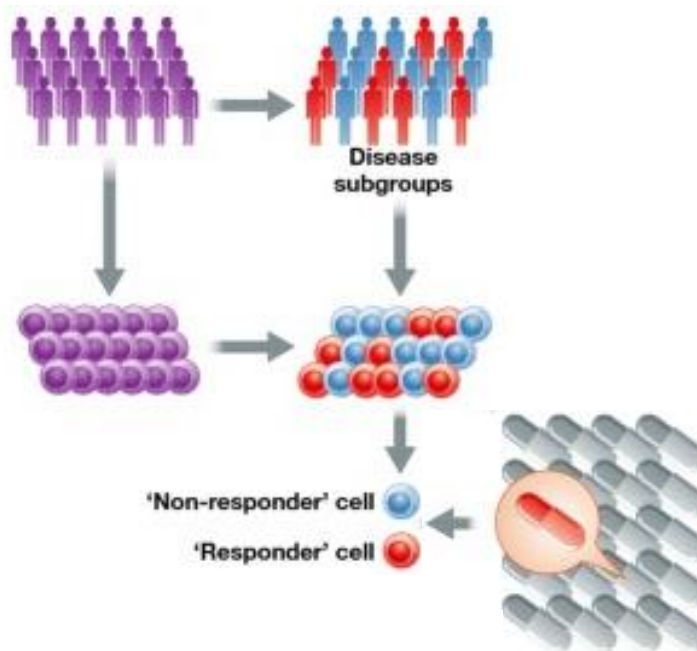
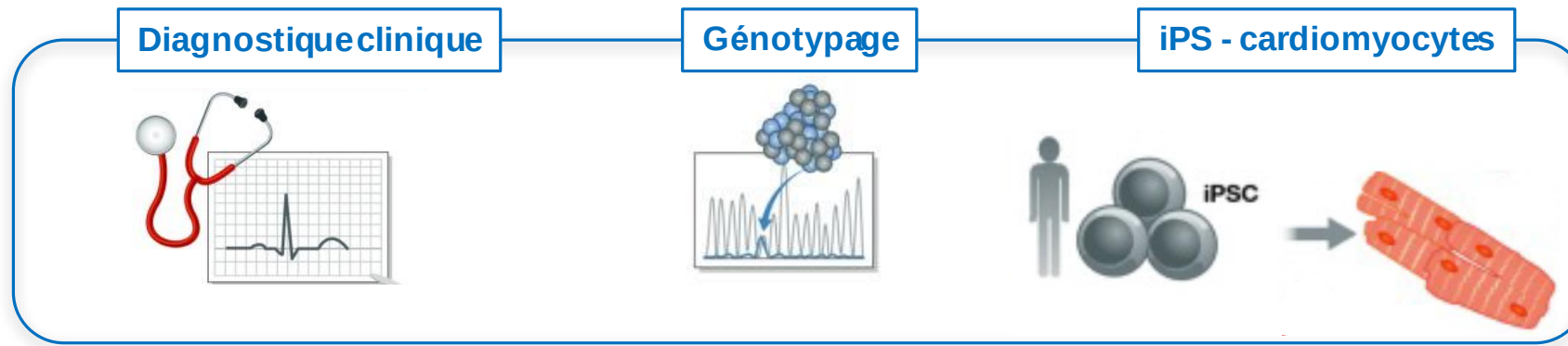
Sodium current analysis – RV cardoids



La délétion du locus :

- Entraîne une diminution de la densité de courant au pic (-61 %).
- Sans modifier les propriétés biophysiques du canal sodique : en accord avec l'hypothèse d'une dérégulation transcriptionnelle.

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

Flavien Charpentier
Michel De Waard

Guillaume Lamirault
Patricia Lemarchand
Thomas Stervinou
Sarah Godin
Clément Cohen
Aurore Girardeau
Anne Bibonne
Bastien Cimarosti
Robin Canac



umr1087.univ-nantes.fr

Thank you for your attention !



L'unité de recherche de l'institut du thorax
Inserm UMR 1087 / CNRS UMR 6291
Nantes, France



Daniel Buren et Patrick Bouchain, Les Anneaux, Quai des Antilles, Nantes, création pérenne Estuaire 2007 © Martin Argirolo/LVAN