Collège national de Biochimie-Biologie moléculaire médicale

iPSC : pathologie et méthodes d'édition du génome

Comité d'organisation : **Julie Leclerc** (CANTHER UMR9020-U1277, Oncogénétique Moléculaire, CHU Lille), **Aurélie Bedel** (Université de Bordeaux, Laboratoire de Biochimie CHU Pellegrin), **Clara Steichen** (INSERM U1313, CHU de Poitiers), **Marie de Tayrac** (Génétique Moléculaire et Génomique, CHU Rennes), **Claire Rodriguez-Lafrasse** (Biochimie et Biologie Moléculaire HCL - Fac Médecine Lyon-Sud) et **Julien Fromonot** (Hôpitaux Universitaires de Marseille).

INTERVENANTS : **John De Vos**, IRMB, Univ Montpellier, Inserm, CHU Montpellier, Montpellier. **Laurent David**, Nantes Université, Inserm, CR2TI, CHU Nantes, CNRS, Inserm, BioCore, Nantes. **Eloise Giabicani**, Sorbonne Université, INSERM, Centre de Recherche Saint Antoine, Paris. **Olivier Goureau**, Sorbonne Université, INSERM, CNRS, Institut de la Vision, Paris. **Anne Rovelet-Lecrux** et **Kévin Cassinari** Univ Rouen Normandie, Inserm U1245, CHU Rouen, Department of Genetics, CNRMAJ and Reference Center for Neurogenetics Disorders, Rouen. **Cécile Martinat**, ISTEM, INSERM UEVE UMR861, Corbeil-Essonnes.

FLASH TALKS : **Pascale FANEN**, Faculté de Santé, UPEC, Créteil, **Anne-Sophie LIA**, Université de Limoges, CHU de Limoges. **Julie LECLERC**, CANTHER UMR9020-U1277, Oncogénétique Moléculaire, CHU Lille. **Marie José STASIA**, CHU Grenoble Alpes, Université Grenoble Alpes. **Clara STEICHEN**, INSERM U1313, CHU de Poitiers. **Pierre-Antoine FAYE**, Université de Limoges, CHU de Limoges.

PROGRAMME SCIENTIFIQUE DU SEMINAIRE

Mercredi 15 Mai 2024

18h30 - 20h30 : **Accueil et Buffet-Repas**

21h00 - 22h00 : Mot d'accueil par la Présidente du CNBBMM

Conférence inaugurale : Chimères homme/animal. Pan, Minotaure et cellules souches pluripotentes.
Pr John De Vos, IRMB, Univ Montpellier, Inserm, CHU Montpellier, Montpellier.

Jeudi 16 mai 2024

9h00 - 9h45 : Les cellules souches pluripotentes en 2024, leur génération, leur utilisation et les perspectives d'avenir.
Dr Laurent David, Nantes Université, Inserm, CR2TI, CHU Nantes, CNRS, Inserm, BioCore, Nantes.

9h45 - 10h30 : Organoïdes bronchiques iPSC pour une thérapie génétique personnalisée.
Pr John De Vos, IRMB, Univ Montpellier, Inserm, CHU Montpellier, Montpellier.

10h30 - 11h00 : Pause-café

11h00 – 11h45 : Intérêt des cellules souches dans la modélisation des maladies liées à l'empreinte parentale.
Dr Eloise Giabicani, Sorbonne Université, INSERM, Centre de Recherche Saint Antoine, Paris

11h45 – 12h30 : **Flashtalks membres du CNBBMM**
Modèles cellulaires d'épimutation constitutionnelle du gène *MLH1* : une utilisation originale des iPSCs pour leur machinerie épigénétique. **Julie LECLERC,** CANTHER, Oncogénétique Moléculaire, CHU Lille
Utilisation d'iPSC différenciées en épithélium bronchique pour le développement d'approches thérapeutiques de mutations non éligibles aux modulateurs de CFTR. **Pascale FANEN,** Faculté de Santé, UPEC, Créteil.
Advances in modeling the Charcot-Marie-Tooth disease through CRISPR editing: Human induced pluripotent stem cell-derived Schwann cells harboring *SH3TC2* variants. **Anne-Sophie LIA,** Université de Limoges, CHU de Limoges.

12h30 - 14h00 : Repas

14h00 – 14h45 **Flashtalks membres du CNBBMM**
Développement de nouveaux modèles cellulaires pour l'étude de la physiopathologie de la granulomatose septique chronique. **Marie José STASIA,** CHU Grenoble Alpes, Université Grenoble Alpes.
Exemple d'application des organoïdes rénaux humains en toxicologie : Développement de l'Adverse Outcome Pathway de la néphrotoxicité induite par l'uranium. **Clara STEICHEN**, INSERM U1313, CHU de Poitiers.
Développement d'un Modèle In-vitro Tridimensionnel de jonction neuromusculaire à partir de cellules IPSC pour l'étude des CMT. **Pierre-Antoine FAYE,** Université de Limoges, CHU de Limoges.

14h45 – 15h30 : Organoïdes de rétines dérivées de cellules iPS : des modèles 3D pour une meilleure compréhension des maladies et le développement de thérapies innovantes.
Dr Olivier Goureau, Sorbonne Université, INSERM, CNRS, Institut de la Vision, Paris

16h00 - 19h30 : Temps d'échange collaboratif libre

Vendredi 17 mai 2024

9h30-10h15 : iPSC et édition génomique : application à la maladie d'Alzheimer .
Dr Anne Rovelet-Lecrux, Univ Rouen Normandie, Inserm U1245, CHU Rouen, Department of Genetics, CNRMAJ and Reference Center for Neurogenetics Disorders, Rouen

10h15 - 11h00 : Évaluation des conséquences transcriptomiques des variations pathogènes de NIPBL dans des cellules souches pluripotentes induites éditées.
Dr Kévin Cassinari, Univ Rouen Normandie, Inserm U1245, CHU Rouen, Department of Genetics, CNRMAJ and Reference Center for Neurogenetics Disorders, Rouen

11h00-11h30 : Pause

11h30-12h15 : Utilisation des cellules souches pluripotentes humaines pour décrypter la dystrophie myotonique de type 1
Dr Cécile Martinat, ISTEM, INSERM UEVE UMR861, Corbeil-Essonnes

12h30-14h00 : Repas

14h00-15h30 : Réunion plénière du CNBBMM - Nouvelles du CNU

15h30-15h45 : Clôture scientifique du 36e séminaire pédagogique du CNBBMM par sa Présidente

ABSTRACT BOOK

Chimères homme/animal. Pan, Minotaure et cellules souches pluripotentes. Pr John De Vos, IRMB, Univ Montpellier, Inserm, CHU Montpellier, Montpellier.

L'idée d'être vivants à la fois humains et animaux date de l'antiquité. Ce sont des figures récurrentes de la mythologie égyptienne, grecque et romaine, dont Pan et le Minotaure sont des figures majeures, mais ce panthéon surnaturel comporte également le Sphinx, Horus ou encore les sirènes. Comme en écho de cet imaginaire antique, des travaux récents, notamment de l'équipe de Hiromitsu Nakauchi (Japon), ont montré la possibilité de créer des organes de rat dans une souris et vice versa, en particulier pour le pancréas. Par extrapolation, on peut concevoir que dans l'avenir, des organes humains soient produits dans des gros animaux, notamment le porc, pour résoudre la problématique de la pénurie d'organes, mais aussi pour produire des organes autologues. Bien que cette vision puisse sembler sortie tout droit d'un roman de science-fiction, elle est bien réelle. Si ces techniques sont encore loin de la clinique, plusieurs équipes de chercheurs ont effet déjà franchi des étapes importantes en créant des chimères partielles entre porcs et humains. Qui aurait cru que les légendes antiques inspireraient un jour les avancées médicales les plus audacieuses de notre temps ?

Les cellules souches pluripotentes en 2024, leur génération, leur utilisation et les perspectives d'avenir. Dr Laurent David, Nantes Université, Inserm, CR2TI, CHU Nantes, CNRS, Inserm, BioCore, Nantes.

La découverte de la reprogrammation de cellules somatiques en cellules souches pluripotentes induites en 2006 a ouvert de nombreuses voies de recherche. En parallèle de la mise au point des protocoles de différenciations nécessaires à l'utilisation des cellules souches pluripotentes humaines, de nombreux progrès ont été réalisés pour réduire la pénibilité de la culture cellulaire, s'assurer de la qualité des cellules générées et monter en échelle les expériences de culture cellulaire. Dans cette présentation, je ferai un bref retour historique sur la reprogrammation puis présenterai l'état-de-l'art de la reprogrammation et de la culture des cellules souches pluripotentes. J'ouvrirai en soulevant les problématiques nouvelles liées aux organoïdes et à l'édition de génome.

Organoïdes bronchiques iPSC pour une thérapie génétique personnalisée. Pr John De Vos, IRMB, Univ Montpellier, Inserm, CHU Montpellier, Montpellier.

La dyskinésie ciliaire primitive (PCD) est une maladie génétique causée par des mutations qui modifient le battement des cils, y compris dans les voies respiratoires, entraînant une altération de la clairance du mucus et une morbidité sévère ainsi qu'une mortalité accrue. Nous avons émis l'hypothèse que nous pourrions restaurer le battement des cils bronchiques avec des iPSC génétiquement corrigées et différenciées en épithélium bronchique en interface air-liquide (iALI) dans le cadre d'une thérapie cellulaire autologue.
Nous avons montré que les cellules corrigées générées à partir d'une lignée cellulaire IPS d'un patient PCD peuvent être différenciées en iALI avec des battements ciliaires fonctionnels. Des progéniteurs pulmonaires au stade d'intestin antérieur ventralisé sont capables de prise de greffe sur un iALI préalablement décellularisé par action enzymatique ou chimique. Ces résultats ouvrent la porte à une approche de thérapie cellulaire et génique des maladies génétiques bronchiques.

Intérêt des cellules souches dans la modélisation des maladies liées à l'empreinte parentale. Dr Eloise Giabicani, Sorbonne Université, INSERM, Centre de Recherche Saint Antoine, Paris

L'empreinte parentale est un processus épigénétique conduisant à une expression mono- allélique d'un même gène selon son origine parentale. Le mécanisme épigénétique principal conduisant à la régulation de ces gènes soumis à empreinte est la méthylation différentielle entre l'allèle paternel ou maternel au niveau de centres de contrôle de l'empreinte (ICR). Les pathologies d'empreinte sont des maladies rares affectant principalement la croissance, le métabolisme et le développement (1). Elles sont causées par une expression aberrante de gènes soumis à empreinte souvent secondaire à des défauts de méthylation au niveau des ICRs. Le syndrome de Silver-Russell (SRS), de Temple (TS14) et de Beckwith-Wiedemann (BWS) sont trois pathologies d'empreinte affectant la croissance fœtale et postnatale. Il n'existe pas de modèles cellulaires ou animaux convaincants pour étudier la physiopathologie de ces maladies, première étape vers de l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. Les cellules souches sont des modèles prometteurs pour améliorer la compréhension des pathologies génétiques humaines. C'est pourquoi nous avons développé en parallèle deux modèles cellulaires: les cellules souches de la pulpe dentaire (DPSCs) et les cellules souches pluripotentes induites humaines (iPSCs).
Les cellules souches de la pulpe dentaire sont des cellules souches mésenchymateuses multipotentes pouvant être différenciées *in vitro* en différentes lignées cellulaires d'intérêt. Nous avons collecté les DPSC chez cinq témoins et sept patients (cinq SRS, un TS14 et un BWS). L'analyse de la méthylation des ICR en 11p15.5 a montré un profil normal chez les témoins et anormal chez les patients comme celui identifié dans leurs leucocytes. Ces résultats étaient stables lorsque les DPSC étaient cultivées dans un milieu de différenciation ostéogénique pendant 21 jours. Nous avons également confirmé l'expression mono-allélique de *H19* (un gène soumis à empreinte de la région 11p15.5) chez les témoins et son expression bi-allélique chez un patient (2).
Contrairement aux DPSCs, les cellules souches pluripotentes induites ont la capacité de se différencier dans l'ensemble des lignées somatiques, cependant, des hyperméthylations aberrantes au niveau des ICRs de la région 11p15.5 et 14q32.2 se produisent lors du processus de reprogrammation et de culture des iPSCs (3). Nous avons donc mis au point des conditions de culture reposant sur l'effet synergique de la vitamine C et de l'hypoxie pour obtenir des iPSCs avec une méthylation équilibrée à la plupart des ICR et une expression mono-allélique des gènes soumis à empreinte, *H19* et *DLK1* (4).
Ces résultats montrent que les DPSCs et les iPSCs sont deux modèles cellulaires prometteurs dans l'étude des pathologies d'empreinte. Ces résultats suggèrent également que le maintien de ces profils de méthylation devrait être systématiquement vérifié lorsque les iPSCs sont utilisées pour modéliser les pathologies humaines.

Références

1. Eggermann T, Monk D, de Nanclares GP, Kagami M, Giabicani E, Riccio A, Tümer Z, Kalish JM, Tauber M, Duis J, Weksberg R, Maher ER, Begemann M, Elbracht M. Imprinting disorders. Nat Rev Dis Primers. 2023.
2. Giabicani E, Pham A, Selenou C, Sobrier M-L, Andrique C *et al.* Dental pulp stem cells as a promising model to study imprinting diseases. Int J Oral Sci. 2022.
3. Bar S, Schachter M, Eldar-Geva T, Benvenisty N. Large-Scale Analysis of Loss of Imprinting in Human Pluripotent Stem Cells. Cell Rep. 2017.
4. Pham A, Selenou C, Giabicani E, Fontaine V, Marteau S, Brioude F, David L, Mitanchez D, Sobrier ML, Netchine I. Maintenance of methylation profile in imprinting control regions in human induced pluripotent stem cells. Clin Epigenetics. 2022.

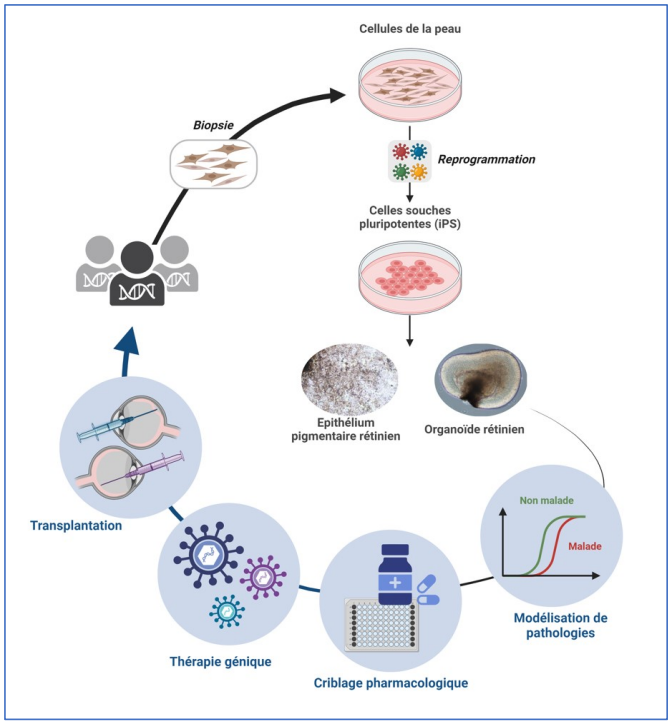
Organoïdes de rétines dérivées de cellules iPS : des modèles 3D pour une meilleure compréhension des maladies et le développement de thérapies innovantes.

Dr Olivier Goureau, Sorbonne Université, INSERM, CNRS, Institut de la Vision, Paris

Les cellules souches de type iPS présentent un intérêt majeur pour améliorer notre compréhension des maladies humaines ainsi que pour la conception de nouvelles stratégies thérapeutiques (thérapie cellulaire en médecine régénérative, validation d'approches de thérapie génique, criblage pharmacologique).

Les progrès concernant notre compréhension des processus développementaux, issus notamment de l'étude de modèles animaux combiné à la maitrise des protocoles favorisant la différenciation contrôlée de ces cellules souches, permettent depuis quelques années de produire des structures tridimensionnelles présentant une organisation cellulaire évocatrice de celle des organes modélisés. Ces structures, appelées organoïdes peuvent être composées de différents types de cellules organisés d'une manière similaire à celle observée au sein du véritable organe, permettant ainsi d'acquérir certaines des propriétés de ce dernier.

Notre équipe à l'Institut de la Vision à Paris a ainsi mis au point des procédés efficaces permettant la conversion rapide des cellules iPS en organoïdes rétiniens Ces structures 3D sont des avatars de rétines contenant tous les types de cellules formant une rétine notamment les photorécepteurs, les cellules photosensibles qui sont affectées dans les dystrophies rétiniennes héréditaires comme les rétinopathies pigmentaires. Ces nouveaux modèles *in vitro* permettent de reproduire et d'étudier les processus cellulaires et moléculaires conduisant à la mort des photorécepteurs dans ces maladies dégénératives. Ces organoïdes permettent de valider de nouvelles approches de thérapie génique utilisant comme vecteur des virus associés aux adénovirus, communément appelés AAVs, ainsi que des approches d'édition du génome par les fameux ciseaux de l'ADN CRISPR/Cas9.



Goureau O et Orieux G. Nouvelle approche thérapeutique pour les rétinopathies pigmentaires : la transplantation de photorécepteurs dérivées de cellules souches. Médecine/Science 2020, 36, 600-606.

Goureau O, Reichman S et Orieux G. Les organoïdes de rétine : un nouvel outil pour la compréhension et le traitement des pathologies rétiniennes. Médecine/Science 2020, 36, 626-632.

iPSC et édition génomique : application à la maladie d'Alzheimer. Dr Anne Rovelet-Lecrux, Univ Rouen Normandie, Inserm U1245, CHU Rouen, Department of Genetics, CNRMAJ and Reference Center for Neurogenetics Disorders, Rouen

La maladie d'Alzheimer (MA) est la pathologie neurodégénérative la plus fréquente au monde. De nombreuses études ont permis d'établir que la surproduction et l'agrégation du peptide Aβ est le point de départ d'une cascade physiopathologique aboutissant à la mort neuronale. Bien que le vieillissement soit le facteur de risque majeur de la MA, il existe une forte composante génétique, particulièrement dans le cas des formes jeunes de MA. La mise en évidence et l'étude des conséquences de ces facteurs de risque génétique sont donc essentielles au diagnostic, à la compréhension des mécanismes physiopathologiques de la MA et à la mise au point de traitements adaptés.
Spécifiquement, des variants rares du gène *SORL1*, codant la protéine SorLA, sont retrouvés chez 3% des patients atteints de formes précoces de MA. Il avait été démontré, dans des modèles murins et cellulaires, que la perte de fonction de SorLA entraîne une augmentation de la production de peptide Aβ, aboutissant ainsi à la pathologie Alzheimer. Ainsi, les variants perte de fonction de *SORL1*, aboutissant à la perte d'expression de la protéine, confèrent un risque fort de développer la MA. En revanche, il est plus difficile de déterminer l'impact de variants faux sens sur la fonction de la protéine SorLA. Il est possible de prédire leur impact grâce à des logiciels de prédiction de pathogénicité, mais ces logiciels restent imprécis. Il est donc nécessaire de déterminer, pour chaque variant, son impact éventuel sur la fonction de la protéine et donc son implication dans le processus neurodégénératif.
Dans ce cadre, nous avons mis en place différents modèles cellulaires, basés d'une part sur un screening à grande échelle via la surexpression de la protéine dans des lignées cellulaires HEK293 et d'autre part, afin de contourner les biais de surexpression, sur l'étude de la protéine SorLA au niveau endogène. Pour cela, nous avons utilisé les cellules souches pluripotentes induites (iPSC), que nous avons modifiées génétiquement par la technique de CRISPR/Cas9, afin d'y introduire des variations génétiques dans le gène *SORL1*. En effet, les avancées technologiques récentes dans le domaine de l'édition génomique ont permis de faciliter le développement de ces modèles et leur utilisation dans le cadre de nombreuses pathologies. Grâce à ces approches combinées, nous avons établi que les variants faux-sens identifiés chez les patients MA avaient différentes conséquences sur la fonction de SorLA ; notamment, 25% d'entre eux affectent la maturation de la protéine. Cela a pour conséquence une perte de la localisation subcellulaire normale de SorLA, aboutissant à une perte de fonction de la protéine. Enfin, nous avons montré que la présence de ces variants aboutissaient à une augmentation de la sécrétion du peptide Aβ, impliquant un rôle direct dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer.

Évaluation des conséquences transcriptomiques des variations pathogènes de NIPBL dans des cellules souches pluripotentes induites éditées.

Kévin. Cassinari[1], Anne Rovelet-Lecrux[1], Céline Derambure[1], Myriam Vezain[1], Sophie Coutant[1], Anne-Claire. Richard[1], Nathalie Drouot[1], Juliette Coursimault[1], GabriellaVera[1], Alice Goldenberg[1], Pascale Saugier-Veber[1], Camille Charbonnier[1], Gaël Nicolas[1]

1. Laboratoire de Cytogénétique, Université de Rouen Normandie, UNIROUEN, Inserm U1245 CHU de Rouen, 76000 Rouen, France

Mots clés
Cornelia de Lange, RNAseq, CRISPR-Cas9, transcriptomique

Introduction : Le complexe cohésine joue un rôle critique dans la structure chromatinienne et la régulation de l'expression des gènes. Le syndrome de Cornelia de Lange (CdLS) est une transcriptomopathie liée à des altérations de ce complexe. *NIPBL*, le principal gène du CdLS, code le facteur de chargement de la cohésine, en lien avec son partenaire *MAU2*. Les conséquences de l'expression génique des variations pathogènes, nucléotidiques ou structurales, de *NIPBL* permettront une meilleure compréhension du syndrome et pourraient être utilisées comme des biomarqueurs potentiels.

Méthodes : Par CRISPR/Cas9, nous avons introduit, dans une lignée iPSC, les variations pathogènes de *NIPBL* suivantes, à l'état hétérozygote ou homozygote : p.Arg45*, p.Arg834*, p.Ser1466Lysfs*13, p.Asp2157Gly et p.Arg2298Cys, ainsi que des *indels* entrainant un décalage de cadre dans les exons correspondants. Nous avons évalué les niveaux d'ARNm de *NIPBL* et de *MAU2* par RT-ddPCR et RNAseq et mesuré les niveaux protéiques de NIPBL et de MAU2 par western-blot. Nous avons ensuite utilisé les données de RNAseq pour établir une signature transcriptomique des altérations de *NIPBL.*

Résultats : La RT-ddPCR et le RNAseq ont montré une diminution des niveaux d'ARN de *NIPBL* pour toutes les cellules portant des variants tronquants, sauf pour le variant p.Arg45*, probablement à cause d'un site alternatif d'initiation de la traduction précédemment décrit entrainant un non déclenchement du Nonsense Mediated Decay (NMD). Pour toutes les conditions, y compris les variations faux-sens, une diminution d'environ 50% des niveaux de protéine de MAU2 a été observée, sans modification de l'ARNm de MAU2. L'analyse de l'expression différentielle a mis en évidence 60 gènes dérégulés dont 47 gènes sous-exprimés (FC >0.125, FDR<5%), parmi lesquels 8 gènes sont haploinsufisants (pLi>0.9) et associés à un phénotype dans OMIM Morbid dont les caractéristiques phénotypiques chevauchent celles du CdLS.

Conclusion : Nous proposons de nouveaux modèles d'iPSC édités pour le CdLS. Nos résultats confirment les données précédemment établies suggérant que les variations dans l'extrémité 5' de la séquence codante de NIPBL échappent à la dégradation médiée par le non-sens. Nous suggérons l'intérêt d'étudier les niveaux de protéine MAU2 comme biomarqueurs potentiels du CdLS. Enfin, nous montrons que l'altération de *NIPBL* conduit à la diminution significative de l'expression de gènes dont plusieurs permettent de recomposer le phénotype du CdLS. Cette signature est en cours de comparaison avec des données de méthylomique.

Utilisation des cellules souches pluripotentes humaines pour décrypter la dystrophie myotonique de type 1. Dr Cécile Martinat, ISTEM, INSERM UEVE UMR861, Corbeil-Essonnes

Sandrine Baghdoyan[1], Azania Abatan[1], Noémie Berenger-Currias[1], Lise Morizur[1], Morgan Gazzola[1] and Cécile Martinat[1]

[1] ISTEM, INSERM UEVE UMR861, Corbeil-Essonnes, France

Understanding the mechanisms by which a genetic variation contributes to diseases is a central aim of human genetics and should greatly facilitate the development of preventive strategies and treatments. Implementing this approach to understand the cellular and molecular basis of neuromuscular disorders (NMDs) is particularly challenging due to the inherent inaccessibility of the affected cell types from patients. Despite the wealth of existing cellular and animal models, progresses towards identification of new treatments have been hampered by the incomplete understanding of the pathogenic mechanisms involved in these diseases as well as the availability of relevant screening tools. The development of convenient Human models that even more closely replicate the disease will undoubtedly improve pathological modeling of neuromuscular disorders as well as more adapted therapeutics.
In this context, my group is interesting in developing an in vitro human “tool box” to establish pathological models of representative NMDs based on the use of human pluripotent stem cells. Validating this concept, we demonstrated that human pluripotent stem cells, expressing the causal mutation implicated in Myotonic Dystrophy type 1 (DM1), offer pertinent disease-cell models, applicable for a wide systemic analysis ranging from mechanistic studies to therapeutic screening. Thus, we identified developmental molecular defects involved in myogenesis as well as in neurite formation and establishment of neuromuscular connections. In parallel to these mechanistic studies, we are also interesting of using these new disease-specific cell models to identify new therapeutic strategies.

FLASH TALKS

Modèles cellulaires d'épimutation constitutionnelle du gène *MLH1* : une utilisation originale des iPSCs pour leur machinerie épigénétique

Julie LECLERC, MCU-PH
Affiliations : Oncogénétique Moléculaire, Institut de Biochimie et Biologie Moléculaire, CHU Lille
CANTHER UMR9020-U1277, Univ. Lille, CNRS, Inserm
julie.leclerc@chu-lille.fr ; julie.leclerc@inserm.fr

Auteurs :
Cédric Facon[1,2], Lucie Delattre[1], Cathy Flament[1], Afane Brahimi[3], Sophie Lejeune[3], Laurent David[4], Anne Rovelet-Lecrux[5], Catherine Vermaut[1], Pascal Pigny[1,2], Marie-Pierre Buisine[1,2], Julie Leclerc[1,2] (et les généticiens moléculaires et cliniques du Groupe Génétique et Cancer)
[1] Oncogénétique Moléculaire, Institut de Biochimie et Biologie Moléculaire, CHU Lille
[2] CANTHER UMR9020-U1277, Univ. Lille, CNRS, Inserm
[3] Clinique de Génétique, CHU de Lille
[4] Centre de Recherche en Transplantation et Immunologie, UMR 1064, ITUN, et SFR Santé, FED 4203, INSERM UMS 016, CNRS UMS 3556, Université de Nantes, CHU Nantes
[5] Inserm U1245, Rouen

Alors que les cellules souches pluripotentes induites (iPSCs) sont largement utilisées pour leur capacité de différenciation en tout type cellulaire, elles ne le sont que rarement pour leur capacité de méthylation *de novo*. C'est cette caractéristique des iPSCs que nous exploitons pour développer des modèles cellulaires d'épimutation constitutionnelle du gène *MLH1* responsable de syndrome de Lynch.

Le syndrome de Lynch est un syndrome de prédisposition héréditaire au cancer, en particulier du côlon, du rectum et de l'endomètre. La plupart des patients présentent un variant génétique constitutionnel d'un gène codant l'une des protéines impliquées dans la réparation des mésappariements de l'ADN (système MisMatch Repair) : *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* ou *PMS2*. Cependant pour certains patients, c'est une épimutation qui est responsable du phénotype. Il s'agit alors d'une hyperméthylation du promoteur du gène *MLH1* ou *MSH2*, associée à une répression transcriptionnelle du gène. Nous nous intéressons plus particulièrement aux épimutations du gène *MLH1*, pour lesquelles les mécanismes moléculaires à l'origine de la méthylation sont mal connus. Ces épimutations peuvent être primaires, correspondant à des événements épigénétiques purs labiles dans les lignées germinales, ou secondaires, c'est-à-dire associées à une altération génétique en *cis* transmise à la descendance sur un mode Mendélien.

Une cohorte de plus de 70 patients porteurs d'une épimutation constitutionnelle du gène *MLH1* a été constituée dans le cadre du diagnostic moléculaire de syndrome de Lynch au CHU de Lille, grâce à un recrutement national de patients. Au sein de cette cohorte, nous avons identifié de nouveaux variants génétiques qui ségrégent avec l'hyperméthylation (Leclerc *et al.*, 2018). Nous développons actuellement des modèles cellulaires de ces épimutations à partir d'iPSCs issues de fibroblastes de donneur sain, en introduisant les variants d'intérêt par technologie CRISPR-Cas9. Ces modèles nous ont permis de démontrer l'implication de ces variants dans la méthylation du promoteur.

Références :

- Leclerc J, Flament C, Lovecchio T, Delattre L, Ait Yahya E, Baert-Desurmont S, Burnichon N, Bronner M, Cabaret O, Lejeune S, Guimbaud R, Morin G, Mauillon J, Jonveaux P, Laurent-Puig P, Frébourg T, Porchet N, Buisine MP. Diversity of genetic events associated with *MLH1* promoter methylation in Lynch syndrome families with heritable constitutional epimutation. Genet Med. 2018;20:1589-1599. (PMID: 29790873)
- Hitchins MP. The role of epigenetics in Lynch syndrome. Fam Cancer. 2013;12:189-205. (PMID: 23462881)

Utilisation d'iPSC différenciées en épithélium bronchique pour le développement d'approches thérapeutiques de mutations non éligibles aux modulateurs de CFTR

FANEN Pascale, PU-PH département de génétique médicale, GHU Henri Mondor
Affiliation : Faculté de Santé, UPEC, Créteil
Courriel : pascale.fanen@u-pec.fr / pascale.fanen@aphp.fr / pascale.fanen@inserm.fr

Actuellement, les mutations non-sens ou les mutations affectant l'épissage du gène *CFTR* ne sont pas éligibles aux modulateurs de la protéine CFTR. Des approches thérapeutiques sont en cours de développement pour corriger spécifiquement ces mutations. Dans le cadre d'un projet financé par l'association Vaincre la Mucoviscidose, notre consortium évalue et optimise certaines de ces approches dans le contexte de la mucoviscidose.
Dans ce projet, notre équipe est chargée de mettre à disposition un modèle d'épithélium bronchique reposant sur l'usage de cellules souches pluripotentes induites sauvage ou mutées par CRISPR/Cas-9.
Nous avons adapté et mis au point le protocole de différenciation des iPSCs en cellules bronchiques qui sont ensuite cultivées à l'interface air-liquide afin de reproduire l'épithélium bronchique. Cet épithélium possède une morphologie et des caractéristiques électrophysiologiques comparables à celles d'un épithélium dérivé de culture primaire de cellules épithéliales nasales humaines (CENH), classiquement utilisé dans le contexte de la mucoviscidose. Le battement des cils est observé à la surface de ces cultures, la morphologie de l'épithélium et son caractère pseudostratifié ainsi que sa composition cellulaire (cellules basales, club, sécrétrices et ciliées) est similaire à celle des épithéliums issus des CENH comme attesté par diverses méthodes (immunomarquage, résistance transépithéliale…).
Parallèlement, la construction des lignées d'iPSC porteuses des mutations sélectionnées est en cours de réalisation avec succès en collaboration avec une équipe d'I-Stem. Cette stratégie, privilégiée sur l'obtention de génération d'iPS à partir de prélèvements de patients, est favorisée afin de comparer sur un même fond isogénique, les résultats obtenus avec les drogues sur les différentes lignées sauvage et mutée.

Advances in modeling the Charcot-Marie-Tooth disease through CRISPR editing: Human induced pluripotent stem cell-derived Schwann cells harboring *SH3TC2* variants

LIA Anne-Sophie
PhD-HDR-MCU-PH
UR20218-NeurIT-Neuropathies et Innovations Thérapeutiques-Université de Limoges
UF 8855 - Service de Biochimie et Génétique Moléculaire – CHU de Limoges
anne-sophie.lia@unilim.fr

Human-induced-pluripotent-stem-cells (hiPSCs) represent a powerful tool to investigate neuropathological disorders in which the cells of interest are inaccessible such as in the Charcot-Marie-Tooth disease (CMT), the most common inherited peripheral-neuropathy. Developing appropriate cellular models become crucial in order to both study the disease's pathophysiology and test new therapeutic approaches. Recent advancements in CRISPR-base-editing, now allow for the precise conversion of a base-pair in the targeted DNA sequence, enhancing the generation of hiPSC isogenic cellular models for disorders arising from single-nucleotide alterations.

Our first objective was to use the CRISPR-Cas9-base-editing technology to create the first two CMT-hiPSC-models harboring alterations in *SH3TC2*, the most frequently mutated gene for the demyelinated autosomal-recessive-CMT form (AR-CMT-SH3TC2): one model with c.2860C>T-p.Arg954* and the other with c.211C>T-p.Gln71* homozygous mutations. Due to the time and cost associated with growing and engineering hiPSCs, we optimized the generation of SH3TC2 variations in cultivable and transfectable HEK-293T cells. This allowed for a quick and easy evaluation of different CRISPR base editing approaches, subsequently, applied to control hiPSCs. This approach resulted in 90.5% and 93% On-Target activity for c.211C>T-p.Gln71* and c.2860C>T-p.Arg954*, respectively, ensuring correct editing in at least one allele.

Then, as *SH3TC2* is mostly expressed in Schwann-cells, we initiated the differentiation in this pathway for both our CMT clones and a control one. Following successful differentiation, we highlighted the first *in vitro* endogenous expression of human SH3TC2 in the control hiPSCs-derived-Schwann-cells clone. This allowed us to delve into investigating *SH3TC2* expression across AR-CMTde-SH3TC2 clones, revealing a delay in maturation along with *SH3TC2* expression disparity.

Finally, we initiated the test of a first potential therapeutics molecule, Amlexanox, and showed its positive effect in re-expressing SH3TC2 protein in our AR-CMTde-SH3TC2 clones.

In conclusion, this study successfully establishes the first two Schwann-cell-models derived from hiPSCs harboring pathogenic CMT variations in *SH3TC2* and presents the proof of concept that these cellular models provide valuable tools for gaining a deeper understanding of the pathophysiology associated with this CMT-type and for exploring novel therapeutic strategies.

Les cellules pluripotentes induites, excellent modèle cellulaire pour l'étude de la physiopathologie de la granulomatose septique chronique

STASIA Marie José, Maitre de Conférences-Praticien Hospitalier, Centre de Diagnostic et Recherche sur la Granulomatose Septique Chronique (LBMR), CHU Grenoble Alpes et Institut de Biologie Structurale, Université Grenoble Alpes
Courriel : marie-jose.stasia@univ-grenoble-alpes.fr

La granulomatose septique chronique (CGD) est un syndrome d'immunodéficience innée rare (1 cas sur 250 000) qui affecte le fonctionnement du complexe membranaire NADPH-oxydase des cellules phagocytaires tels que les neutrophiles, monocytes et macrophages. Cette maladie est généralement diagnostiquée avant l'âge de deux ans devant des infections sévères et récidivantes. Le complexe NADPH-oxydase est formé d'un cœur redox membranaire appelé le cytochrome b_{558} composé de deux sous-unité NOX2 ou gp91^{phox} et p22^{phox}, et de sous-unités cytosoliques p47^{phox}, p67^{phox}, et p40^{phox}. Sous sa forme assemblée, ce complexe enzymatique est capable de produire des anions superoxydes point de départ de la formation de formes réactives de l'oxygène (FRO) responsables de la bactéricidie lors d'infections. Des mutations dans les gènes codant les sous-unités du complexe NADPH-oxydase sont à l'origine de différentes formes génétiques à l'origine de la CGD. La forme la plus fréquente (70% des cas) est la CGD de transmission liée à l'X (CGDX) déficient en NOX2/p22^{phox}.
A partir de fibroblastes de peau ou de lymphocytes B immortalisés par le virus Epstein Bar issus de patients souffrant des différentes formes génétiques (gènes *CYBB* (NOX2), CYBA (p22^{phox}), *NCF1* (p47^{phox}), et *NCF2* (p67^{phox}), nous avons créée des lignées de cellules pluripotentes induites (IPSC) par nucléofection des facteurs de transcription sous forme plasmidique (pCXLE-hOct3/4-shp53, pCXLE-hSox2-hKlf4, pCXLE-hLin28-hL-Myc). Ces iPSC ont permis d'obtenir des progéniteurs hématopoïétiques puis par différentiation des neutrophiles et des macrophages, excellents modèles cellulaires pour l'étude physiopathologique de la CGD (Brault et al. BioResearch Access 2014 doi: 10.1007/978-1-4939-9424-3_35; Brault *et al.* Methods Mol Biol. 2019, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.10.005).
En utilisant des iPSCs déficientes en p22^{phox} (NOX1, NOX2 et NOX3 ayant besoin de p22^{phox} pour être fonctionnelles), nous avons démontré que NOX4 (p22^{phox} indépendant) est la principale isoforme NOX impliquée dans les premières étapes de la différenciation hématopoïétique à partir d'iPSC et que son activité peut moduler la production, le potentiel hématopoïétique et le phénotype des CD34+ dérivés d'iPSC (Brault et al. Free Radic Biol Med. 2020 doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.10.005).
Enfin, il nous parait essentiel de développer une thérapie locale pulmonaire à base de protéoliposomes NOX2/p22^{phox} (PLs) pour les patients CGD souffrant d'infections récurrentes et potentiellement mortelles, la pneumonie aiguë étant la première cause de décès. En 2017, la preuve de concept de l'efficacité des PLs NOX2/p22^{phox} synthétisés en « cell-free-system » a été réalisée grâce à des macrophages issus de la différenciation d'iPSCs CGDX (Brault et al. Int J Nanomedicine. 2017. doi: 10.2147/IJN.S128611). Notre projet actuel se propose d'optimiser la production de PLs NOX2/p22^{phox} par expression lentivirale dans le modèle HEK293T et purifiés par affinité. Les PLs NOX2/p22^{phox} seront modifiés chimiquement pour cibler préférentiellement les macrophages pulmonaires et réaliser la preuve de concept de leur efficacité dans le modèle d'infections pulmonaires chez la souris CGDX (Projet ANR PRC PROLIC, 2023-2026).

Exemple d'application des organoïdes rénaux humains en toxicologie : Développement de l'Adverse Outcome Pathway de la néphrotoxicité induite par l'uranium

STEICHEN Clara, Interne en biochimie, chercheuse associée IRMETIST INSERM U1313 Service de Biochimie, CHU de Poitiers Clara.steichen@univ-poitiers.fr

Marie Frerejacques[1,*], Clara Steichen[2,*], Maité Jacquard Fevai[2], Sonia Brishoual[2], Victoria Powell [1], S.Giraud[2] , Céline Bouvier-Capely[1], Thierry Hauet[2,$],$, Yann Gueguen[2,$]

[1] Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PSE-SANTE, SESANE, LRSI, Fontenay-aux-Roses, F-92262 France

[2] Université de Poitiers, INSERM IRMETIST U1313, CHU de Poitiers, Service de Biochimie, F-86000 Poitiers [*, $] These authors contributed equally to this work

Les avancées technologiques dans le domaine des iPSC et modèles 3D permettent d'offrir de nouveaux outils en recherche fondamentale, mais également en toxicologie. Le concept d'Adverse Outcome Pathway (AOP) rassemble des éléments mécanistiques qui conduisent à un effet indésirable, en liant des évènements clés (moléculaires, cellulaires et tissulaires). Ce projet s'intéresse à la néphrotoxicité de l'uranium, métal lourd et émetteur alpha, possédant une toxicité radiologique et chimique, s'accumulant dans les cellules épithéliales du tube proximal. L'objectif est de contribuer au développement de l'AOP de la néphrotoxicité induite par l'U grâce à un modèle d'organoïde rénal (iKO pour induced Kidney Organoids).

Des hiPSC ont été différenciées en iKO caractérisés puis transférés à J14 de leur différentiation à l'Institut de Radioprotection et de Sureté Nucléaire (IRSN). Les IKO ont été caractérisés à leur arrivée puis exposés à l'uranium et analysés, en comparaison à un modèle de cellules épithéliales du tube proximal, les hRPTEC- TERT (modèle 2D).

Les iKO transférés à l'IRSN expriment des gènes de différents segments du greffon dotés de fonctions différentes (glomérule, tubule proximal et distal) ; la présence de cellules épithéliales du tube proximal a été confirmée par immunomarquage. Des structures « tubule-like » sont retrouvées de façon aléatoire et non reproductible sur l'ensemble des lots d'iKO transférés. Après la caractérisation des paramètres d'exposition (durée, concentration), l'IC50 de l'U sur ce modèle a été évaluée à 1000µM. Ceci a permis de montrer qu'en aval, au niveau génique et protéique, différentes voies dont stress oxydant, survie/apoptose et inflammation sont affectées par l'exposition. Nous observons notamment une réponse inflammatoire majeure (surexpression de TNFα) ainsi que l'expression de marqueurs de lésion rénale (rénine et calbindine), non détectés sur le modèle 2D.

Ce projet montre la faisabilité de combiner deux outils innovants, les organoïdes rénaux et le concept d'AOP en toxicologie, domaine dans lequel des outils pertinents d'évaluation notamment *in vitro,* sont indispensables.

MITIC : Développement d'un Modèle *In-vitro* Tridimensionnel de jonction neuromusculaire à partir de cellules IPSC pour l'étude des CMT

FAYE Pierre-Antoine, PharmaD PhD MCU-PH
Affiliations :
UF 8855 - Service de Biochimie et Génétique Moléculaire CBRS - CHU Limoges
UR 20218 NeurIT Neuropathies et Innovations Thérapeutiques – Faculté de Médecine de Limoges

Courriel : pierre-antoine.faye@chu-limoges.fr

Les neuropathies périphériques constituent un enjeu de santé publique majeur, avec une prévalence estimée à 700 000 personnes en France. Notre équipe de recherche, l'UR20218 NeurIT, s'intéresse entre autre à l'étude de la maladie de Charcot-Marie-Tooth, une neuropathie sensitivo-motrice héréditaire, pour laquelle il n'existe pas de traitement pharmacologique efficace à l'heure actuelle (1/2500). La compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans cette maladie est rendue complexe en raison de la difficulté d'accessibilité aux types cellulaires impliqués à savoir les motoneurones et les cellules de Schwann des patients et à la difficulté d'avoir des modèles cellulaires adaptés. De plus, l'utilisation de modèles animaux ne semble pas offrir une transférabilité satisfaisante, caractérisée par des échecs lors des essais cliniques, des préoccupations éthiques (3R : réduire, remplacer, raffiner) et autres inconvénients logistiques. Pour ces raisons, les cellules souches induites à la pluripotence (hIPSc) ont été développées au sein du laboratoire. Ainsi, à partir de cellules de peau de patients porteurs de variations pathologiques dans les gènes d'intérêts, il est possible d'obtenir des motoneurones, des cellules de Schwann ou encore des cellules musculaires, qui elles-mêmes vont porter la variation pathologique.

L'objectif principal de notre étude est de développer et d'établir un modèle original de jonction neuromusculaire *in-vitro* en 3 dimensions combinant une organisation de ces trois types cellulaires d'intérêts (motoneurones, cellules de Schwann, cellules musculaires). Ce modèle nous permettra à la fois de répondre à des questions fondamentales quant aux mécanismes physiopathologiques impliqués dans la maladie, mais aussi d'identifier et de tester des molécules thérapeutiques sur un modèle aussi proche que possible de la physiologie du patient et possédant les mêmes désordres génétiques. Pour ce faire, des micro-puces de culture permettant l'assemblage de ces types cellulaires ont été obtenues par impression 3D. Après caractérisation, ce modèle de tri-culture pourrait être appliqué à d'autres pathologies neuromusculaires.